



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMÍA

“Domesticación y pre-mejoramiento
de Amarilidáceas nativas con potencial
ornamental”

Ing. Agrónoma Ana Clara Fernández

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2020

**Domesticación y pre-mejoramiento de Amarilidáceas
nativas con potencial ornamental**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO
ACADEMICO DE DOCTOR EN AGRONOMÍA**

Ing. Agrónoma Ana Clara Fernández

CONTENIDO

	Pag
PREFACIO -----	vi
AGRADECIMIENTOS -----	vii
LISTA DE FIGURAS -----	viii
LISTA DE TABLAS -----	xii
RESUMEN -----	xiii
SUMMARY -----	xv
INTRODUCCIÓN GENERAL -----	1
Amaryllidaceae -----	4
Descripción de las especies en estudio -----	5
<i>Habranthus tubispathus</i> (L'Her.) Traub. -----	9
Hipótesis y objetivos -----	12
Bibliografía -----	13
1. CAPITULO 1 - Estudios Ecofisiológicos en <i>Habranthus tubispathus</i> y <i>Zephyranthes filifolia</i> -----	15
1.1 INTRODUCCIÓN -----	15
1.1.1 Descripción climatológica de la región -----	15
1.1.2 Adaptación de <i>Habranthus tubispathus</i> y <i>Zephyranthes filifolia</i> al clima local -----	15
1.2 MATERIALES Y METODOS -----	17
1.2.1 Estudios <i>in situ</i> de <i>Habranthus tubispathus</i> y <i>Zephyranthes filifolia</i> -----	17
1.2.2 Respuesta al régimen hídrico -----	18
1.2.3 Efecto de la temperatura sobre la floración y desarrollo de <i>H. tubispathus</i> -----	20
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	20
1.3.1 Estudios <i>in situ</i> de <i>Habranthus tubispathus</i> y <i>Zephyranthes filifolia</i> -----	20
1.3.2 Respuesta al régimen hídrico -----	28
1.3.3 Efecto de la temperatura sobre la floración y desarrollo de <i>H. tubispathus</i> -----	36
1.4 CONCLUSIONES -----	38
1.5 BIBLIOGRAFIA -----	39
2. CAPITULO 2 - Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Habranthus tubispathus</i> -----	41
2.1 INTRODUCCIÓN -----	41
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS -----	44
2.2.1 Twin scaling en el establecimiento y multibrotación <i>in vitro</i> de <i>H. tubispathus</i> -----	44
2.2.1.1 Producción de biomasa de bulbos y brotes por Twin scaling en <i>H. tubispathus</i> . Complemento de reguladores de crecimiento en medios de cultivos: ácido α -naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) y 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina (2iP). -----	46
2.2.1.2 Producción de biomasa de bulbos y brotes por Twin scaling en <i>H. tubispathus</i> . Complemento de reguladores de crecimiento en medios de cultivos: ácido indol-3-acético (AIA), 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina 2iP y tidiazurón (TDZ) -----	47
2.2.1.3 Producción de bulbos por Twin scaling en <i>H. tubispathus</i> . Ajuste de los tratamientos con mayor multibrotación por explanto -----	48
2.2.1.4 Subcultivo de tratamientos con mayor multibrotación por explanto -----	48
2.2.2 Bulbificación <i>in vitro</i> -----	49
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	50
2.3.1 Twin scaling en el establecimiento y multibrotación <i>in vitro</i> de <i>H. tubispathus</i> -----	50
2.3.1.1 Producción de biomasa de bulbos y brotes por Twin scaling en <i>H. tubispathus</i> . Complemento de reguladores de crecimiento en medios de cultivos: ácido α -naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) y 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina (2iP) -----	51
2.3.1.2 Producción de biomasa de bulbos y brotes por Twin scaling en <i>H. tubispathus</i> . Complemento de reguladores de crecimiento en medios de cultivos: ácido indol-3-acético (AIA), 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina 2iP y tidiazurón (TDZ) -----	54
2.3.1.3 Producción de bulbos por Twin scaling en <i>H. tubispathus</i> . Ajuste del complemento de reguladores de crecimiento -----	58
2.3.1.4 Subcultivo de tratamientos con mayor multibrotación por explanto -----	60
2.3.2 Bulbificación <i>in vitro</i> -----	60
2.4 CONCLUSIONES -----	64

2.5 BIBLIOGRAFÍA -----	65
3. CAPITULO 3 - Estudios de la Biología floral de <i>Habranthus tubispathus</i> -----	69
3.1 INTRODUCCIÓN -----	69
3.1.1 Viabilidad y longevidad polínica -----	70
3.1.1.2 Evaluación de la viabilidad polínica -----	71
3.1.2. Conservación y almacenamiento del polen -----	73
3.1.3 Estudios de biología floral -----	73
3.2 MATERIALES Y METODOS -----	74
3.2.1 Viabilidad y longevidad polínica -----	74
3.2.1.1 Análisis de la cantidad de polen por flor -----	74
3.2.1.2 Análisis de la germinación <i>in vitro</i> -----	75
3.2.1.3 Análisis de la calidad de polen y determinación del momento de óptimo de recolección de muestras -----	76
3.2.1.4 Crecimiento del tubo polínico en el pistilo -----	78
3.2.2 Conservación del polen y comparación de técnicas de estimación de la viabilidad -----	79
3.2.3 Estudios de biología floral -----	80
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	82
3.3.1 Viabilidad y longevidad polínica -----	82
3.3.1.1 Análisis de la cantidad de polen por flor -----	82
3.3.1.2 Análisis de la germinación <i>in vitro</i> -----	83
3.3.1.3 Análisis de la calidad de polen y determinación del momento óptimo de recolección de muestras -----	87
3.3.1.4 Crecimiento del tubo polínico en el pistilo -----	88
3.3.2 Conservación del polen y comparación de técnicas de estimación de la viabilidad -----	89
3.3.3 Estudios de biología floral -----	90
3.4 CONCLUSIONES -----	93
3.5 BIBLIOGRAFIA -----	93
4. CAPITULO 4 - Evaluación del modo reproductivo de <i>Habranthus tubispathus</i> -----	97
4.1 INTRODUCCION -----	97
4.1.1. Evaluación fenotípica de la progenie de cruzamientos y autofecundaciones de individuos que varían en el color de flor -----	97
4.1.2. Estudios citoembriológicos -----	99
4.1.3. Caracterización cariotípica -----	99
4.1.4. Test de progenie mediante Marcadores Moleculares -----	101
4.1.5. Mediciones y análisis del contenido de ADN nuclear -----	101
4.2 MATERIALES Y METODOS -----	102
4.2.1. Estudios citoembriológicos -----	102
4.2.2. Caracterización cariotípica -----	103
4.2.3. Test de progenie mediante Marcadores Moleculares -----	105
4.2.4. Mediciones y análisis del contenido de ADN nuclear -----	107
4.3. RESULTADOS Y DISCUSION -----	108
4.3.1. Estudios citoembriológicos -----	108
4.3.2. Caracterización cariotípica -----	114
4.3.3. Test de progenie mediante Marcadores Moleculares -----	119
4.3.4. Mediciones y análisis del contenido de ADN nuclear -----	122
4.4. CONCLUSIONES -----	124
4.5 BIBLIOGRAFIA -----	124
CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS -----	128

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre los años 2008 y 2012, bajo la dirección del Dr., Ing. Agr. Pablo Marinangeli.

Diciembre 2020

Departamento de Agronomía
Universidad Nacional del Sur

Ana Clara Fernández



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Pablo Marinangeli, por haber confiado en mí y por brindarme la posibilidad de llevar a cabo este trabajo. Por sus conocimientos, sus consejos, su espacio, dedicación y tiempo.

A todas aquellas personas que trabajan en el laboratorio del CERZOS, especialmente a Ramón, Carolina, Ricardo y Gabriela por su disponibilidad a ayudarme en todo momento y brindarme sus tan valiosos consejos. También a los integrantes del Laboratorio de Biotecnología y Genética Vegetal, por haberme dado la posibilidad de trabajar con ellos, y brindarme siempre una ayuda cuando lo necesité.

A los integrantes del Instituto de Floricultura del INTA Castelar, por recibirme siempre tan amablemente y brindarme su apoyo para completar los estudios de citometría de flujo y biología floral.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYP) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas para la realización de este trabajo. Asimismo deseo agradecer a las autoridades del CERZOS y el Dpto. de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur por haberme brindado un excelente espacio físico y académico.

Quisiera agradecer en particular a Valentina, Juan Manuel, Antonio, Néstor, Diego y Andrea por su gran apoyo en el desarrollo de esta tesis.

A mis padres, Néstor y Mónica, y a mi hermano Tomás, por todo su amor y apoyo incondicional. Y a mis grandes amores Guillermo y Fermín por ser los pilares fundamentales de mis días.

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura I: A. Planta completa de <i>H. tubispathus</i> , con foliolos, bulbo y raíces. B. corte transversal del bulbo. -----	6
Figura II: Escapos florales <i>H. tubispathus</i> , A. color amarillo anaranjado y B. rosado, y C. <i>Z. filifolia</i> . -----	7
Figura III: A. Cápsula trilobulada dehiscente de <i>H. tubispathus</i> , B. semillas. -----	7
Figura IV: Ilustraciones botánicas de <i>H. tubispathus</i> y <i>Z. filifolia</i> , donde: A. planta, B. escapo floral, C. gineceo y androceo, D. base del pedúnculo E. fruto y F. semilla.	8
Figura V: Distribución de <i>Habranthus tubispathus</i> , donde Nativo se refiere a los países donde esta especie se encuentra de forma nativa, e Introducido en aquellos en que fue incorporada por el hombre. -----	10
Figura VI: Esquema de domesticación propuesto para <i>Habranthus tubispathus</i> (adaptado de Seguel <i>et. al.</i> , 2007). -----	11
Figura 1.1: A. Ubicación de las clausuras en el predio del CONICET Bahía Blanca (38°39'59.47"S - 62°14'5.62"W), para los sitios S1 y S2; donde EM se refiere al lugar donde se encuentra la estación meteorológica. B. Planta de <i>H. tubispathus</i> identificada mediante caravana blanca. C. Planta de <i>Z. filifolia</i> identificada mediante caravana amarilla. -----	18
Figura 1.2: Efecto en la producción de hojas para los 4 tratamientos evaluados en: A. <i>H. tubispathus</i> . B. <i>Z. filifolia</i> . -----	20
Figura 1.3: Fenofases de las estructuras reproductivas de <i>H. tubispathus</i> . a) Brote, b) botón joven, c) botón maduro, d) flor joven, e) flor madura, f) flor senil, g) fruto temprano, h) fruto joven e i) fruto maduro.	21
Figura 1.4: Floración de <i>Habranthus tubispathus</i> en la población de estudio de CERZOS. -----	22
Figura 1.5: Fenofases diferenciales e) y f) para <i>Zephyranthes filifolia</i> . -----	22
Figura 1.6: Número de hojas promedio y flores totales producidos semanalmente en las 25 plantas estudiadas de <i>H. tubispathus</i> , en la Clausura I. -----	23
Figura 1.7: Número de hojas promedio y flores totales producidos semanalmente en las 25 plantas estudiadas de <i>H. tubispathus</i> , en la Clausura II. -----	23
Figura 1.8: Número de hojas y flores producidos semanalmente en las 25 plantas estudiadas de <i>Z. filifolia</i> , en la Clausura I. -----	25
Figura 1.9: Número de hojas y flores producidos semanalmente en las 25 plantas estudiadas de <i>Z. filifolia</i> , en la Clausura II. -----	25
Figura 1.10: Anomalías positivas  y negativas  de precipitación mensual (mm), y número de flores acumulada para ambas clausuras de <i>Habranthus tubispathus</i> (H.t.)  y de <i>Zephyranthes filifolia</i> (Z.f.)  durante el periodo 2009-2012. -----	26
Figura 1.11: Anomalías positivas  y negativas  de temperatura mensual (°C), durante el periodo 2009-2012. -----	27
Figura 1.12: A. Número máximo de hojas, y B. Número total de flores para los 4 tratamientos evaluados (1: riego semanal, 2: riego quincenal, 3: riego mensual y 4: riego solo en periodo reproductivo), para <i>Habranthus tubispathus</i> (H.t) y <i>Zephyranthes filifolia</i> (Z.f.). Letras distintas para cada especie indican diferencias significativas ($p < 0,05$). -----	30
Figura 1.13: Producción de número de hojas máximo por fase fenológica en <i>Habranthus tubispathus</i> (H.t.) y <i>Zephyranthes filifolia</i> (Z.f.), para: A. Tratamiento 1, riego semanal. B. Tratamiento 2, riego quincenal. C. Tratamiento 3, riego mensual. D. Tratamiento 4, riego solo en periodo reproductivo. -----	31
Figura 1.14: Producción de número de flores totales por fase fenológica en <i>Habranthus tubispathus</i> (H.t) y <i>Zephyranthes filifolia</i> (Z.f.), para: A. Tratamiento 1, riego semanal. B. Tratamiento 2, riego quincenal. C. Tratamiento 3, riego mensual. D. Tratamiento 4, riego solo en periodo reproductivo. -----	32

- Figura 1.15:** Tratamientos evaluados para las fases fenológicas reproductiva (R) y vegetativa (V) en los años de evaluación: T1 (riego semanal), T2 (riego quincenal), T3 (riego mensual) y T4 (riego solo en período reproductivo), para: **A.** Número de hojas máximo en *H. tubispathus* (H.t). Las letras son únicamente para los Tratamientos 1, 2 y 3. **B.** Número de hojas máximo en *Z. filifolia* (Z.f.). **C.** Número total de flores para H.t. Las letras son únicamente para los Tratamientos 1, 2 y 3. **D.** Número total de flores para Z.f. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ----- 35
- Figura 1.16:** Número máximo de hojas y número total de flores por planta para los 2 tratamientos evaluados: A temperatura máxima 25 °C y B temperatura máxima 38 °C, para *H. tubispathus*. Letras distintas entre barras del mismo color indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ----- 37
- Figura 1.17:** Peso fresco (PF), peso seco (PS) de hojas, raíz y bulbo para los 2 tratamientos evaluados: A temperatura máxima 25 °C y B temperatura máxima 38 °C, para *H. tubispathus*. Letras distintas entre barras del mismo color indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$). ----- 38
- Figura 2.1:** Esquema del flujo de operaciones correspondiente al protocolo propuesto para micropropagación de *Habranthus tubispathus* a partir de bulbos. ----- 44
- Figura 2.2:** Esquema utilizado para la obtención de twin scales desde bulbos de *H. tubispathus*: **A.** El bulbo fue cortado transversalmente, la parte superior y restos de raíces fueron eliminadas; **B.** La parte media fue seccionada radialmente en 8 gajos, **C.** Cada gajo fue dividido en segmentos de doble escama, unidas por una porción del disco basal (Flores, 2003). ----- 45
- Figura 2.3:** Producción de vástagos por explanto en twin scaling de *H. tubispathus*. Efectos del ANA y del AIA solos o en combinación con 2iP. No se encontraron diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$). ----- 53
- Figura 2.4:** Fotografías mostrando la respuesta a twin scaling en *H. tubispathus*. A. Evidencia de una nueva brotación a partir del disco basal entre ambas escamas del explanto. B. Tratamientos sin respuesta con distintos grados de oxidación. C. Callosidades reemplazando a raíces. D. Crecimiento radicular exuberante en tratamiento N°14. E. Distintos grados de multibrotación. ----- 55
- Figura 2.5:** Producción de vástagos por explanto en twin scales de *H. tubispathus*. Efectos del AIA en combinación con 2iP y TDZ. No se encontraron diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$). ----- 58
- Figura 2.6:** Producción de vástagos por explanto en twin scales de *H. tubispathus*. Efectos del AIA en combinación con 2iP y TDZ. No se encontraron diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$). ----- 59
- Figura 2.7:** La figura es una muestra representativa de la multibrotación *in vitro* obtenida por twin scaling en *Habranthus tubispathus*. Medio de cultivo con 1 mg L⁻¹ de TDZ + 50 mg L⁻¹ AIA. ----- 59
- Figura 2.8:** Comparación del crecimiento de bulbos de *H. tubispathus* en medio de cultivo con 0, 30, 60, 90 y 120 g L⁻¹ de sacarosa, A. con, o B. sin el agregado de 1 mg L⁻¹ de AIA. ----- 61
- Figura 2.9:** Producción de biomasa de raíces de *H. tubispathus*. Efecto de cuatro concentraciones de sacarosa, con y sin el agregado de 1mg L⁻¹ de AIA. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). ----- 62
- Figura 2.10:** Producción de biomasa de hojas de *H. tubispathus*. Efecto de cuatro concentraciones de sacarosa, con y sin el agregado de 1mg L⁻¹ de AIA. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). ----- 62
- Figura 2.11:** Producción de biomasa de bulbos de *H. tubispathus*. Efecto de cuatro concentraciones de sacarosa, con y sin el agregado de 1mg L⁻¹ de AIA. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). ----- 63
- Figura 3.1:** Esquema de la cámara del hematocitómetro utilizada para el recuento, con los cuatro cuadrantes identificados como I, II, III y IV. ----- 75
- Figura 3.2:** Coloración de Alexander en granos de polen de *Habranthus tubispathus*. En la foto se observa un grano de polen central de coloración verde claro, el cual es no viable. En contraste, sobre su derecha e izquierda se observan dos granos viables, de coloración negra oscura. ----- 77

Figura 3.3: Coloración con FDA en granos de polen de <i>Habranthus tubispathus</i> . Se observan cuatro granos fluorescentes, correspondientes a aquellos viables; y 3 que no presentan fluorescencia, correspondientes a los inviables. -----	78
Figura 3.4: Granos de polen y tubos polínicos germinando en el estigma y parte del estilo de una flor de <i>H. tubispathus</i> evidenciados por fluorescencia. Escala 100x. -----	79
Figura 3.5: División del gineceo a fin de evaluar el crecimiento del tubo polínico en su interior. -----	79
Figura 3.6: Lóculo abierto para la cuantificación del número de óvulos por ovario en <i>H. tubispathus</i> . Magnificación x 10. -----	82
Figura 3.7: Germinación <i>in vitro</i> de polen de <i>H. tubispathus</i> en medios de cultivo sólido con distintas concentraciones de sacarosa (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 y 1 M). A. Porcentaje de germinación. B. Longitud del tubo polínico (μm). Las barras indican el error estándar de la media. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos, por el test Tukey (<0,05). -----	84
Figura 3.8: Germinación <i>in vitro</i> de polen de <i>H. tubispathus</i> en medios de cultivo sólido con tres concentraciones de BO_3H_3 (1, 2 y 4 mM) y tres de Cl_2Ca (1, 2 y 4 mM). A. Porcentaje de germinación. B. Longitud del tubo polínico (μm). Los valores 1, 2 y 4 en el eje x del gráfico, se refieren a concentraciones de 1, 2 y 4 mM respectivamente. Las barras indican el error estándar de la media. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos por el test Tukey (<0,05). -----	86
Figura 3.9: Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de polen de <i>H. tubispathus</i> en medios de cultivo líquido con tres concentraciones de PEG (10, 15 y 20 %) y tres de sacarosa, (5, 10 y 15 %). Las barras indican el error estándar de la media. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos, por el test Tukey (<0,05). -----	87
Figura 3.10: Viabilidad polínica de <i>H. tubispathus</i> evaluado por el método de tinción de Alexander, medida en intervalos de tiempo: 10:00, 11:30, 13:00, 14:30, 16:00 y 17:30 h. -----	88
Figura 3.11: Tubos polínicos, mostrando engrosamientos de calosa, dentro del saco embrionario (se) y arribando a los óvulos (ov). -----	89
Figura 3.12: Flor sin perigonio de <i>Habranthus tubispathus</i> donde se observa la hercogamia. -----	91
Figura 4.1: <i>H. tubispathus</i> . Corte longitudinal de un óvulo maduro mostrando el único tegumento que se desarrolla en esta especie (te) y la cavidad del saco embrionario (se). -----	109
Figura 4.2: <i>H. tubispathus</i> . Corte longitudinal del óvulo mostrando la nucela pseudocrasinucelada (n) y la célula madre de las megasporas (cm) en el centro. -----	109
Figura 4.3: <i>H. tubispathus</i> . Megasporocito (me) en profase I inmerso en la nucela indiferenciada (nu), orientado en sentido polar en el eje calazal-micropilar. Presenta un solo núcleo y citoplasma prominente. -----	110
Figura 4.4: <i>H. tubispathus</i> . Saco embrionario con desarrollo de hipóstasis (hi), y dos núcleos antípodas (an). --	111
Figura 4.5: <i>H. tubispathus</i> . Saco embrionario binucleado producto de la primera división de la célula madre de las megasporas. -----	111
Figura 4.6: <i>H. tubispathus</i> . Núcleos situados de forma polar tras sufrir la segunda división mitótica. -----	112
Figura 4.7: <i>H. tubispathus</i> . Saco embrionario con dos núcleos polares (po) cercanos a la hipóstasis. -----	112
Figura 4.8: <i>H. tubispathus</i> . Núcleos polares (po) en una misma unidad de protoplasto, en un saco embrionario maduro en etapa prefertilización. -----	112
Figura 4.9: <i>H. tubispathus</i> . Antípodas (2 de 3) situadas hacia el polo chalazal en el fondo del saco embrionario maduro. -----	113
Figura 4.10: <i>H. tubispathus</i> . Aparato ovular en el extremo micropilar del saco embrionario. Sinérgidas (s) con protoplasto denso y ovocélula (o) vacuolada. -----	114
Figura 4.11: Metafases mitóticas para <i>H. tubispathus</i> en sus dos citotipos encontrados, la flecha señala el satélite encontrado para el tetraploide. -----	116

Figura 4.12: Cromosomas individualizados y agrupados de a pares para tetraploides y hexaploides de <i>H. tubispathus</i> . -----	116
Figura 4.13: Ideograma haploide para <i>H. tubispathus</i> tetraploide, $4x=2n=24$. -----	117
Figura 4.14: Ideograma haploide para <i>H. tubispathus</i> hexaploide, $6x=2n=36$. -----	119
Figura 4.15: Patrones de bandas obtenidos para el cebador Pr7 en los parentales y descendencia de los cruzamientos 1, 4 y 5, donde P, M e H hacen referencia a los individuos progenitores masculinos, femeninos y descendencia, respectivamente. -----	121
Figura 4.16: Histograma de citometría de flujo que muestra la fluorescencia relativa de núcleos teñidos con DAPI aislados de semillas de <i>Habranthus tubispathus</i> . -----	122

LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla I: Superficie cultivada con de bulbos para flor, reportada en 1972, 1992 y 2005. -----	3
Tabla II: Superficie cultivada con bulbos de flor en Holanda durante los periodos 2003/04, 2004/05 y 2007/08.	3
Tabla 2.1: Combinación factorial de tres concentraciones de ANA y AIA con 2iP en el medio de cultivo. -----	46
Tabla 2.2: Combinación factorial de tres concentraciones de ANA con 2iP y TDZ en el medio de cultivo. -----	47
Tabla 2.3: Producción de biomasa de bulbos y brotes de <i>H. tubispathus</i> obtenidos por twin scaling. Efectos del ANA y del AIA solos o en combinación con 2iP. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS) de hojas, raíces y bulbos y en adición; el diámetro del bulbo (mm) y el largo de la hoja (cm). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). -----	52
Tabla 2.4: Producción de biomasa de bulbos y brotes de <i>H. tubispathus</i> obtenidos por twin scaling. Efectos del AIA en combinación con 2iP y TDZ. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS) de hojas, raíces y bulbos y en adición; el diámetro del bulbo (mm) y el largo de la hoja (cm). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). -----	57
Tabla 3.1: Fructificación (%), promedio del número de semillas producidas por fruto y eficiencia reproductiva (ER), en auto-fecundaciones, polinización cruzada y plantas no polinizadas <i>H. tubispathus</i> . -----	91
Tabla 4.1: Cebadores ISSR utilizados para estimar la variabilidad genética en medios hermanos de <i>H. tubispathus</i> . -----	106
Tabla 4.2: Clasificación cromosómica según el genotipo analizado para <i>H. tubispathus</i> , donde m: metacéntrico, sm: submetacéntrico y st: subtelocéntrico, según Levan et al. (1964). -----	116
Tabla 4.3: Datos morfométricos de los cromosomas de <i>H. tubispathus</i> para el genotipo tetraploide ($2n=24$). Donde L: brazo largo, C: brazo corto, LC: longitud total del cromosoma=L+C, r-Val: C/L, RB: relación brazo=L/C e IC: Índice centromérico=C/LC. -----	116
Tabla 4.4: Datos morfométricos de los cromosomas de <i>H. tubispathus</i> para el genotipo hexaploide ($2n=36$). Donde L: brazo largo, C: brazo corto, LC: longitud total del cromosoma=L+C, r-Val=C/L, RB: relación brazo=L/C e IC: Índice centromérico=C/LC. -----	118
Tabla 4.5: Resultados obtenidos de los marcadores ISSR analizados en las progenies de <i>Habranthus tubispathus</i> evaluadas. TB, BP y %BP indican el número de bandas consideradas, el número de bandas polimórficas y el porcentaje de bandas polimórficas, respectivamente. -----	120
Tabla 4.6: Evaluación de corolas para <i>H. tubispathus</i> , donde AC se refiere a altura de corola (cm), DC a diámetro de corola (cm) y AO altura del ovario (cm). -----	123

RESUMEN

Promover la utilización de la flora nativa en proyectos paisajísticos, genera la posibilidad de concientizar acerca del valor de los recursos genéticos vegetales de nuestro país y de la necesidad de conservarlos, permitiendo así su aprovechamiento racional y sostenible, ayudando en su preservación. En este sentido, *Habranthus tubispathus* es una especie con gran potencial de domesticación debido a su gran adaptabilidad a la zona semiárida y al gran valor que posee como recurso natural, no solo por su valor ornamental, sino también por sus propiedades medicinales y los servicios ecosistémicos que brinda.

Con el propósito de avanzar en la utilización de la especie como recurso nativo ornamental y brindar herramientas para promover su mejoramiento, se propuso la siguiente metodología: colecta del germoplasma silvestre, estudios ecofisiológicos, evaluación *in situ* y bajo condiciones controladas del comportamiento de dos especies nativas, determinación del mejor método para la regeneración y multiplicación de los materiales, estudio botánico y morfológico de la biología floral; y estudio de su sistema reproductivo.

Los resultados indicaron que bajo condiciones naturales, *Habranthus tubispathus* presenta un estadio vegetativo otoño-invernal (marzo a octubre) seguido por un período reproductivo que va desde noviembre hasta febrero, con floración sincrónica y repetida que se produce cuando las lluvias superan los 10 mm. *Zephyranthes filifolia* posee también floración estacional durante los meses de noviembre y diciembre. Ambas especies tienen una elevada tolerancia al déficit hídrico.

Por otra parte, se completó el protocolo de micropropagación para *H. tubispathus*, con una proporción de propagación superior a 1500 microbulbos por bulbo en un período de dos ciclos de multibrotación (c.a. 6 meses). El sustrato que produjo el mayor número de vástagos por explanto durante la multibrotación, fue el que contenía 1 mg L^{-1} TDZ + 1 mg L^{-1} 2iP + 50 mg L^{-1} AIA, obteniéndose una proporción de propagación de 10,8 para el primer subcultivo, y de 6,3 para el segundo. Para aumentar la biomasa total de los vástagos, las concentraciones óptimas de sacarosa se encuentran entre 60 y $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, con el agregado de AIA 1 mg L^{-1} , constituyéndose en un medio de cultivo apto para la fase de engorde de bulbos que reemplaza a la de enraizamiento de las especies no bulbosas.

Respecto a su biología floral, *H. tubispathus* genera un gran volumen de polen en sus flores solitarias, con un promedio de 93.837 granos por flor. El medio sólido que resultó ser el más apropiado para cuantificar la germinación *in vitro* de granos de polen fue el que contenía $0,1 \text{ M}$ de sacarosa y 2 mM de BO_3H_3 y de Cl_2Ca , obteniéndose valores superiores al 30 % de germinación. Y el medio líquido bajo técnica de gota suspendida que contenía 20 % PEG y $0,8 \text{ M}$ de sacarosa, logró valores de germinación mayores a 40 %. Los resultados confirman que el polen de esta especie se puede conservar en las condiciones evaluadas

con baja humedad relativa por no más de un mes. Además se determinó que *H. tubispathus* es una especie parcialmente auto-compatible y que posee preferencia por la polinización cruzada.

En cuanto al modo reproductivo, la especie presenta un desarrollo del saco embrionario apomíctico diplospórico, que corresponde con el tipo *Antennaria* octonucleado. Además, se diferenciaron morfológicamente dos citotipos con niveles de ploidía tetra y hexaploides; los cuales se caracterizaron citológicamente, hallando por primera vez para la especie dos pares de cromosomas del tipo subtlocéntricos.

La uniformidad genética de los individuos maternos y toda su progenie, evidenciada de forma morfológica y detectada mediante microsatélites (ISSR), mostró la naturaleza apomíctica de la planta materna. Esto fue confirmado mediante citometría de flujo en semillas, en los que el contenido de ADN en las células del embrión y del endosperma para ambos citotipos evidenció una relación 2:5. Esta relación se produce debido a la necesidad de fecundación de los núcleos polares que posee la especie para producir semilla, carácter conocido como pseudogamia.

SUMMARY

Promoting the use of native flora in landscaping projects, generates the possibility of raising awareness about the value of plant genetic resources of our country and the need to conserve them, thus allowing their rational and sustainable use, helping in their preservation. In this sense, *Habranthus tubispathus* is a species with great potential for domestication due to its great adaptability to the semi-arid zone and the great value it holds as a natural resource, not only for its ornamental value, but also for its medicinal properties and ecosystem services that provides.

In order to advance with the use of the species as a native ornamental resource and provide tools to promote its improvement, the following methodology was proposed: collection of wild germoplasm, ecophysiological studies, *in situ* evaluation and under controlled conditions of the behavior of two native species, determination of the best method for the regeneration and multiplication of materials, botanical and morphological study of floral biology; and study of the reproductive system.

The results indicated that under natural conditions, *Habranthus tubispathus* presents an autumn-winter vegetative stage (from March to October) followed by a reproductive period that goes from November to February, with synchronous and repeated flowering which occurs when the rains exceed 10 mm. *Zephyranthes filifolia* also has seasonal flowering during the months of November and December. Both species have a high water deficit tolerance.

On the other hand, I completed the micropropagation protocol for *H. tubispathus*, with a propagation rate greater than 1500 microbulbs per bulb in a period of two multibrotation cycles (a.c. 6 months). The substrate that produced the highest number of shoots per explant during multibrotation was the one that contained 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2iP + 50 mg L⁻¹ IAA, obtaining a propagation ratio of 10.8 for the first subculture, and 6.3 for the second one. To increase the total biomass of the shoots, the optimal concentrations of sucrose are between 60 and 90 g L⁻¹, with the addition of IAA 1 mg L⁻¹, constituting a culture medium suitable for the fattening phase of bulbs that replaces the rooting phase of non-bulb species

Regarding its floral biology, *H. tubispathus* generates a large volume of pollen in its solitary flowers, with an average of 93,837 grains per flower. The solid medium that turned out to be the most appropriate to quantify the *in vitro* germination of pollen grains was the one that contained 0.1 M sucrose and 2 mM BO₃H₃ and Cl₂Ca, obtaining values higher than 30 % germination. In addition, the liquid medium under the suspended drop technique contained 20 % PEG and 0.8 M sucrose, reached germination values greater than 40 %. The results confirm that the pollen of this species can be preserved with the evaluated conditions with low relative humidity for no more than a month. Furthermore, *H. tubispathus* is a partially self-compatible species and prefers cross-pollination.

Regarding the reproductive mode, the species has a diplosporic apomictic embryo sac development, which corresponds to the *Antennaria* octonucleated type. In addition, two cytotypes with levels of tetra and hexaploid ploidy were differentiated morphologically; which were characterized cytologically, finding for the first time two pairs of subtelocentric type chromosomes for the species.

The genetic uniformity of the maternal individuals and all their progeny, evidenced morphologically and detected by microsatellites (ISSR), showed the apomictic nature of the maternal plant. This was confirmed by flow cytometry in seeds, in which the content of DNA in the cells of the embryo and the endosperm for both cytotypes showed a 2:5 relationship. This relationship occurs due to the need for fertilization of the polar nuclei that the species possesses to produce seed, a character known as pseudogamy.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las geófitas, o plantas bulbosas como se las conoce vulgarmente, son plantas que tienen la capacidad de sobrevivir debajo de la superficie del suelo durante un período determinado, gracias a que poseen un sistema autónomo y altamente desarrollado para almacenar agua y nutrientes. El origen de las mismas según Bryan (1989, 1995, 2002), está distribuido en cuatro centros muy bien definidos, en los cuales se encuentra la mayoría de las especies geófitas ornamentales: (1) la cuenca mediterránea (Grecia, Italia, el norte de África, España y Turquía); (2) Asia (China, Japón y Rusia); 3) las regiones montañosas que se extienden desde Chile en América del Sur hasta el Estado de Washington en los Estados Unidos y Columbia Británica en Canadá; y (4) el sur de África en el que se ha encontrado el mayor número de géneros. Una gran diversidad de geófitas nativas también se pueden encontrar en la región florística irano-uraniana (Irán, Afganistán y Asia Central), y en las zonas subtropicales (Kamenetsky y Okubo, 2012).

A pesar de que los ancestros directos de las geófitas modernas son aún desconocidos, se propuso que su evolución fue dada principalmente en las zonas tropicales y subtropicales donde las precipitaciones son estacionales. La adaptación a diferentes ambientes debido a la extensión de su hábitat original o al cambio climático, dio lugar al desarrollo de nuevos caracteres morfológicos. Esta transición a hábitats xero-mesofíticos y mesofíticos se produjo de forma independiente en muchos grupos taxonómicos, lo que dio lugar a una gran diversidad de estructuras morfológicas geofíticas y ciclos de vida (Kamenetsky y Okubo, 2012).

En la naturaleza se encuentra una enorme cantidad de géneros y especies de bulbosas, los cuales proporcionan material para una amplia gama de usos, en especial como ornamentales. Esto es debido a la diversidad de colores, formas y tamaños que presentan sus flores y a la variedad de hábitats donde se desarrollan. Los principales usos como ornamentales son el paisajismo, en superficies ajardinadas y canteros florales; aunque también se cultivan en contenedores al aire libre y bajo techo, y como flores de corte para arreglos de interior (Brito, 2006). Además, las bulbosas presentan algunas ventajas, como por ejemplo que sus órganos de reserva y propagación son fáciles de almacenar y transportar, tienen un relativo bajo costo de producción y crecen rápidamente después de recibir las condiciones adecuadas en el momento correcto. Los órganos de almacenamiento de las especies geófitas permiten que la planta pueda sobrevivir a un período de condiciones ambientales adversas. A menudo, estos órganos subterráneos, pueden tener un requisito de latencia que debe ser superado mediante uno o varios períodos de almacenamiento a altas o bajas temperaturas, o bien una combinación de ambas. Muchas de las especies bulbosas también tienen requisitos medioambientales

específicos para inducción de la floración, su iniciación, maduración y elongación, y el crecimiento de las raíces y del follaje. Algunos ejemplos de bulbosas en los que los programas de propagación masiva y producción a gran escala son exitosos son los tulipanes, narcisos, jacintos y liliium (Hertogh, 1996).

Efectivamente, la industria de bulbos para flor a nivel mundial produce una amplia variedad de especies de alta calidad, que se encuentran adaptadas a muchas zonas climáticas. Éstas se comercializan principalmente como flores de corte, plantas con flores en macetas o plantas ornamentales para jardines. Hoy, la industria de bulbos se ha establecido firmemente en las zonas del mundo donde los productores pueden reproducir, por diversas prácticas culturales, las condiciones ambientales necesarias para la iniciación y el desarrollo de las flores. La producción de estas geófitas ornamentales se da principalmente en zonas templadas (Tabla I), siendo Holanda el principal productor. A pesar de que existen más de 800 géneros de especies ornamentales que se podrían producir para comercialización, el mercado está liderado por siete: *Tulipa*, *Lilium*, *Narcissus*, *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Crocus* e *Iris* (Tabla II) (Kamenetsky y Okubo, 2012). La demanda de los cultivos de bulbo es alta, y existe un gran potencial para una mayor producción y ventas (Johnson et al., 1995), por esto es fundamental la contribución de la investigación para generar soluciones innovadoras en la introducción, producción y comercialización de estos productos.

La estimación para principios del siglo XXI es que el valor global anual en la industria de bulbos para flor supera los US\$1.000 millones (Benschop et al., 2010). A nivel mundial los datos de producción estimados durante el período desde 1972 hasta 2005, sin lugar a dudas, subestimaron el número de hectáreas de producción (Tabla I). Holanda domina ampliamente la producción mundial de bulbos, especialmente tulipanes y lirios, que representan aproximadamente el 75 % de la producción total neerlandesa (Tabla II). Los datos demuestran que existen dos principales tendencias: 1) se produjo un crecimiento marcado en el mercado de bulbos para flor en el período comprendido entre 1972 y 1992, y 2) la producción global de bulbos no ha cambiado significativamente desde 1992 (Tabla I). A pesar que los cambios en la industria global han sido muy lentos durante las últimas décadas, la población mundial sigue en aumento, por lo que se deben planificar cambios para cubrir estas demandas (Kamenetsky y Okubo, 2012).

Es importante incrementar los conocimientos sobre las especies bulbosas con el fin de identificar y comprender los factores culturales en tantos géneros como sea posible; esto permitirá aumentar el número de especies que pueden ser económicamente productivas para el mercado ornamental. Sin embargo, para ser competitivas, sus cultivos deben ser ambientalmente sustentables y económicamente rentables, tener la capacidad de multiplicarse en una amplia variedad de suelos y condiciones climáticas, adaptarse a la

manipulación mecánica, ser resistentes a los períodos de sequía y otras adversidades, y tolerar un bajo a moderado estado nutricional (Paula, 2006).

Por otra parte, la explotación de las especies vegetales nativas en general y geófitas en particular, posee una gran importancia para la economía, generando divisas para los países productores. Además, la utilización de estas especies como ornamentales proporciona una gran oportunidad desde el punto de vista ambiental. Promover la utilización de la flora nativa en proyectos paisajísticos, genera la posibilidad de concientizar acerca del valor de los recursos genéticos vegetales en el país y de la necesidad de conservarlos, permitiendo así su explotación racional y sostenible, ayudando en su preservación (Flores, 2003). El desafío de desarrollar protocolos de producción bajo condiciones y secuencias agronómicas apropiadas y medioambientalmente responsables es determinante para obtener una rápida y eficiente producción de flores de alta calidad en forma sustentable.

Tabla I: Superficie cultivada con de bulbos para flor, reportada en 1972, 1992 y 2005.

País	Área reportada de Producción (Ha)		
	1972	1992	2005
Holanda	10.303	16.031	20.921
Reino Unido	6.016	4.300	4.660
Francia	70	1.285	1.289
China	—	—	1.281
Estados Unidos	2.196	4.449	995
Japón	1.469	1.622	883
Israel	10	427	456
Polonia	—	990	335
Nueva Zelanda	—	15	258
Canadá	202	400	—
Chile	—	—	240
Sudáfrica	—	425	200
Brasil	—	433	200
Otros	2.103	2.218	482
Total	22.369	32.595	32.200

Fuente: Kamenetsky y Okubo (2012). Adaptado de Rees, A. R. 1972. De Hertogh, A. y Le Nard, M. 1993.

Tabla II: Superficie cultivada con bulbos de flor en Holanda durante los períodos 2003/04, 2004/05 y 2007/08.

Taxa	Area de producción reportada (Ha)		
	2003–2004	2004–2005	2007–2008
Tulipa	10.982	10.034	9.885
Lilium	3.212	3.275	3.699
Narcissus	1.796	1.721	1.687
Gladiolus	1.151	1.060	1.019
Hyacinthus	1.121	1.140	854
Crocus	668	566	463
Iris (bulbos)	481	464	360
Total	19.411	18.260	17.967

Fuente: Kamenetsky y Okubo (2012). PT/BKD. 2008. Bloembollen, Voorjaarsbloeiers, beplante oppervlakten, seizoen 2007/2008.

Amaryllidaceae

Dentro de las bulbosas de mayor importancia a nivel mundial en paisajismo contemporáneo, se encuentra la familia de las Amaryllidaceae; la cual está compuesta por especies que poseen un gran valor ornamental, ya sea como flores de corte para arreglos o para cultivo en macetas, siendo también muy utilizadas para jardinería y paisajismo (Lorenzi y Souza, 1995). La misma comprende unos 72 géneros y alrededor de 1.450 especies, distribuidas desde áreas templadas hasta mayormente tropicales (Heywood 1993); con sus centros de origen en América del Sur (28 géneros, 385 especies), África del Sur (19 géneros) y el Mediterráneo (8 géneros) (Meerow y Snijman 1998). Para la República Argentina se han citado 9 géneros y cerca de 70 especies indígenas (Arroyo-Leuenberger, 1996; Hunziker y Arroyo, 1984; Ravenna, 1988, 1999; Roitman *et al.*, 2006).

Las Amaryllidaceae o Amarilidáceas, comprenden especies geófitas que poseen un bulbo tunicado constituido por catáfilas concéntricas, de protección en el exterior y de reserva en el interior, y un tallo comprimido llamado disco basal. La mayoría de los representantes de la familia presentan una ramificación simpodial (Müller-Doblies y Müller-Doblies, 1972, 1985, Müller-Doblies 1977 y Arroyo y Cutler, 1984), y cuando son observados en sección transversal, su forma es circular u ovalada, con ausencia de pelos o papilas. Se caracterizan por presentar hojas simples, alternas (espiraladas), lineares o lanceoladas, raramente cilíndricas. Las raíces se presentan de dos formas, contráctiles y perennes o temporarias y fibrosas, son adventicias y originadas a partir del disco basal del bulbo (Meerow y Snijman, 1998). La formación de raíces adventicias se produce durante el período de crecimiento, y son normalmente largas y ramificadas (Arroyo, 1981). El escapo floral es áfilo terminando en una umbela 1-∞flora, protegida por 2 o más brácteas libres o connatas en la base. Las flores pueden ser vistosas, de varios colores predominando el blanco, rosado, rojo o amarillo, y unas pocas especies presentan flores azules; son hermafroditas, hipógamas, actinomorfas o zigomorfas, campanuladas hasta infundibuliformes. Los estambres son 6, excepcionalmente 3 por reducción, con los filamentos filiformes parcialmente unidos con el perigonio, libres o parcialmente unidos entre sí, erguidos o declinados. El ovario gamocarpelar con nectarios septales, el estilo recto o inclinado con estigma capitado hasta marcadamente trifido. El fruto puede ser una cápsula dehiscente o baya globosa y las semillas planas, levemente cóncavas hasta globosas, oscuras (Daviña, 2001).

La clasificación taxonómica de las Amaryllidaceae es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flores)

Clase: Liliopsida (Monocodiledoneas)

Subclase: Liliidae

Orden: Liliales / Amaryllidales / Asparagales

Familia: Amaryllidaceae

En Argentina existen muchas especies bulbosas nativas pertenecientes a la familia Amarilidáceas que podrían ser una importante fuente de ingresos si se sometieran a procesos de mejoramiento. Entre éstas podemos mencionar a especies de los géneros *Hippeastrum*, *Habranthus*, *Rodophiala* y *Zephyranthes*, entre otros. Estas Amarilidáceas nativas tienen potencial para competir con bulbosas comerciales debido principalmente a su rusticidad y a la adaptación a las condiciones climáticas y edafológicas propias (Rosselló *et al.*, 2006). Además, las especies de esta familia poseen órganos de almacenamiento que facilitan la propagación vegetativa, y en la naturaleza tienen la capacidad de propagarse tanto de forma sexual, mediante semillas, como asexual, mediante la producción de clones vegetativos a partir de la división de sus bulbos (Leyton, 2004). Si bien en otros países se comercializan bulbos selectos de *Hippeastrum spp.*, *Habranthus spp.* y *Zephyranthes spp.*, en nuestro país no se han realizado programas de mejoramiento de las especies nativas hasta el momento, y solo se dispone de estudios genéticos preliminares sobre algunas especies (Cáceres *et al.*, 2001; Frayssinet y Cáceres, 2002; Sills *et al.*, 2002).

Descripción de las especies en estudio

Las especies estudiadas en el presente trabajo de tesis se ubican dentro de la tribu *Hippeastreae*, la cual está constituida por 11 géneros, que en su mayoría crecen en Sudamérica, extendiéndose hasta el sur de Norteamérica. Se caracterizan por poseer el escapo hueco, con un única flor en su extremo, el perigonio puede ser zigomorfo o actinomorfo, los estambres uni o biseriados con filamentos libres, declinados o no y la cápsula dehiscente con numerosas semillas planas (Daviña, 2001).

Morfológicamente el género *Habranthus* se caracteriza por poseer especies herbáceas con hojas anuales o perennes y lineares, que crecen desde un bulbo tunicado (Figura I-A y B). Presentan un escapo 1-floro hasta 5-floro, hueco y cilíndrico, las brácteas de la inflorescencia se encuentran unidas en la mitad inferior (Figura IV-B). Sus flores son zigomorfas, infundibulliformes, con tubo corto, seis tépalos elípticos u ovals de diversos colores (Figura II-A). Los seis estambres son fasciculados, diclino-ascendentes, en 4 compartimientos diferentes (Figura IV-C). El estigma es trífido. Las semillas presentan forma de D y son aladas (Figura IV-F) (Meerow y Snijman 1998).

En la descripción para los géneros *Habranthus* y *Zephyranthes* (Arroyo 1984), la inflorescencia es terminal y el número de nomofilos (hojas con vaina cerrada) por ramificación es variable según la especie, pero es constante para cada especie. Los cuatro géneros

estudiados por el autor (*Rhodophiala*, *Hippeastrum*, *Zephyranthes* y *Habranthus*), presentan bulbos con similar morfología, formando un grupo uniforme (Figura I-A y IV-A). Ambos géneros incluyen muchas especies distintas, y son comúnmente llamados 'rainlilies' o 'lirios de lluvia', debido a su hábito de floración episódica después de una lluvia estacional (Meerow *et al.*, 1999).

En general, las flores de *Zephyranthes* se desarrollan de manera solitaria, sin ramificaciones, con un único escapo y seis tépalos al final del pedúnculo (Figura IV-B). En *Z. filifolia* los tépalos son de color amarillo alimonado, y sus seis estambres se encuentran a la misma altura y por encima del estigma, mostrando evidencias de auto-compatibilidad (Figura II-C y IV-C). Esta disposición influye significativamente en la polinización en el medio silvestre, ya que generalmente en las flores con estigmas ocultos prevalece la autopolinización, a menos que la misma sea producida por vectores, como pueden ser los insectos. Esta disposición de los estambres asegura la autopolinización a menos que la corola con estambres unidos se extirpe antes de la liberación del polen cuando se poliniza a mano (Chowdhury y Hubstenberger, 2006).

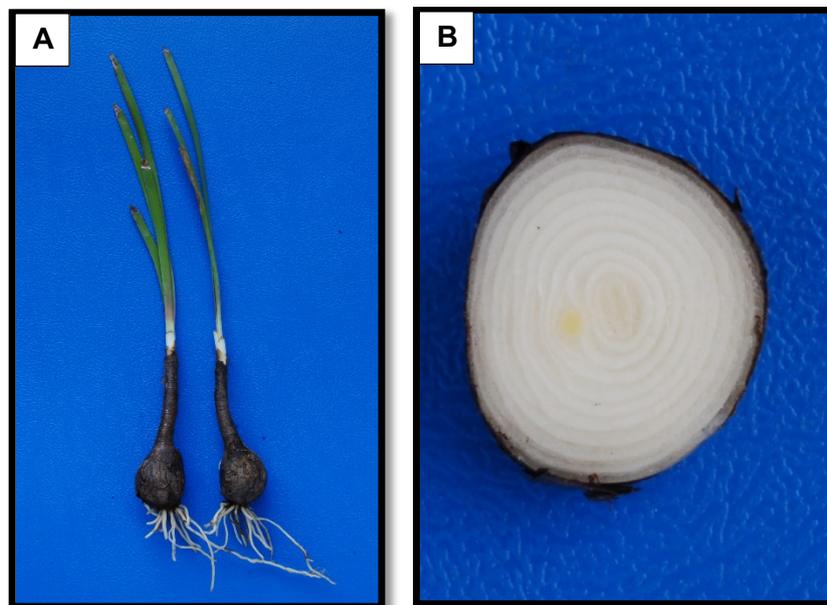


Figura I: A. Planta completa de *H. tubispathus*, con foliolos, bulbo y raíces. B. corte transversal del bulbo.



Figura II: Escapos florales *H. tubispathus*, **A.** color amarillo anaranjado y **B.** rosado, y **C.** *Z. filifolia*.

Las flores de *Habranthus tubispathus* presentan varios colores (Figura II-A), entre los que se encuentran blanco, rosado desde bien claro hasta más oscuro y amarillo anaranjado (a veces con nervaduras moradas). Las flores generalmente permanecen como embudo o como trompetas y no se abren por completo. Típicamente tienen 3 anteras más cercanas al estigma y 3 anteras más alejadas, todas se encuentran por debajo del estigma (Figura IV-C). Esto evidenciaría la prevalencia de una polinización cruzada para esta especie.

Los frutos que poseen ambas especies son cápsulas trilobuladas, con una doble hilera de semillas en forma de D en cada lóbulo, que generalmente se desarrollan rápidamente (Figura III y IV-E).

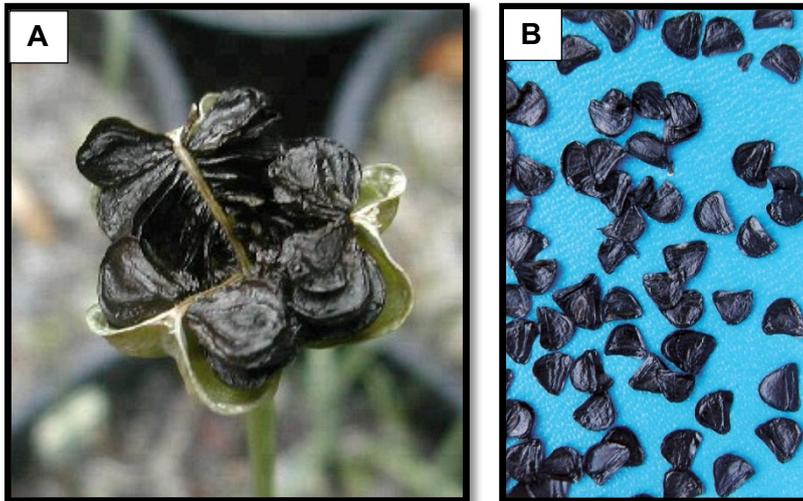


Figura III: **A.** Cápsula trilobulada dehiscente de *H. tubispathus*, **B.** semillas.

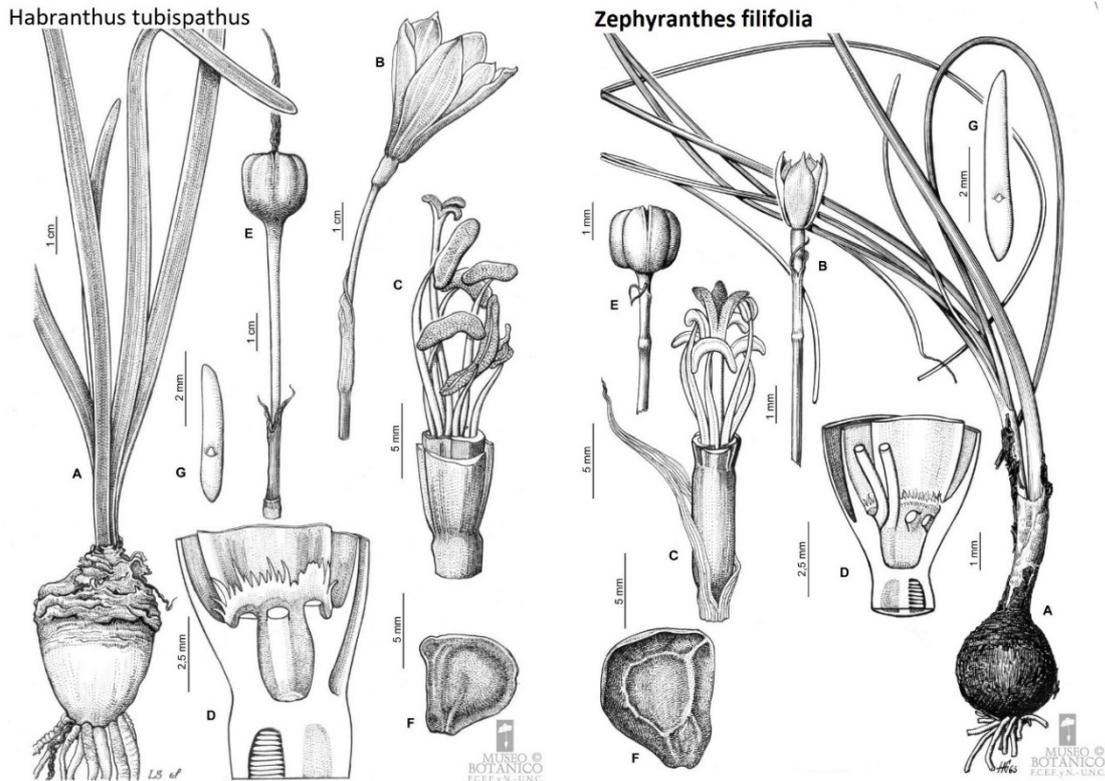


Figura IV: Ilustraciones botánicas de *H. tubispathus* y *Z. filifolia*, donde: **A.** planta, **B.** escapo floral, **C.** gineceo y androceo, **D.** base del pedúnculo, **E.** fruto y **F.** semilla.

El género *Habranthus*, con ca. 50 especies (Arroyo, 1990), posee distribución casi exclusiva en Sudamérica con pocos representantes en México y SO de Estados Unidos, y tiene la mayor concentración de especies en Argentina (ca. 33 especies, Arroyo-Leuenberger, 1996). Los problemas taxonómicos que presenta este género radican en el hecho de que es muy afín a *Zephyranthes*, encontrándose en ambos géneros especies difíciles de separar. En cuanto a el género *Zephyranthes*, agrupa aproximadamente a 50 especies nativas de América Tropical y Subtropical que habitan desde el SE de Estados Unidos de Norte América, incluido el Caribe y hasta la Patagonia (Meerow y Snijman, 1998). En Argentina habitan 11 especies (Arroyo-Leuenberger, 1996).

Los nombres de ambos géneros provienen del griego, para *Habranthus* "Habros" significa "gracia", y para *Zephyranthes* "Zephyros" significa "el viento del oeste"; en ambos casos "Anthos" se refiere a "flor". Los órganos geofíticos de estos géneros son bulbos perennes cubiertos por una túnica oscura, con raíces contráctiles, hojas caducas (basales y lineales de revestimiento), y de flores aisladas (Theron y De Hertogh, 2001). Estas especies poseen un bulbo tunicado, compuesto por bases de hojas expandidas que se disponen en capas sobre el tallo modificado. Las capas más antiguas se desintegran, formando la túnica que sirve para protección contra daños mecánicos y desecación del bulbo. La principal

función de los tejidos del bulbo es almacenar sustancias de reserva y agua para el crecimiento estacional, y de esta forma permitir la supervivencia de la especie.

Tanto *Zephyranthes* como *Habranthus*, son dos géneros muy utilizados como ornamentales, y a sus especies se las conoce tradicionalmente como “rain lilies” (o Lirios de lluvia por su traducción del inglés), dado que florecen de forma sincrónica y masiva en la época de lluvias, después de un período seco (Amaral, 2007). En el sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina), se caracterizan por florecer durante los meses de primavera y verano, de septiembre-octubre a febrero-marzo; siempre luego de una abundante lluvia. Sus flores suelen permanecer abiertas durante un corto período de tiempo, aproximadamente de 24 a 48 horas, para luego pasar a la formación del fruto.

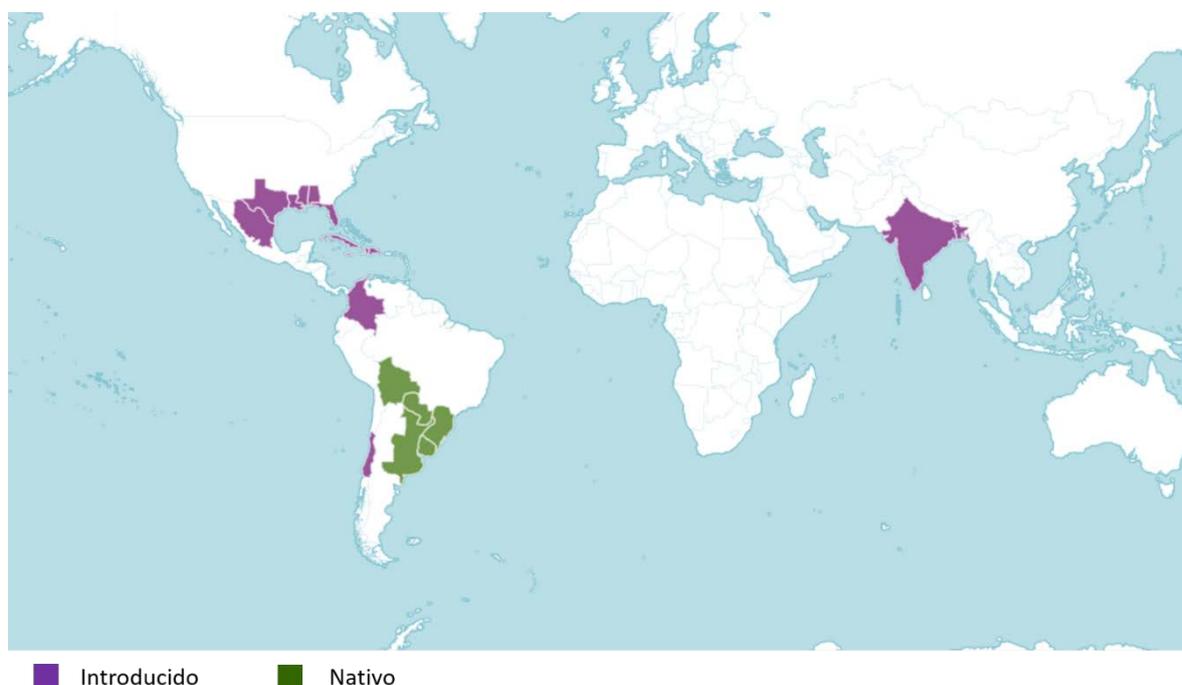
***Habranthus tubispathus* (L'Her.) Traub.**

La denominación de la especie *Habranthus tubispathus* tal como es aceptado actualmente, ha ido cambiando con el pasar del tiempo. Holmes y Wells (1980), en su descripción sobre la distribución de esta especie en América del sur y del norte, evidencia los diferentes nombres que esta especie fue adquiriendo. Si bien la especie tiene una amplia distribución en las regiones subhúmedas y semiáridas de Sudamérica, también se la encuentra naturalizada en estados Unidos de América en los estados de Texas y Louisiana. En los Estados Unidos fue designada por primera vez por William Herbert como *Zephyranthes texana*, quien un par de años después al proponer el género *Habranthus*, le otorgó el estatus varietal como *H. andersonianus* var. *texanus*. En 1840 que Ernst von Steudel reestablece a la variedad a un estado específico con el nombre de *H. texanus* que más tarde se denominó *H. atamasco*. En 1897 Edward Greene creó la combinación denominándola *Atamasco texana*. Cuando se realizó la comparación directa de las plantas de los Estados Unidos con las de América del Sur (parte del complejo *H. andersonii*) quedó evidenciado que no existen diferencias que justifiquen la retención de un estado específico para *H. texanus*. De hecho, tampoco se pudieron detectar y correlacionar diferencias con la geografía para dar una raza o variedad geográfica definida que valga la pena reconocer. Por lo tanto, el nombre *H. texanus* se basa únicamente en su distribución discontinua en lugar y no en una distinción morfológica real (Sealy, 1937; Alexander, 1939; Ravenna, 1970). Pierfelice Ravenna (1970) también demostró que el tipo de *H. andersonii* (del que *H. texanus* se considera aquí como sinónimo), es idéntico al tipo de *H. tubispathus* (L'Her. Traub), cuyo sinónimo es *Amaryllis tubispatha*. Por lo tanto, el nombre correcto para el único *Habranthus* natural, fuera del cultivo, en los Estados Unidos es *H. tubispathus*.

La distribución de la especie se encuentra principalmente representada en el continente Americano, aunque también ha sido introducida en India (Figura V). Esta especie

es nativa de Argentina, Uruguay, Brasil, Paraguay y Bolivia; y fue introducida en Chile, Colombia, Cuba, México y Estados Unidos.

Al evaluar las posibles vías de introducción de los sitios mencionados, Holmes y Wells (1980) concluyeron que los métodos naturales probablemente se pueden descartar, ya que la especie no posee mecanismos de dispersión de rango largo o moderado, ya sea por semilla u otra estructura vegetativa; siendo la actividad humana la que explicaría este hecho de mejor manera. Para el caso puntual de Texas, estos autores sugieren que fue introducida desde América del Sur, posiblemente a través de México. Una vez establecida en un sitio, fue llevada a otros asentamientos; y en condiciones favorables, escapó, se estableció, lo que aceleró aún más su propagación. Consideran a éstas condiciones como las únicas que explicarían la distribución actual en los Estados Unidos.



<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:116764-2#source-KBD>

Figura V: Distribución de *Habranthus tubispathus*, donde Nativo se refiere a los países donde esta especie se encuentra de forma nativa, e Introducido en aquellos en que fue incorporada por el hombre.

La domesticación es el proceso mediante el cual una especie silvestre se convierte en una planta manejada o cultivada por el hombre. Las principales vías por medio de las cuales se han originado y domesticado las especies cultivadas son las combinaciones de genes por medio de hibridaciones y las mutaciones; éstas últimas tanto en la estructura (deleciones, inversiones, translocaciones, etc.) como en el número de cromosomas (ploidía), ocurridas en forma natural y/o artificial (Gutiérrez *et al.*, 2003). *Habranthus tubispathus* se considera una especie con gran potencial de domesticación debido a su gran adaptabilidad a la zona

semiárida y al gran valor que posee como recurso natural, no solo por su valor ornamental, sino también por sus propiedades medicinales. En este sentido, esta especie fue estudiada por Cavallaro y colaboradores (2014), quienes lograron determinar la presencia de 9 alcaloides (maritidina, montanina, haemanthamina, tazettina, haemanthidina, lycorina, pseudolycorina, hippeastidina y 3-Odemethylhippeastidina). Además determinaron que dentro de este grupo, los niveles hallados en los bulbos de *H. tubispathus* de licorina e hippeastidina, los cuales son inhibidores moderados de la Acetilcolinesterasa (AChE) encargada de disminuir los efectos de la enfermedad de Alzheimer, podrían ser responsables de la inhibición significativa de AChE observada.

El proceso de domesticación posee muchas fases, que abarcan desde la selección y recolección de especies hasta la reproducción, el diseño de los sistemas de cultivo y la liberación en el mercado, pudiendo sufrir un mayor o menor proceso de mejoramiento (Anderson *et al.*, 2006). En principio, la metodología planteada para la domesticación y el comienzo del mejoramiento en *Habranthus tubispathus*, siguió el esquema propuesto por Seguel y colaboradores (2007) para murtila. El mismo consistió en el estudio y evaluación *in situ* de las especies endémicas, la colecta del germoplasma silvestre y la determinación del mejor método para la regeneración y multiplicación de los materiales, el estudio botánico y morfológico de la biología floral; y químico y molecular de su sistema reproductivo. Para finalizar con el proceso sería necesario, mediante un plan de mejoramiento, realizar la selección de materiales promisorios, la evaluación agronómica de los materiales seleccionados, el desarrollo de un paquete agronómico para el cultivo y la liberación de variedades que posibilite la producción comercial de esta bulbosa nativa (Figura VI).

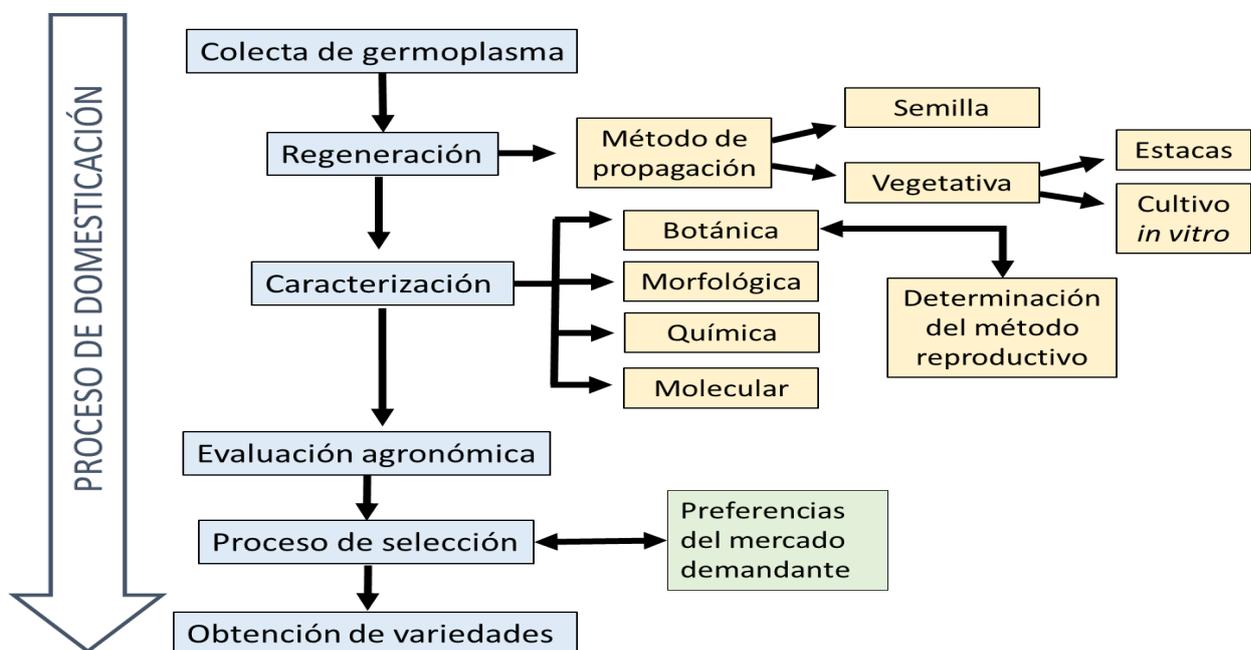


Figura VI: Esquema de domesticación propuesto para *Habranthus tubispathus* (adaptado de Seguel *et. al.*, 2007)

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: los estudios ecofisiológicos, biológicos, reproductivos y genéticos de la geófito nativa *Habranthus tubispathus* son un prerrequisito y permitirán sentar las bases para un plan para su domesticación y mejoramiento con fines ornamentales.

Así, el **objetivo general** de esta tesis es obtener información útil para la domesticación de *Habranthus tubispathus* que permita su uso paisajista y brindar herramientas para promover un mejoramiento de la especie, con el fin de avanzar en su utilización como recurso nativo ornamental.

En tanto que los objetivos particulares, derivados del anterior, son los siguientes:

- Realizar estudios ecofisiológicos de *Habranthus tubispathus* y, comparativamente de *Zephyranthes filifolia*, otra Amaryllidaceae nativa que comparte el hábitat, a fin de evaluar *in situ* y bajo condiciones controladas el comportamiento de ambas especies.
- Establecer las bases de un protocolo de cultivo *in vitro* para *Habranthus tubispathus* con el fin de utilizarlo para la multiplicación clonal de genotipos selectos y como herramienta para la aplicación de otras biotécnicas.
- Estudiar la biología floral y determinar el mejor método en la estimación de la viabilidad polínica de *H. tubispathus*, para poder evaluar su longevidad y conservación, para futuros trabajos de mejoramiento.
- Evaluación del modo reproductivo de *Habranthus tubispathus*, mediante estudios citológicos, embriológicos, fenotípicos y moleculares.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, E.J. 1939. *Habranthus andersonii*. Native of Texas, Argentina, Uruguay, and Chile. *Addisonia* 22: 45-46.
- Amaral, A.C. 2007. Amaryllidaceae Jaime St.- Hil.: levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil, e estudos de multiplicação *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília. 132p.
- Anderson, N.O., Gomez, N. y Galatowitsch, S.M. 2006. *Euphytica*. 148: 185. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-5936-6>
- Arroyo, S.C. 1981. Systematic, anatomical studies on Amaryllidaceae, including morphological cytological and phytogeographical considerations. PhD Thesis, Department of Botany, University of Reading, Reading
- Arroyo, S.C. y Cutler, D. F. 1984. Evolutionary and taxonomic aspects of the internal morphology in Amaryllidaceae from South America and Southern Africa. *Kew Bulletin* 39: 467-498.
- Arroyo, S.C. 1990. *Habranthus* (Amaryllidaceae) en Argentina y Uruguay. *Parodiana* 6: 11-30.
- Arroyo-Leuenberger, S. y Leuenberger, B. E. 1996. Type specimens of names in American Amaryllidaceae at the Berlin-Dahlem herbarium (B and B-W). *Willdenowia* 25:693—702.
- Benschop, M., Kamenetsky, R. Le Nard, M. Okubo, H. y De Hertogh, A. 2010. The global flower bulb industry: Production, utilization, research. *Hort. Rev.* 36:1–115.
- Brito, P. 2006. Morphological analysis of tropical bulbs and environmental effects on flowering and bulb development of *Habranthus robustus* and *Zephyranthes spp.* A thesis presented to the graduate school of the University of Florida for the degree of Master of Science.
- Bryan, J. E. 1989. Bulbs, volume I, A-H. Timber Press. Portland, Oregon.
- Bryan, J. E. 1995. Manual of Bulbs. Portland, OR: Timber Press.
- Bryan, J. E. 2002. Bulbs (Revised edition). Portland, OR: Timber Press.
- Cáceres, G., Sills, C., Basso, A. y Frayssinet, N. 2001. *Habranthus brachyandrus* y *H. martinezii*: Análisis cariotípico de muestras poblacionales nativas y de la progenie de cruzamientos interespecíficos. *Bol. Soc. Arg. Bot. (Suplemento)*: 103.
- Cavallaro, V., Alza, N.P., Murray, M.G. y Murray, A.P. 2014. Alkaloids from *Habranthus tubispathus* and *H. jamesonii*, two amaryllidaceae with acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition activity. *Natural product communications*, 9(2), 1934578X1400900206.
- Daviña, J.R. 2001. Estudios citogenéticos en algunos generos argentinos de Amaryllidaceae. Tesis, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- De Hertogh, A. y Le Nard, M. 1993. *The Physiology of Flower Bulbs*. Amsterdam: Elsevier.
- Flores, P.S. 2003. Propagação *in vitro* e *in vivo* de *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae).
- Frayssinet, N. y Cáceres, G. 2002. *Habranthus brachyandrus* y *H. martinezii*: híbridos interespecíficos. Libro de Resúmenes 1er Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales y 4ta Jornadas Nacionales de Floricultura: 15.
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J.L., y Rodríguez, B. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. e-Gnosis, (1).
- Hertogh, A.D. 1996. Holland bulb forcer's guide (No. Ed. 5). International Flower Bulb Centre and Dutch Bulb Exporters Association.
- Heywood, V.H. 1993. *Flowering Plants of the World*. Oxford University. New York.
- Holmes, W.C. y Wells, C.J., 1980. The distribution of *Habranthus tubispathus* (L'Her.) Traub in South America and North America—Texas and Louisiana. *SIDA, Contributions to Botany*, pp.328-333.
- Hunziker, A.T. y Arroyo, S. 1984. Amaryllidaceae. – Pp. 270-273 in: Hunziker A. T. (ed.), *Los géneros de fanerógamas de Argentina*. – *Bol. Soc. Argent. Bot.* 23.
- Johnson, D., Harwood, J. y Zepp, G. 1995. Bulbs, corms, tubers, rhizomes. Economic Research Service, USDA. Washington, DC.
- Kamenetsky, R. y Okubo, H. (Eds.). 2012. *Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production*. CRC press.
- Leyton, C.P.B. 2004. Estudios en micropropagación de *Rhodophiala phycelloides* (Herb.) Hunz. 74 f (Tese Magister). Departamento de Ciencias Vegetales, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Lorenzi, H. y Souza, H. M. 1995. *Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 736p.
- Meerow, A.W. y Snijman, D.A. 1998. Amaryllidaceae. Pp. 83–110 in *Families and genera of vascular plants, volume 3*, ed. K. Kubitzki. Berlin: Springer-Verlag.

- Müller-Doblies, D. 1977. Über den Geometrischen Zusammenhang der Monochasialen Verzweigungen am Beispiel Einiger Liliifloren. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 90:351-362.
- Müller-Doblies, D. y Müller-Doblies, U. 1972. *Galanthus* ist Doch Sympodial Gebaut. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 84: 665-682. Müller-Doblies D. y Müller-Doblies U. 1978. Bulbs and Morphology: *Urgenia*. Lagasalia 8: 13-23.
- Müller-Doblies, D. y Müller-Doblies, U. 1985. De Liliifloris Notulae 2. De Taxonomia Subtribus Strumariinae (Amaryllidaceae). Bot. Jahrb. Syst. 107: 17-47.
- Paula, C.B. 2006. Morphological Analysis of Tropical Bulbs and Environmental Effects on Flowering and Bulb Development of *Habranthus Robustus* and *Zephyranthes* (Doctoral dissertation, University of Florida).
- PT/BKD. 2008. Bloembollen, Voorjaarsbloeiërs, beplante oppervlakten, seizoen 2007/2008.
- Ravenna, P. 1970. Contribution of South American Amaryllidaceae III. Pl. Life 26. P 73-103.
- Ravenna, P. 1988. New or noteworthy species of *Alstroemeria*. Phytologia 64: 281-288.
- Ravenna, P. 1999. New species of *Zephyranthes* and *Habranthus* (Amaryllidaceae) I. Onira, v.3, n 16, p 52-61.
- Rees, A. R. 1972. The Growth of Bulbs. Applied Aspects of the Physiology of Ornamental Bulbous Crop Plants. London: Academic Press.
- Roitman, G., Maza, I. y Castillo, A. 2006. Presence of *Habranthus cardenasianus* (Amaryllidaceae) in Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 41: 95-98.
- Rosselló, F., Marinangeli, P., Rodrigo, J. y Curvetto, N. 2006. Inducción de callos y regeneración de plántulas de *Habranthus tubispathus* amarillo (Amaryllidaceae). XXVI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Chascomús. Octubre de 2006. Actas.
- Sealy, J.R. 1937. *Zephyranthes*, *Pyrolirion*, *Habranthus* and *Hippeastrum*. Journ. Royal Hort. Soc. 63: 195-209.
- Seguel, I., Montenegro, A., Torralbo, L., San Martín, J., Aguilera, A., Ellena, M., y Scheuermann, E. 2007. Valoración y utilización de un recurso genético nativo: Proceso de domesticación y desarrollo de la Murtilla (*Ugni molinae Turcz.*), una baya nativa del sur de Chile.
- Sills, C., Frayssinet, N. y Basso, A. 2002. Bando C en *Habranthus brachyandrus* y *H. martinezii*. Libro de Resúmenes 1er Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales y 4ta Jornadas Nacionales de Floricultura: 51.
- Steudel, E.V. 1840. Nomenclator Botanicus. Vol. 1. JG Cotta: Stuttgart & Tubingen, Germany.
- Theron, K.I. y De Hertogh, A.A. 2001. Amaryllidaceae: geophytic growth, development, and flowering. Hort. Rev., 25: 1-70.

1. CAPITULO 1 - Estudios Ecofisiológicos en *Habranthus tubispathus* y *Zephyranthes filifolia*

1.1 INTRODUCCION

1.1.1 Descripción climatológica de la región

La ciudad de Bahía Blanca, donde fue realizado el estudio de estas dos especies nativas, se encuentra ubicada al sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Desde el punto de vista climático (Donnari *et al.*, 1974), se encuentra en una zona de transición de dos masas de aire que presentan características termodinámicas diferentes. Una es de origen polar, marítima en sus comienzos, y pierde parte de su humedad al llegar al continente; la otra es tropical marítima, cálida y húmeda, derivada del anticiclón del Atlántico Sur. El clima es templado, con una temperatura media anual de 15,3 °C. Además, presenta una marcada estacionalidad térmica, siendo el invierno la estación más fría (7,7 °C), mientras que el verano la que presenta los máximos registros (23,6 °C) (Brendel, 2020).

La precipitación media anual es de 646 mm y presenta, al igual que la temperatura, una marcada estacionalidad. El verano es la estación más húmeda (200 mm), mientras que el invierno la más seca (100 mm) (Brendel, 2020). El 80 % de la precipitación que se produce en la región se debe a frentes fríos, y el 20 % restante a vuelcos de aire frío en altura que genera nubosidad y precipitación o a frentes calientes, en muy escasa proporción (Mormeneo, 2003). En general, los vientos son moderados y presentan una velocidad media anual de 20,8 km h⁻¹. El verano es la estación más ventosa (22,8 km/h), mientras que el otoño es la que presenta las menores velocidades del viento (9,7 km/h) (Brendel, 2020). La dirección de viento más frecuente es del NW y, además, es el de mayor velocidad media (26,6 km/h). Por otro lado, la dirección S es la que registra la menor frecuencia (Brendel, 2020). La humedad relativa promedio anual es del 63,7 % (Ferrelli, 2016).

Según el balance hídrico climático de Thornthwaite, el clima es subhúmedo seco, con nula o pequeño exceso de agua. Durante los meses de verano, se registra una marcada deficiencia hídrica, producto de las altas tasas de evapotranspiración.

A partir de marzo comienza el período de reposición de agua, situación que se extiende hasta el mes de octubre (Lageyre y Amiotti, 2005). Por lo tanto, la eficiencia en la utilización del agua es un punto clave en la selección de genotipos aptos para cultivo en zonas climáticas como la nuestra (Condon *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2013).

1.1.2 Adaptación de *Habranthus tubispathus* y *Zephyranthes filifolia* al clima local

Durante períodos de estrés ambiental, como las sequías y altas temperaturas de verano en la zona semiárida del SO de la Provincia de Buenos Aires, las plantas de *H.*

tubispathus y *Z. filifolia* pierden sus hojas y sobreviven mediante los órganos subterráneos. Luego rebrotan con nuevo follaje en la siguiente estación de crecimiento hacia fines de verano-inicios del otoño, permaneciendo con hojas hasta mediados-fines de primavera. Las inflorescencias se producen antes de la temporada de crecimiento vegetativo, una fenología que es constante para la mayoría de las especies de esta familia. El conocimiento y la comprensión de los procesos demográficos espacio-temporales en las poblaciones de plantas, resulta ser un aspecto crucial para la conservación y exploración de las especies endémicas de una región.

Aunque varias especies de la familia *Amaryllidaceae* han sido evaluadas por su valor medicinal, y en varias ha sido documentada la presencia de alcaloides (Kojima *et al.*, 1997), el principal interés en esta tesis es el potencial valor ornamental de las plantas debido a sus flores, y en particular en la forma y momento de aparición de las mismas. Con el fin de comprender este proceso, se realizaron tres estudios en los cuales se evaluaron aspectos de la fisiología y comportamiento de ambas especies respecto a la foliación y floración, en respuesta a factores ambientales.

En general, los factores ambientales más importantes que se encuentran involucrados en favorecer al proceso de floración son la temperatura, la precipitación y el fotoperiodo. Su variación generala ruptura de la dormancia de las yemas florales (Damián-domínguez *et al.*, 2009).

Según Gentry (1974), existen en la naturaleza cuatro tipos de estrategias o patrones fenológicos de floración: (1) *Estado estable*, en el que una planta produce pocas flores cada día, sobre un largo periodo de tiempo; (2) *Cornucopia*, en el que las plantas producen un gran número de flores con un tiempo de vida de varias semanas; (3) *Estrategia "big bang" o floración masiva*, que muestra una alta sincronización en la producción de flores a nivel individual y poblacional, con periodos de floración muy cortos cada año; y (4) *Floración múltiple*, que hace alusión a numerosos periodos de floración cortos, distribuidos a lo largo del año.

Las especies que fueron estudiadas en el presente trabajo presentan una floración masiva, que se produce en los meses estivales y que se encuentra fuertemente condicionada por las precipitaciones. Si bien ésta última es una característica ampliamente difundida entre las Amarilidáceas, es muy poca la información disponible hasta el momento respecto a cómo la frecuencia e intensidad de lluvia/irrigación afecta la floración en los géneros *Habranthus* y *Zephyranthes*, y tanto la fenología reproductiva como vegetativa, aún no han sido descritas. Por lo tanto, el objetivo principal de este capítulo fue realizar un estudio detallado de la producción de flores y hojas en condiciones *in situ* y controladas de invernáculo, para *Habranthus tubispathus* y *Zephyranthes filifolia*, a fin de describir las fenofases florales y foliares, realizando una comparación entre ambas especies y

evidenciando el estrecho vínculo que existe entre factores climáticos y su comportamiento fenológico.

Por otra parte, se determinó la frecuencia óptima de riego para lograr un período de floración lo más prolongado posible, y con el mayor número de flores por bulbo. Por último, se estableció el efecto que ejerce la temperatura sobre la floración en *H. tubispathus*. Los resultados encontrados en este capítulo permitirán analizar la factibilidad de realizar una domesticación de *H. tubispathus* y *Z. filifolia* para uso directo, o bien para asistir a un proceso de mejoramiento por selección, y lograr el uso ornamental de estas especies.

1.2 MATERIALES Y METODOS

1.2.1 Estudios *in situ* de *Habranthus tubispathus* y *Zephyranthes filifolia*

Para este estudio se delimitaron dos sitios ubicados dentro de una población natural ubicada en el predio perteneciente al CONICET Bahía Blanca, que poseen características diferentes y que nos permitirían evidenciar comportamientos distintos en cada una de las especies (Figura 1.1). Si bien ambos sitios se encuentran bajo las mismas condiciones climáticas, debido a la proximidad que existe entre ellos (c.a. 150 metros), los mismos presentan una diferencia edáfica bien marcada. El sitio o clausura I (S1) (38°39'56.66"S – 62°14'0.31"W) posee un perfil edáfico de muy poca profundidad (menor a 30 cm), con tosca aflorando en superficie, identificándose dentro de la taxa de Calciustoles Petrocálcicos, con textura franca gruesa, y clasificación de mixto térmico. En general, los suelos de esta área están subyacidos por una capa denominada "capa de tosca en plancha", el cual corresponde a un horizonte petrocálcico, y que actúa limitando la profundidad efectiva. Esta capa se encuentra cementada por CaCO₃, y conforma una paleosuperficie ondulada que quedó expuesta luego de más de un ciclo erosivo (Lageyre y Amiotti, 2005). Por otra parte, el sitio o Clausura II (S2) (38°40'2.82"S – 62°14'1.31"W), no posee limitaciones físicas en cuanto a profundidad de suelo, identificado como Paleustol Petrocálcico, también de textura franca gruesa y mixto grueso, su espesor es mayor a 60 cm de profundidad.

En el primer ciclo estival del estudio se individualizaron al azar y en cada una de las parcelas, 25 plantas de cada especie, *Habranthus tubispathus* (H.t.) y *Zephyranthes filifolia* (Z.f.), al momento de su floración, mediante caravanas plásticas numeradas y estaqueadas al suelo. El principal objetivo fue asegurar la identidad y edad fenológica de cada individuo en estudio, asegurando que sea lo suficientemente adulta como para florecer y fructificar. Se tomaron registros semanales de número de hojas, flores y frutos durante cuatro años (noviembre de 2008-2012).

Una vez recolectada la totalidad de datos fenológicos, se analizaron las relaciones entre variables meteorológicas y fenológicas de las dos especies en estudio, expuestas a

condiciones ambientales naturales. Como variables meteorológicas se consideraron valores diarios de temperatura a 1,5 m, precipitación y precipitación acumulada a 1, 2, 3, 4 y 5 días previos a la floración y fotoperiodo. Los datos meteorológicos fueron registrados por una estación automática Davis Vantage Pro (Davis Instruments, CA, USA), ubicada en un sector cercano a las clausuras (Figura 1.1) y perteneciente al Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CONICET-UNS).

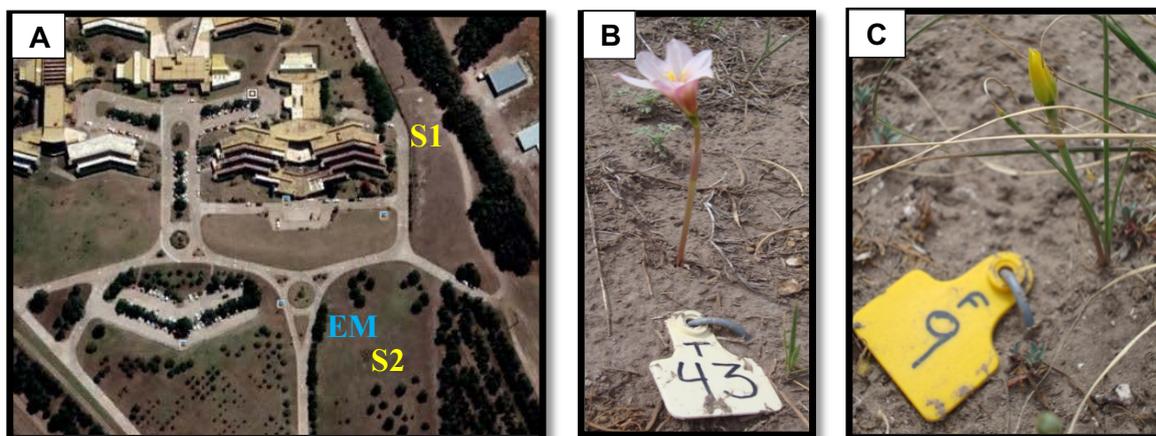


Figura 1.1: A. Ubicación de las clausuras en el predio del CONICET Bahía Blanca ($38^{\circ}39'59.47''S$ - $62^{\circ}14'5.62''W$), para los sitios S1 y S2; donde EM se refiere al lugar donde se encuentra la estación meteorológica. B. Planta de *H. tubispathus* identificada mediante caravana blanca. C. Planta de *Z. filifolia* identificada mediante caravana amarilla.

1.2.2 Respuesta al régimen hídrico

Durante la floración estival de 2007, se recolectaron 100 bulbos de cada especie de una población natural situada en Bahía Blanca ($38^{\circ}42' S$, $62^{\circ}16' W$). Los bulbos se trasplantaron a contenedores con sustrato comercial GrowMix (Terrafertil), cultivándolos en condiciones controladas en invernáculo con fotoperíodo natural y temperatura máxima de $35^{\circ}C$ y mínima de $14^{\circ}C$ con riego y fertilización periódicos. Luego de un año, se separaron en grupos de 25 individuos de tamaño uniforme para poder aplicarles un manejo diferenciado a cada grupo. Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1) riego semanal,
- 2) riego cada 15 días,
- 3) riego mensual, y
- 4) sin riego excepto en el período de floración que recibieron un riego semanal.

Al comienzo del ensayo (primera semana de noviembre de 2008), se realizó un riego de iniciación de todas las plantas junto con una aplicación de fertilizante soluble Zafiro multiestadio (N 19 % - P 19 % - K 19 - S 2,2 % - B 200 ppm - Cu 150 ppm - Fe 200 ppm - Mn

100 ppm - Zn 100 ppm), en una dosis de 0,75 g L⁻¹ de agua de riego. Durante el ensayo se aplicó 1 ml L⁻¹ del acaricida Abamec (Abamectina 8,4 % p/v concentrado emulsionable) para control de arañuela roja (*Tetranychus urticae*) en agosto de 2009, octubre 2010 y julio de 2011. También fue necesario realizar dos aplicaciones de 0,5 ml L⁻¹ de Confidor (Imidacloprid 35 % suspensión concentrada), en diciembre de 2010 y en agosto de 2011, para controlar la aparición de brotes de cochinilla algodonosa (*Planococcus citri*).

Como se observa en la Figura 1.2, el ensayo se mantuvo bajo invernáculo durante 186 semanas, y se realizó un registro semanal del número de hojas y flores para ambas especies. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante análisis de la varianza de factores fijos (ANOVA Doble), siguiendo un diseño completamente aleatorizado y balanceado, y mediante un test de comparación de medias de LSD Fisher. Todos los análisis y tablas de resultados que se exponen en el presente trabajo fueron realizados utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2011 y actualizado en 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2011). Las evaluaciones se llevaron a cabo dentro de cada especie, para cada parámetro analizado y tratamiento, y entre las especies estudiadas. Esto último con el fin de evaluar si ambas presentan una respuesta similar al estrés hídrico.

Se determinaron los meses del año en los cuales se producen la fase reproductiva y la vegetativa para cada especie, para luego cuantificar en la primera fase el número total de flores y en la segunda el número máximo de hojas producidas. La fase reproductiva de H.t. sucede desde noviembre hasta marzo, y para Z.f. la misma abarca desde septiembre hasta febrero. En cuanto a la fase vegetativa, en H.t. ocurre desde abril hasta octubre, y en Z.f. desde marzo hasta agosto. La nomenclatura utilizada para determinar y evaluar cada estadio fenológico fue acompañada de R en caso de reproductivo y V en caso de vegetativo, seguido del año de evaluación. Por ejemplo, para la evaluación de noviembre a marzo de 2008 en H.t., el estadio determinado fue R08; y para la misma especie de abril a octubre de 2009, la nomenclatura utilizada fue V09. En ambas fases (V o R), fueron cuantificados la totalidad de flores producidas y el número máximo de hojas, para cada período.





Figura 1.2: Efecto en la producción de hojas para los 4 tratamientos evaluados en: **A.** *H. tubispathus*. **B.** *Z. filifolia*.

1.2.3 Efecto de la temperatura sobre la floración y desarrollo de *H. tubispathus*

Se recolectaron 80 bulbos de una población natural situada en Bahía Blanca (38°42' S, 62°16' W) y se trasplantaron a contenedores con suelo del sitio. Luego se distribuyeron al azar en dos cámaras de cultivo para aplicar los distintos tratamientos de temperatura, y manteniendo estables e iguales el resto de las condiciones ambientales, como el fotoperiodo y el riego aplicado. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Cámara A (CA), se mantuvo una temperatura diaria que oscilaba entre 25 °C de máxima y 17 °C de mínima ± 1 °C, y en la
- Cámara B (CB) a una temperatura máxima de 38 °C y mínima 22 ± 2 °C.

Estas temperaturas fueron seleccionadas a partir de las máximas y mínimas diurnas y nocturnas ocurridas en la región, y observadas durante los períodos previos de ensayos a campo. Además, en ambas cámaras se estableció un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad, humedad relativa de 60 % y riego cada 15 días. Estas condiciones se mantuvieron durante 14 semanas coincidiendo con el desarrollo de la floración para la especie. Durante ese período se registró semanalmente el número de hojas y flores. Una vez finalizado el período de evaluación, se registró el número de hojas y el peso fresco (PF) y seco (PS) por separado de las raíces, hojas y bulbos, mediante una termobalanza Sartorius (Modelo MA35). Los datos se analizaron con la prueba t del test de comparación de medias.

La cuantificación de hojas fue realizada únicamente cuando las mismas se encontraban completamente expandidas, y de la de flores cuando se encontraban abiertas, es decir en la fenofase de flor madura. Esta metodología fue aplicada a la totalidad de los ensayos realizados en este estudio.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Estudios *in situ* de *Habranthus tubispathus* y *Zephyranthes filifolia*

Se encontró que las estructuras reproductivas de H.t. atraviesan nueve fenofases (Figura 1.3): (a) *brote*, se visibilizan sólo dos brácteas que cubren el botón; (b) *botón joven*, en el que sus tépalos tienen tintes morados a verdosos, dependiendo del color de flor

evaluado; (c) *botón maduro*, cuando los tépalos son de color amarillo, rosado o blanco, dependiendo del color de flor del individuo; (d) *flor joven*, la flor se encuentra semiabierta con sus anteras cerradas; (e) *flor madura*, la flor se encuentra en antesis, con polen visible en las anteras; (f) *flor senil*, que ocurre cuando la flor adquiere tintes morados o rosados en la punta de los tépalos; (g) *fruto temprano*, es el fruto en el que no se distinguen los tres lóbulos de la cápsula; (h) *fruto joven*, se distingue cuando se diferencian los tres lóbulos y termina cuando el fruto se torna color amarronado; e (i) fruto maduro, en el que la cápsula se abre y dispersa las semillas. Este proceso fue similar al descrito por Damián-Domínguez *et al.* (2009) para *Habranthus concolor*. Cabe destacar que la fase donde la flor luce más atractiva es la e, flor madura, que solo dura un día y comienza por la mañana con la antesis y finaliza por la tarde con el pasaje al estadio f, flor senil. Así el efecto ornamental de esta especie no radica en cada flor individual, sino en la floración masiva y sincronizada de las densas colonias de plantas que se suelen presentar (Figura 1.4).

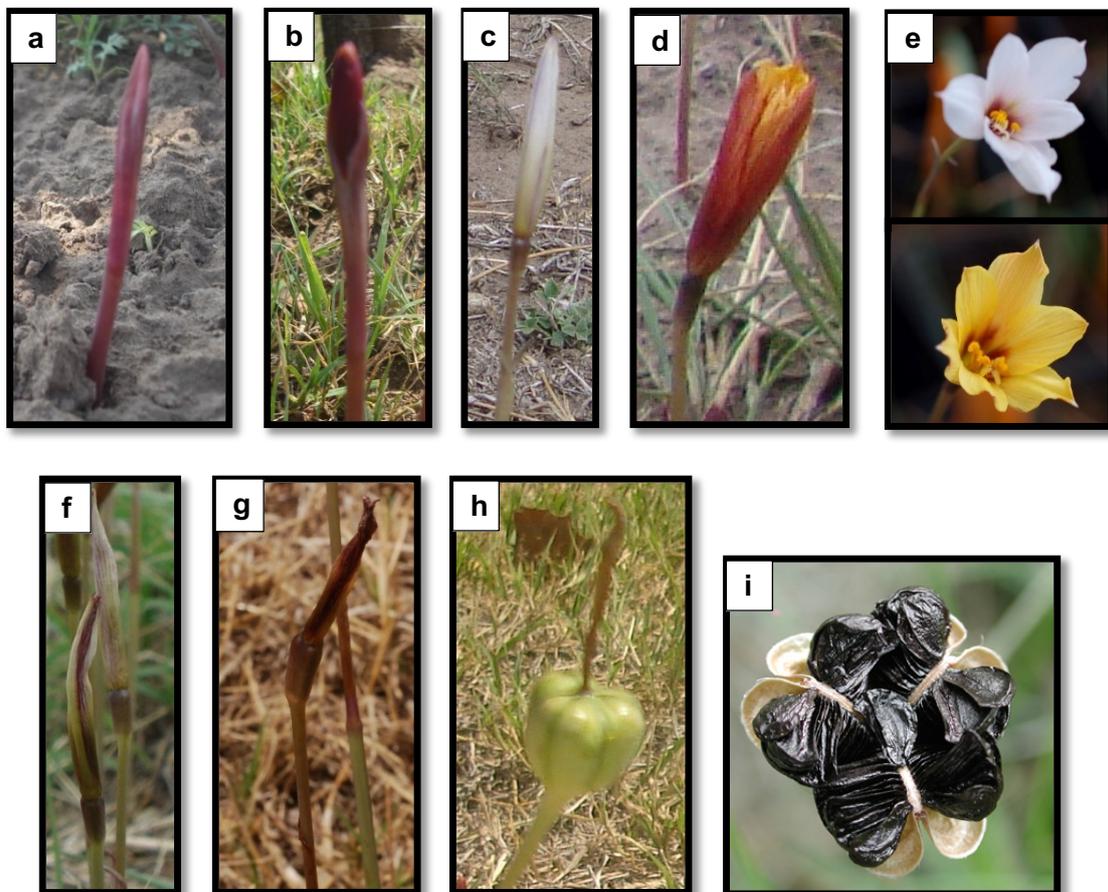


Figura 1.3: Fenofases de las estructuras reproductivas de *H. tubispathus*. a) Brote, b) botón joven, c) botón maduro, d) flor joven, e) flor madura, f) flor senil, g) fruto temprano, h) fruto joven e i) fruto maduro.



Figura 1.4: Floración de *Habranthus tubispatus* en la población de estudio de CERZOS.

Para Z.f. el desarrollo de las estructuras florales siguen el mismo proceso, atravesando las nueve fenofases descritas anteriormente, con la principal diferencia que las mismas no presentan variación en el color de sus tépalos, únicamente se presentan en un tono amarillo alimonado y en senescencia con un color rosado en sus puntas (Figura 1.5). Al igual que en H.t., cada flor de Z.f. permanece abierta solo un día.



Figura 1.5: Fenofases diferenciales e) y f) para *Zephyranthes filifolia*.

Respecto del estudio de las especies *in situ*, H.t. posee un comportamiento fenológico estacional y espacial bien marcado (Figuras 1.6 y 1.7). La floración se produce en pulsos o flashes sincronizados principalmente en los meses de noviembre y diciembre, pudiéndose observar también algunos pulsos en enero y febrero, como ocurrió en el período 2010/11.

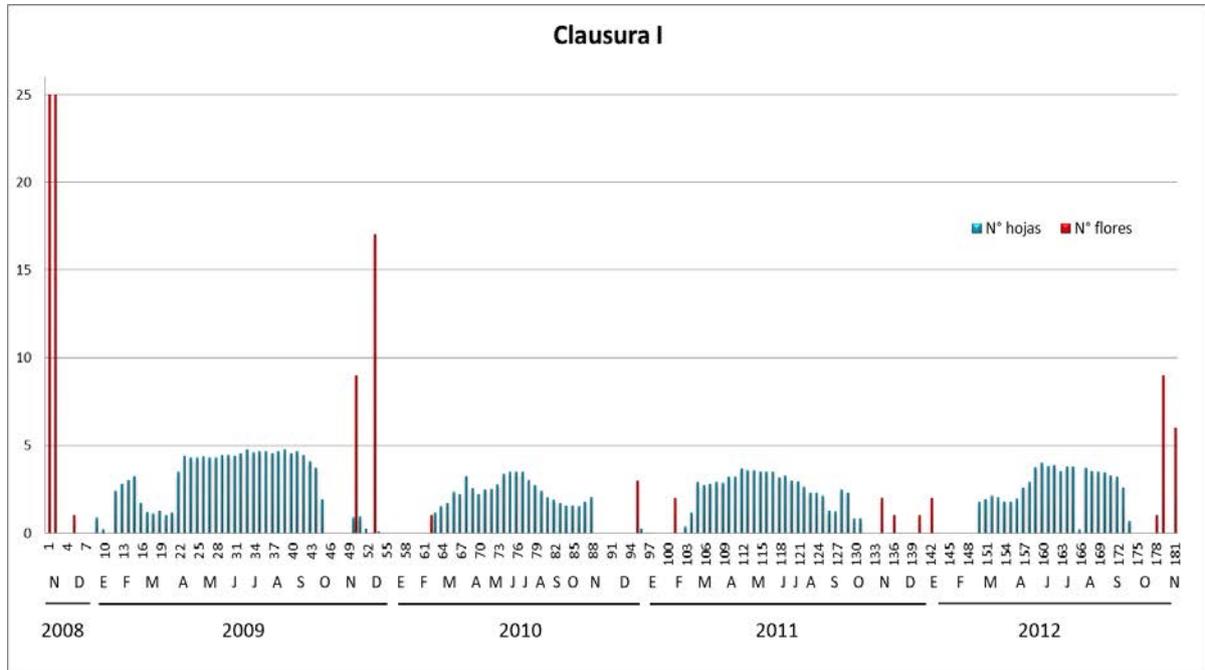


Figura 1.6: Número de hojas promedio y flores totales producidos semanalmente en las 25 plantas estudiadas de *H. tubispathus*, en la Clausura I.

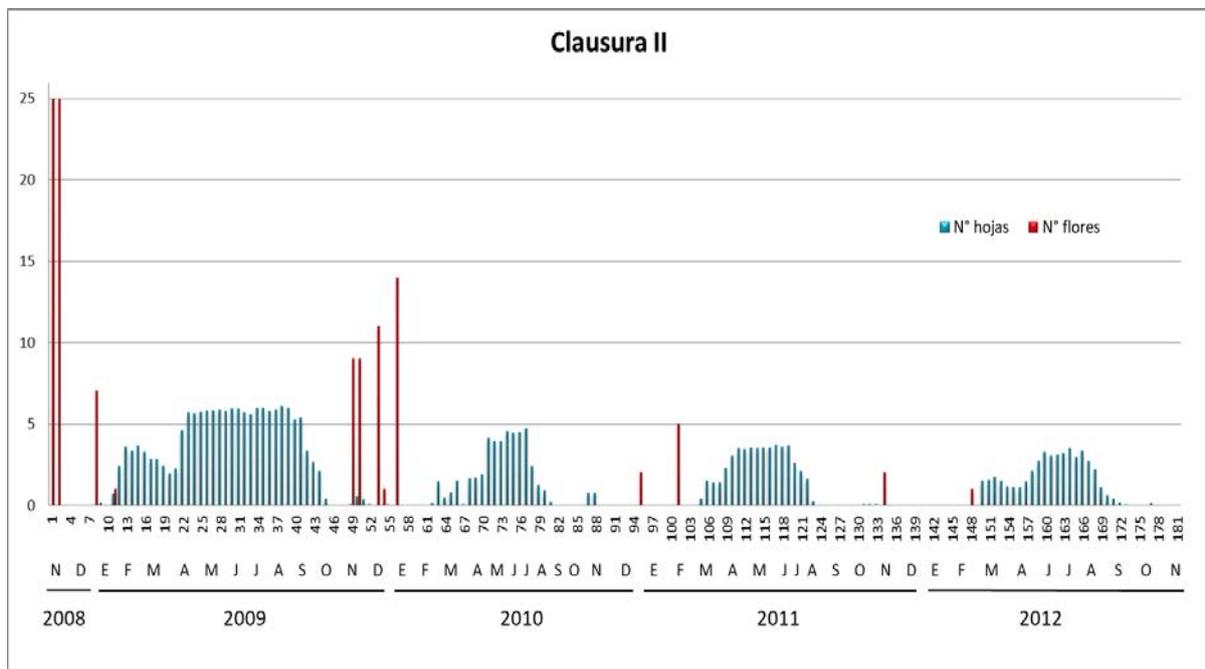


Figura 1.7: Número de hojas promedio y flores totales producidos semanalmente en las 25 plantas estudiadas de *H. tubispathus*, en la Clausura II.

La principal razón que explica este fenómeno ocurrido en ambas clausuras, es el marcado déficit hídrico (55 mm menos respecto de la media) que se produjo durante noviembre de 2010 (Figura 1.10), evidenciando solo escasas lluvias (menores a 10 mm) que no fueron suficientes para desencadenar el fenómeno de la floración. Una vez que el período reproductivo finaliza, comienza el período vegetativo en esta especie, pudiendo dejar el suelo descubierto durante algunas semanas entre la dehiscencia de los frutos y la aparición de las hojas. El mismo se produce entre los meses de febrero y octubre, proporcionando de esta forma la posibilidad de producir y almacenar sustancias de reserva en sus bulbos. En el período evaluado, desde marzo de 2010 a noviembre de 2012, se observó una marcada disminución en la producción de hojas, seguido de una disminución en la producción de flores respecto de 2009, debido principalmente al aumento del déficit hídrico producido especialmente durante esos años (Figura 1.10). Asimismo, este comportamiento fue más marcado en la Clausura II, dado que la misma presenta mayor competencia entre especies por mayor densidad de plantas y diversidad de especies (datos no mostrados), posiblemente por no presentar restricción en profundidad y mayor disponibilidad hídrica (Figura 1.7). Por lo tanto, en estos ensayos quedó evidenciado que H.t. logró recuperar en parte su capacidad reproductiva en aquel ambiente donde la competencia fue menor (Figura 1.6), a pesar de que la profundidad edáfica también fuera menor. Es decir que esta especie se ve más afectada por la competencia inter-especie que por la limitante edáfica.

Cuando se observa el comportamiento fenológico que evidenció Z.f. (Figura 1.8 y 1.9), para el mismo período de tiempo y bajo las mismas condiciones meteorológicas y de sitio, se encontraron algunas similitudes respecto a H.t., como la floración estival y estacional durante los meses de noviembre y diciembre principalmente. Aunque también se registraron diferencias, como por ejemplo, la floración más concentrada en noviembre y la producción de hojas, la cual se mantiene bastante estable a lo largo del año. Por lo tanto, posee períodos en los que se produce la floración y la planta aún se encuentra con hojas. La floración en esta especie también se ve fuertemente reducida, a medida que se acumulan los períodos de gran sequía que, como fue mencionado previamente, ocurrieron especialmente en los últimos tres años evaluados. Del mismo modo que para H.t., la Clausura II se vio más afectada que la I en cuanto a producción de hojas, pero mayoritariamente en cuanto a la floración. Ésta última fue casi nula durante los períodos de 2010/11, 2011/12 y la parte del período evaluado durante finales de 2012. Esto indicaría que Z.f. es más susceptible que H.t. a la competencia sumada al estrés hídrico. Por otra parte, se observó la gran tolerancia a la sequía y a la presencia de un perfil edáfico reducido que también posee Z.f.

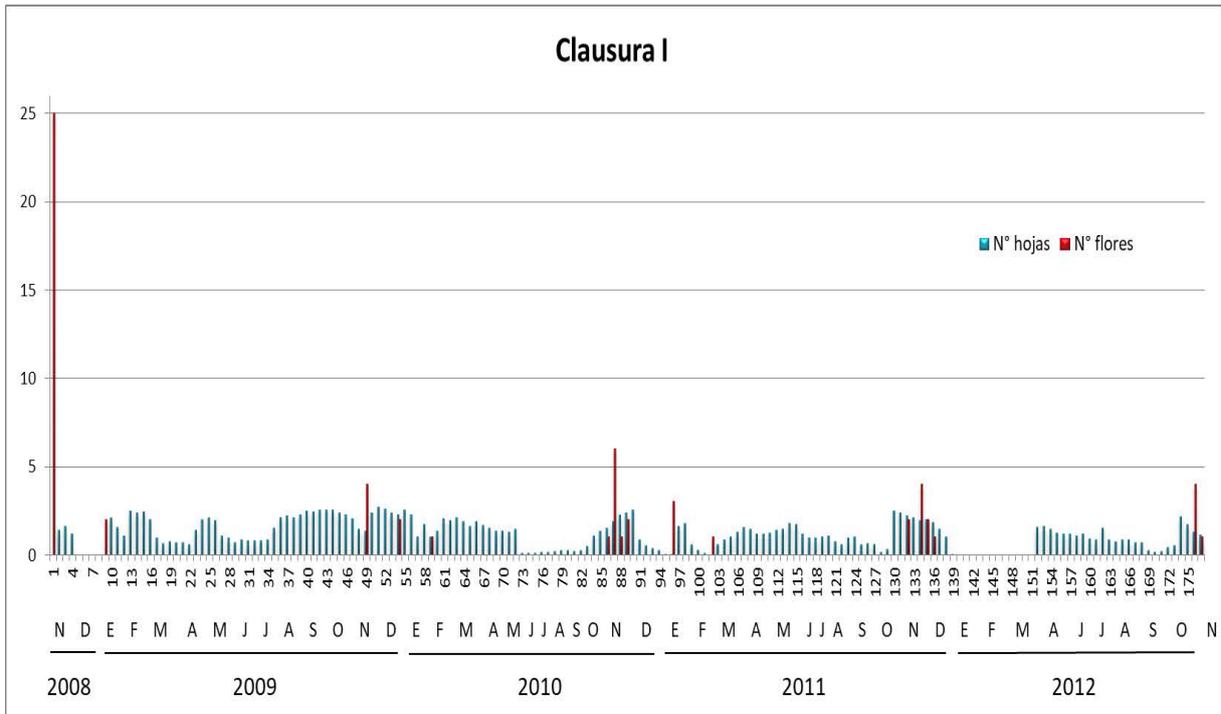


Figura 1.8: Número de hojas y flores producidos semanalmente en las 25 plantas estudiadas de *Z. filifolia*, en la Clausura I.

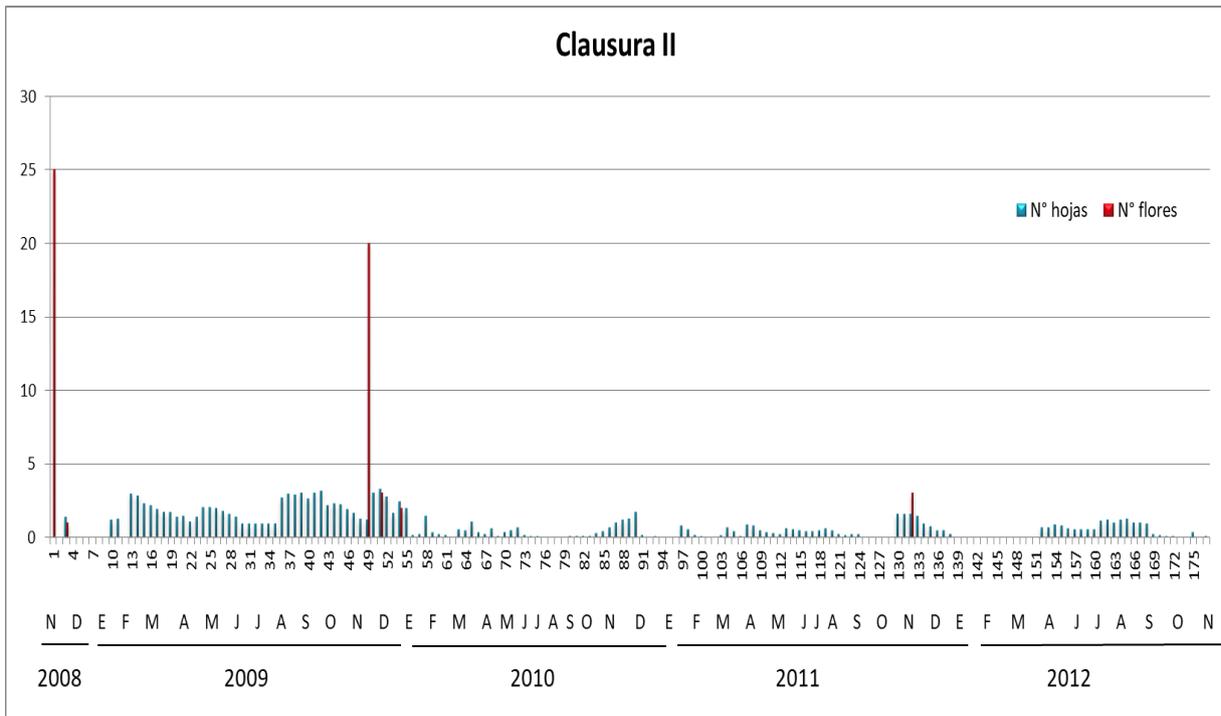


Figura 1.9: Número de hojas y flores producidos semanalmente en las 25 plantas estudiadas de *Z. filifolia*, en la Clausura II.

Los períodos secos y su gran variabilidad afectan negativamente la acumulación de reservas en distinto grado dependiendo de la especie, disminuyendo como consecuencia los procesos de floración y fructificación. Como se observa en la Figura 1.10, 32 de los 48 meses

en los que se llevó a cabo esta evaluación, presentaron una precipitación media por debajo del umbral histórico para la zona. Es decir que el 67 % del tiempo en el que se llevó a cabo el ensayo, presentó anomalías negativas de precipitación, generando como resultado períodos de sequía, los cuales fueron acompañados por temperaturas (Figura 1.11) más altas que la media histórica, incrementando de esta forma la evapotranspiración y produciendo períodos de gran estrés hídrico.

En el gráfico de la Figura 1.10 también se puede observar que cada vez que la precipitación estuvo por encima de la media histórica durante los períodos estivales evaluados, coincidió con un pulso de floración de ambas especies. En el caso de Z.f. el mismo fue, en casi todas las observaciones, previo al de H.t.; mostrando de esta forma un comportamiento similar entre ambas especies, y diferencial en cuanto al momento y respuesta de la floración.

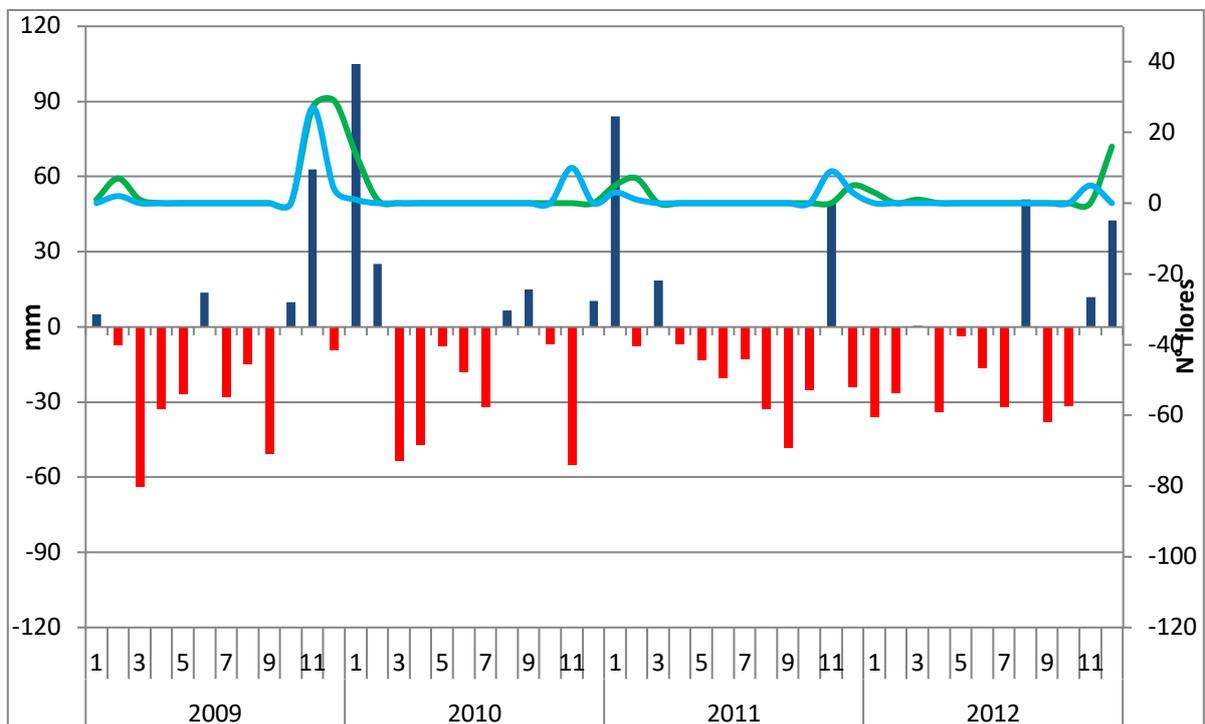


Figura 1.10: Anomalías positivas ■ y negativas ■ de precipitación mensual (mm), y número de flores acumulada para ambas clausuras de *Habranthus tubispathus* (H.t.) — y de *Zephyranthes filifolia* (Z.f.) — durante el periodo 2009-2012.

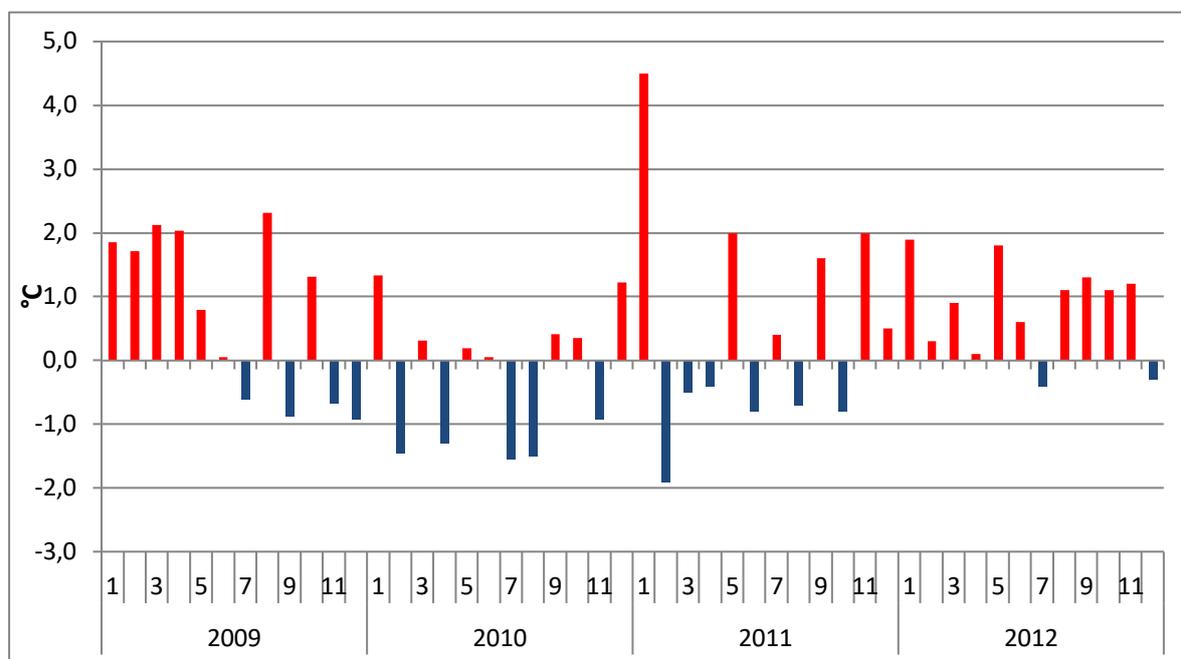


Figura 1.11: Anomalías positivas ■ y negativas ■ de temperatura mensual (°C), durante el periodo 2009-2012.

Tal y como fue observado para otra Amarilidácea, *Ismene amancaes*, el éxito reproductivo en su etapa inicial es dependiente de los fotoasimilados acumulados como biomasa del bulbo en el periodo previo a la floración (Suni *et al.*, 2011). Esta podría ser la principal razón de la merma en la floración producida tanto para H.t. como para Z.f. en los periodos 2010/11, 2011/12 y finales del 2012; los cuales presentaron una menor producción de biomasa durante el período otoño-invernal, generando por consiguiente una menor acumulación de reservas en sus bulbos. El desarrollo foliar de ambas especies presenta una relación directa con el contenido de humedad edáfica, al igual que ocurre en *Ismene amancaes* (Suni *et al.*, 2011).

De la experiencia se destaca que cada floración de H.t. está fuertemente relacionada con la precipitación acumulada a 3 y 4 días, siendo 4 mm el umbral necesario a superar para alcanzar una floración representativa de la mitad de individuos de cada parcela evaluada. Para Z.f. se observó que el umbral de 4 mm también es suficiente para desencadenar el proceso de floración, pero con menor cantidad de individuos, en este caso solo 3 plantas florecieron; también la precipitación acumulada durante 3 y 4 días resultó ser más eficiente.

Para que la floración en estas Amarilidáceas nativas se produzca, además de contar con lluvias previas, es necesario que el fotoperiodo sea superior a 14,2 horas y la temperatura media por encima de 16,2 °C. La misma también está condicionada por el número de yemas florales disponible dentro del bulbo, es decir que por más que las condiciones meteorológicas sean las adecuadas, si ya se produjeron las floraciones disponibles para ese período de tiempo, no va a haber disponibilidad de yemas florales, y por lo tanto tampoco se va a producir

la floración, o bien la misma va a ser muy escasa. Esto se debe principalmente a que el desarrollo de yemas florales se produce dentro del bulbo y durante el período otoño-invernal previo. La cantidad de yemas florales está en directa proporción con la cantidad de hojas desarrolladas (De Hertogh y Le Nard, 1993), determinando de esta forma, y de acuerdo a las condiciones ambientales apropiadas o no, la abundancia o escasez de la floración durante los meses estivales. Una observación importante es que durante el período que duró el ensayo no hubo mortandad de plantas marcadas de ninguna especie en ninguna de las clausuras, esto es otra prueba de la gran tolerancia al estrés hídrico de ambas especies.

Dado que son numerosos los factores que condicionan el desarrollo de estos procesos clave de la vida de las especies vegetales, como son la floración, fructificación y el estado vegetativo para acumulación de reservas en bulbosas; y sumado a los años atípicos que se dieron durante el estudio en cuanto a escasez de precipitación y altas temperaturas, resulta particularmente complejo realizar una determinación estadística que logre cuantificar el efecto que tiene cada una de estas variables a la hora de desencadenar cada uno de los procesos fenológicos.

1.3.2 Respuesta al régimen hídrico

Debido a que los ensayos fueron realizados bajo invernáculo, las condiciones ambientales (fotoperíodo, temperatura y riego) fueron mantenidas de manera estable durante el período analizado (noviembre 2008- diciembre 2012).

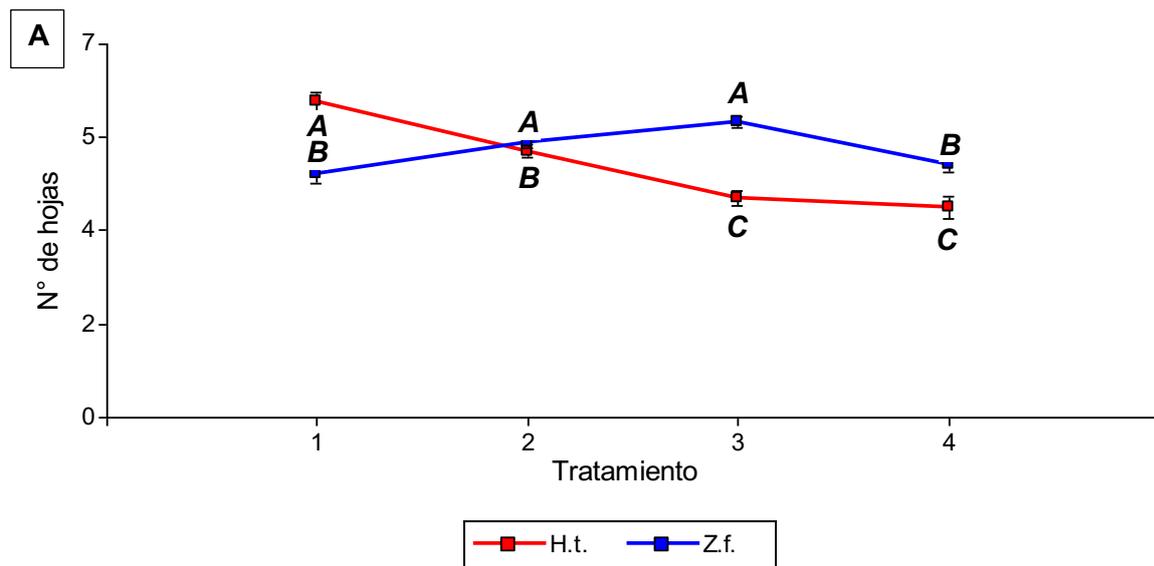
Tal y como fue observado *in situ*, H.t. florece bajo condiciones controladas de invernáculo entre 3 y 4 días después de realizar un riego; sin distinción del tratamiento empleado. Es decir, no hay diferencias si se aplica riego semanal, quincenal o mensual. La fructificación (Figura 1.3g) se produce 6 o 7 días después de producida la floración (DDF), y la dehiscencia de los frutos en promedio 14 DDF. También se observó que cuanto menor es la frecuencia de riego, se sincronizó la floración y se prolongó en el tiempo. Esta herramienta es particularmente interesante en ornamentación, ya que este comportamiento fenológico de la especie permitiría realizar una manipulación de la floración mediante la irrigación. Z.f. también tuvo el mismo comportamiento en cuanto a la duración de las fenofases bajo condiciones controladas respecto de las clausuras evaluadas *in situ*. Su floración también se produjo entre 3 y 4 días luego de cada riego, y este efecto fue más notorio en los tratamientos 3 y 4 (riego mensual y riego semanal solo en la fase reproductiva), dado que el número de flores totales producidas fue mayor. También es posible manipular, de esta forma, el comportamiento fenológico de la floración en esta especie. La fructificación se produjo en promedio 7 DDF, y la dehiscencia de los frutos 14 DDF.

Para foliación y floración, la interacción entre especies y tratamientos fue muy significativa ($p < 0.0001$). Cuando se evaluó la diferencia entre los tratamientos para cada una

de las especies, se encontró para H.t. que la producción de hojas fue significativamente mayor en el tratamiento riego semanal, diferenciándose del tratamiento riego quincenal; y ambos resultaron ser significativamente mayores que los tratamientos riego mensual y riego anual, para los cuales no se encontraron diferencias significativas entre si (Figura 1.12A). En cambio, Z.f. evidenció un comportamiento distinto; siendo los tratamientos riego quincenal y riego mensual los que más favorecieron a la producción de hojas, diferenciándose significativamente de los tratamientos con riego semanal y anual (Figura 1.12A).

La producción de flores totales (Figura 1.12B), H.t. se vió favorecida por los tratamientos de riego más frecuente, siendo significativamente menor en el tratamiento de riego mensual, y aún menor en el de riego anual. Para Z.f. se observó un comportamiento casi opuesto, con la mayor floración total con riego mensual respecto a riegos más frecuentes, siendo casi nula con riego semanal.

Es importante destacar la gran capacidad adaptativa que poseen ambas especies ante períodos prolongados de estrés hídrico, sobreviviendo y floreciendo incluso luego de haber permanecido más de nueve meses sin aportes hídricos. Incluso Z.f. se ve favorecida por riegos espaciados al menos un mes. Esta tolerancia al estrés hídrico se explica por la alta eficiencia en el uso del agua y mantenimiento de la tasa relativa de crecimiento aún en condiciones de estrés durante seis semanas (Vidal *et al.*, 2013).



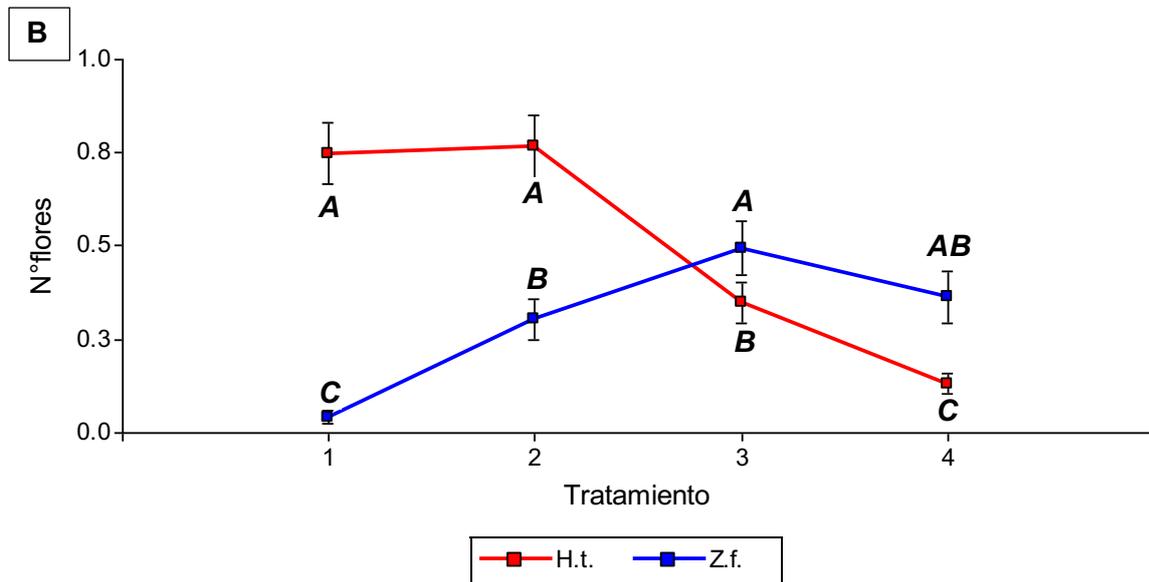


Figura 1.12: A. Número máximo de hojas, y B. Número total de flores para los 4 tratamientos evaluados (1: riego semanal, 2 riego quincenal, 3 riego mensual y 4 riego solo en período reproductivo), para *Habranthus tubispathus* (H.t.) y *Zephyranthes filifolia* (Z.f.). Letras distintas para cada especie indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se comparan ambas especies en cada tratamiento por separado, se observa que la producción de hojas en H.t. se vió favorecida por los tratamientos con riego más frecuente (Figuras 1.13A y 1.13B), aunque la misma fue decreciendo a medida que los años de riego fueron avanzando. De todos modos, cuando se aplicaron los tratamientos más restrictivos (Figuras 1.13C y 1.13D), esta merma fue aún más acentuada; evidenciando que esta especie se ve fuertemente afectada por períodos prolongados de extrema sequía, dato concordante con lo observado en las clausuras a campo.

En cuanto a *Zephyranthes filifolia*, observamos que esta especie tiene un comportamiento diferencial respecto de H.t., en cuanto a la producción de hojas del tratamiento con riego semanal (Figura 1.13A), el cual provocó una disminución más marcada en la producción de biomasa. Sin embargo, no se observaron diferencias entre especies respecto al Tratamiento 2 (Figura 1.13B); y el comportamiento fue similar en los Tratamientos 3 y 4 (Figuras 1.13C y D), aunque queda en evidencia la ventaja adaptativa que posee Z.f. de producir una mayor biomasa a medida que la restricción hídrica es mayor.

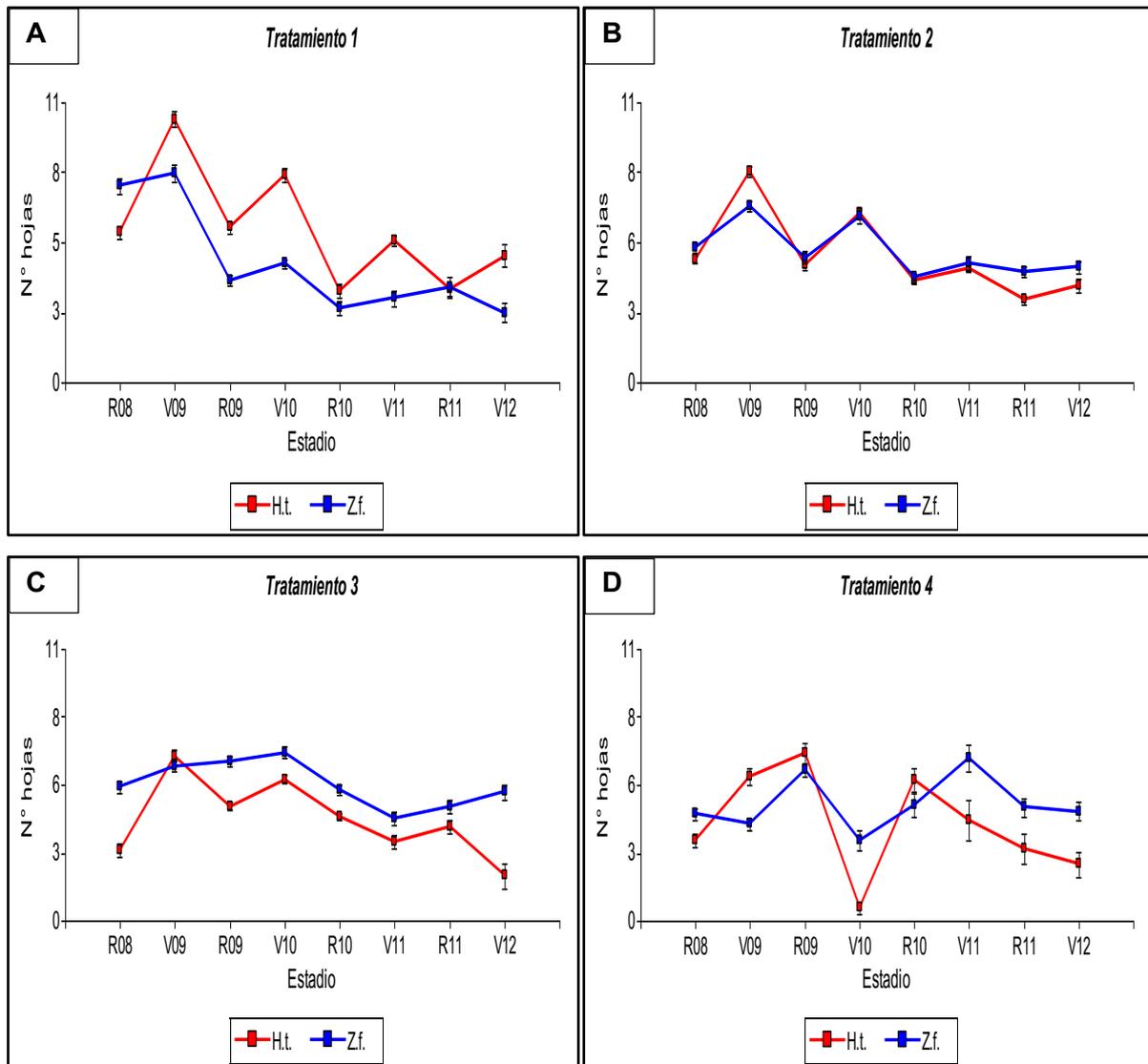


Figura 1.13: Producción de número de hojas máximo por fase fenológica en *Habranthus tubispatus* (H.t.) y *Zephyranthes filifolia* (Z.f.), para: **A.** Tratamiento 1, riego semanal. **B.** Tratamiento 2, riego quincenal. **C.** Tratamiento 3, riego mensual. **D.** Tratamiento 4, riego solo en período reproductivo

Quando se analiza la producción total de flores por fase fenológica y comparamos ambas especies, se corrobora que presentan una floración estacional bien marcada, y que existen grandes diferencias en cuanto a la respuesta de ambas a los distintos tratamientos empleados (Figura 1.14). Para H.t. los tratamientos con más frecuencia de riego fueron los que indujeron mayor número de flores por planta (Figuras 1.14A y B) mostrando un comportamiento similar. Así, el número total de flores por planta fue mayor en los períodos reproductivos R08 y R09, disminuyó en R10 y fue casi nulo en R11. Este comportamiento fue acompañado con una disminución en la producción de hojas en la fase vegetativa a través de los años (Figura 1.14). Los tratamientos 3 y 4 (Figuras 1.14C y D) tuvieron un comportamiento similar, aunque el número de flores fue menor, siendo nulo para R10 y R11

en el tratamiento 3. Esto demuestra nuevamente, la mayor susceptibilidad que posee esta especie ante un estrés hídrico prolongado.

Por otra parte, Z.f. casi no presentó floración en el período R08, ya que la mayor parte de su floración había ocurrido antes de iniciar el ensayo. Contrariamente a lo que ocurrió con H.t., la floración de esta especie se vió casi anulada con el riego semanal (Figura 1.14A); observándose el mismo efecto, aunque no tan pronunciado, con el riego quincenal (Figura 1.14B). Si bien, la mayor producción de flores se observó durante la fase R09, para los tratamientos 3 y 4 (Figuras 1.14C y D), la floración en esta especie también se ve afectada negativamente con el avance de los ciclos.

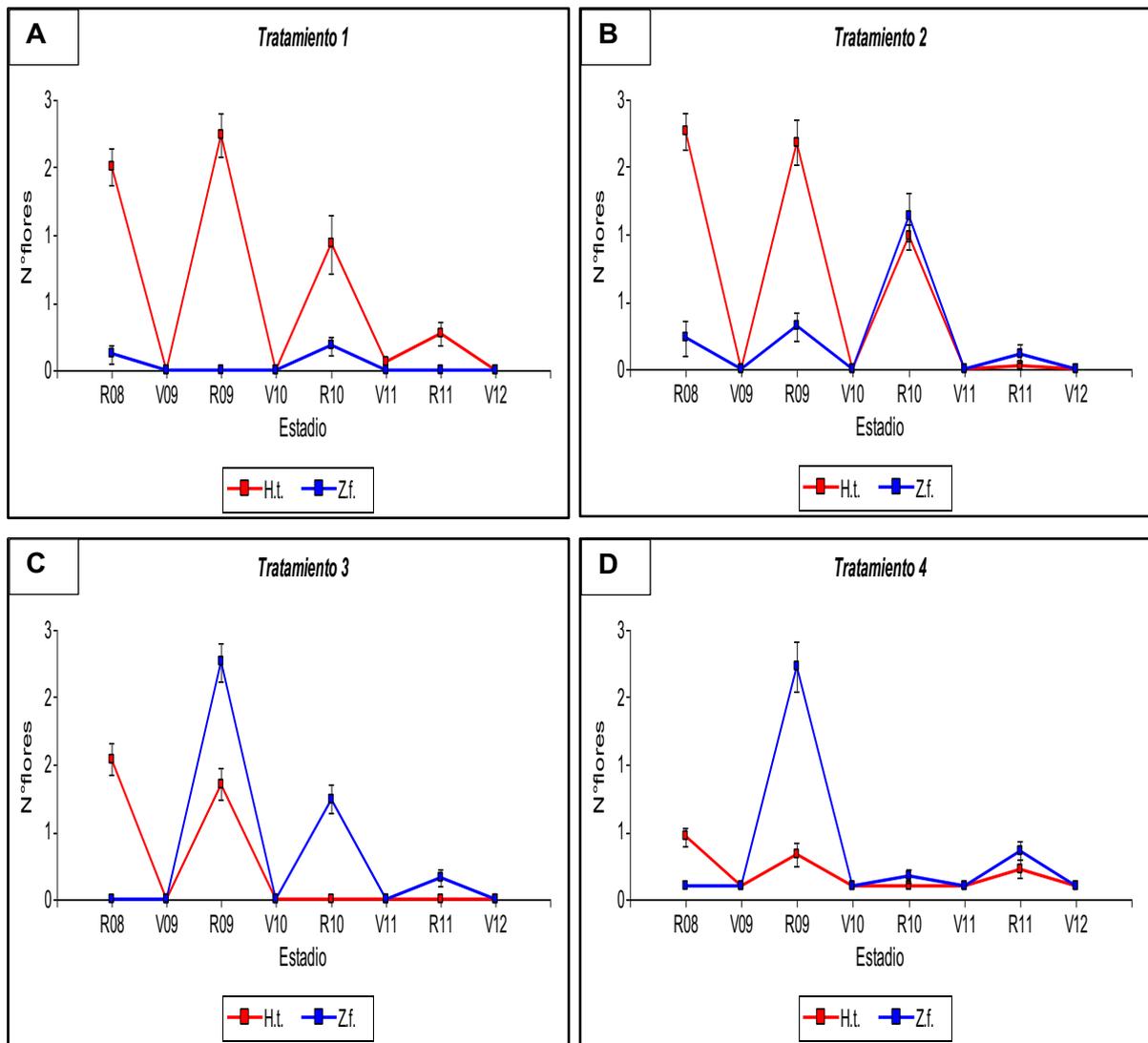


Figura 1.14: Producción de número de flores totales por fase fenológica en *Habranthus tubispathus* (H.t) y *Zephyranthes filifolia* (Z.f.), para: **A.** Tratamiento 1, riego semanal. **B.** Tratamiento 2, riego quincenal. **C.** Tratamiento 3, riego mensual. **D.** Tratamiento 4, riego solo en período reproductivo.

Cuando se comparan los cuatro tratamientos, se observa que para número máximo de hojas producido H.t. (Figura 1.15A), los tratamientos 1, 2 y 3, presentaron un comportamiento similar a lo largo de los períodos evaluados. Siendo T1 el que mayor número de hojas produjo durante los estadios vegetativas, seguido de T2 y por último T3. Éstos a su vez mostraron una tendencia decreciente a medida que los años de evaluación fueron avanzando. El mismo comportamiento fue evidenciado en las evaluaciones de la Clausura I *in situ*, durante el mismo período de tiempo. Esto se podría deber a que, si bien la especie es perenne, posee un período máximo de producción de biomasa y la misma va disminuyendo hasta que se produce su muerte. Aunque se deberían realizar más estudios enfocados sobre este punto en particular, dadas las observaciones realizadas durante el período de estudio, se podría asegurar que la longevidad de esta especie es superior a los 6 años, desde que germina la semilla hasta que se produce la muerte de la planta.

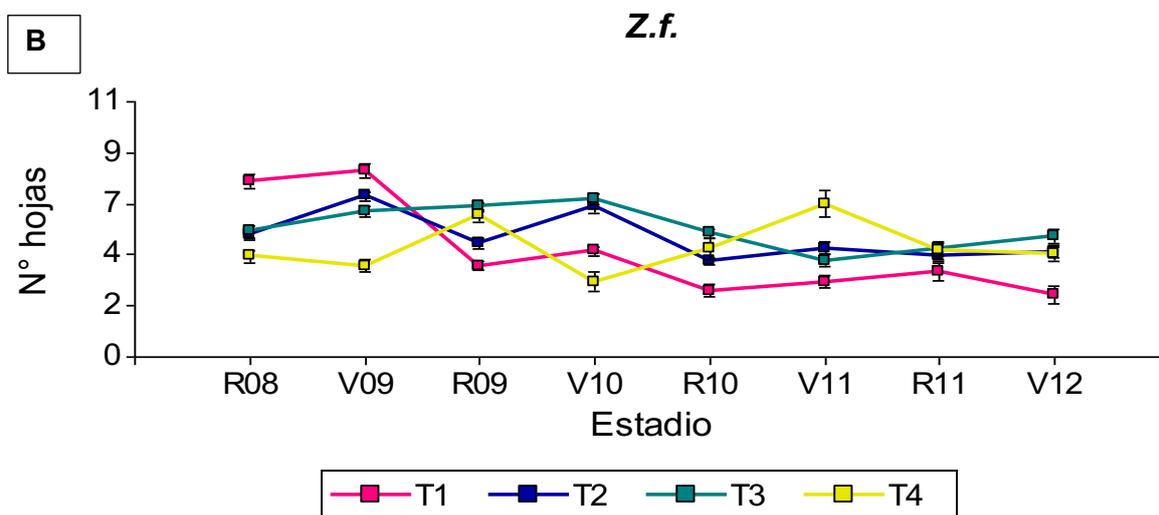
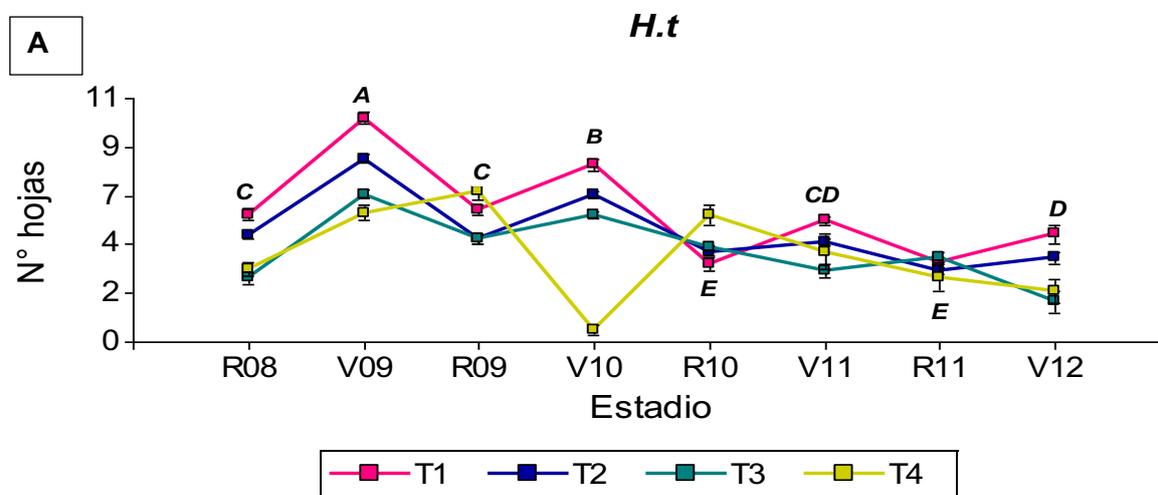
Por otra parte, el tratamiento 4 para H.t. (Figura 1.15A) evidenció un comportamiento distinto, con una marcada caída en la producción de hojas durante la fase V10, debida principalmente a la falta de riego. Podemos observar que en R10, cuando el riego es reestablecido, también se incrementa notoriamente la producción de hojas. Si bien no fue posible incorporar las letras del ANOVA en el gráfico, no se encontraron diferencias significativas entre las fases R09, V09 y R10, siendo en éstas máxima la producción de hojas; y entre V11, R08 y V11; para el resto de las fases la foliación fue mínima.

Para Z.f. (Figura 1.15B), fue posible incorporar las letras que evidencian diferencias significativas, dado que los tratamientos presentaron comportamientos muy distintos. De todos modos, todas las diferencias que se describen a continuación fueron significativas ($p < 0.05$) para el test de LSD Fisher. El riego semanal (T1) comenzó siendo el óptimo en cuanto a la producción de número de hojas, durante los estadios R08 y V09, y ya en R09 cae significativamente sin presentar diferencias con las siguientes fases. En el riego quincenal (T2), el mayor número de hojas fue observado durante V09 y V10, sin diferencias significativas entre ellos; y para el resto de las fases, si bien fue menor, se mantuvo estable. Una tendencia similar se obtuvo con el T3, donde la producción de hojas fue máxima en V09, V10 y se sumó R09; y en el resto de los estadios la misma fue menor y estable. Por último, el comportamiento más diferencial fue dado por el tratamiento 4, que mostró una máxima producción de hojas durante R09 y V11, superando al resto de los tratamientos.

El comportamiento de *Z. filifolia* en cuanto a producción de hojas en invernáculo fue distinto al observado en su ambiente natural, a pesar de realizar las evaluaciones durante el mismo período de tiempo, y en ambas bajo condiciones de estrés hídrico. De esta forma queda evidenciada la mayor plasticidad adaptativa que posee la especie, la cual se ve favorecida cuando el ambiente posee condiciones controladas.

Respecto a la producción total de flores, ambas especies tuvieron un comportamiento similar, ya que fue decreciendo en el tiempo, llegando a ser casi nula durante el último período reproductivo (R12). Para *H.t.* (Figura 1.15C) los tratamientos 1, 2 y 3 presentaron el mismo comportamiento, siendo significativamente mayor para R08 y R09, seguido por R10 y por último con el menor número de flores fue la fase R11. Entre los tratamientos 1 y 2 no se observó diferencia en cuanto a la producción de flores, y para el 3 sólo hubo diferencias en R09, siendo ésta menor. Para el tratamiento 4 la floración fue significativamente mayor en R8, seguida por R09 y R11 y nula en R10, esto último condice con la casi nula producción de hojas durante el período V10. A pesar de estas diferencias que existieron entre fases, la falta de riego durante el período vegetativo de *H. tubispathus* afecta marcadamente la reproducción de la especie.

Para *Z.f.* (Figura 1.15D) la producción de flores resultó ser significativamente mayor en R09, seguida de R10 y por último R11, para los tratamientos 3 y 4. Demostrándose en este parámetro también la mayor capacidad adaptativa que posee esta especie ante períodos prolongados de estrés hídrico.



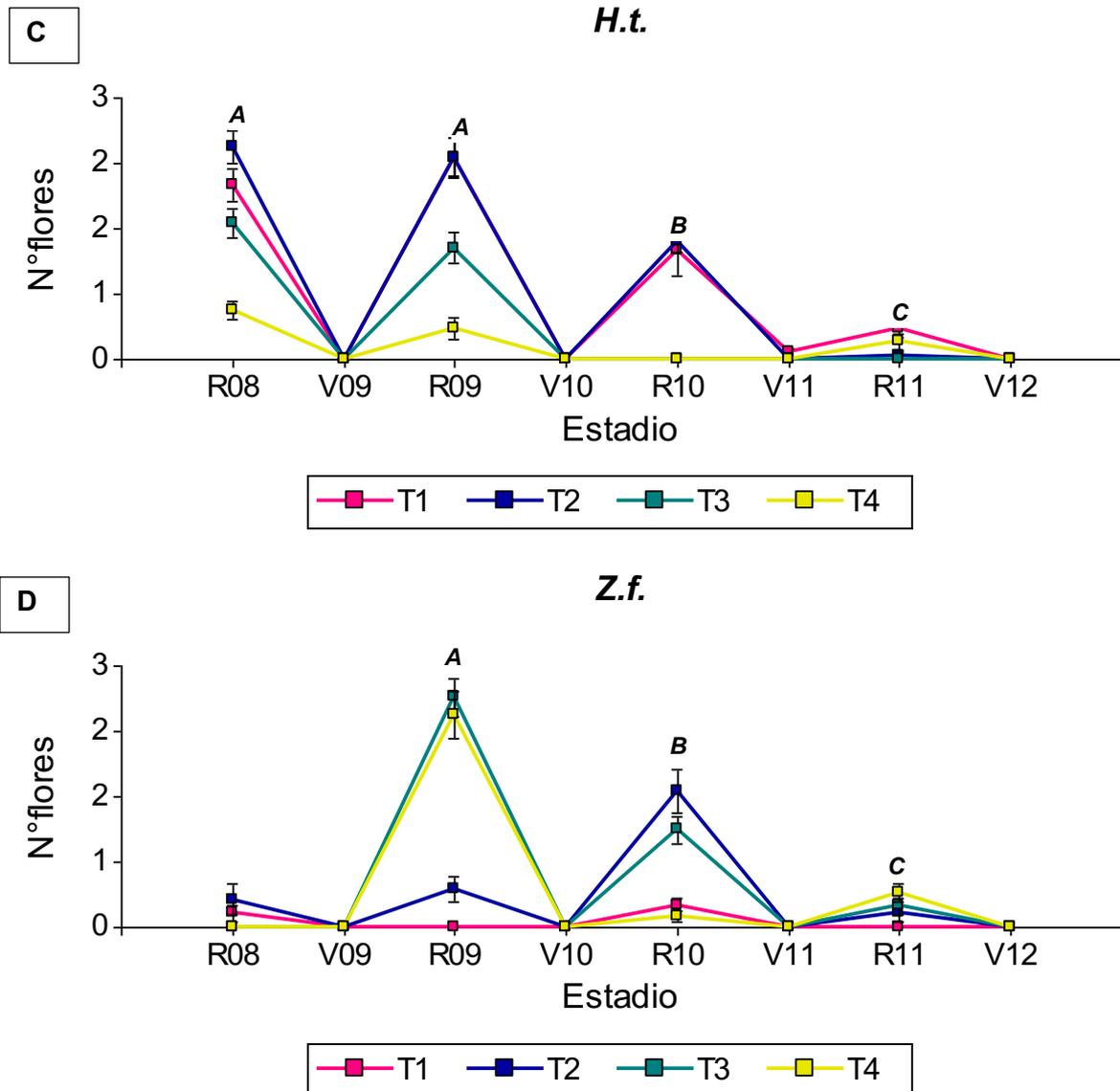


Figura 1.15: Tratamientos evaluados para las fases fenológicas reproductiva (R) y vegetativa (V) en los años de evaluación: T1 (riego semanal), T2 (riego quincenal), T3 (riego mensual) y T4 (riego solo en período reproductivo), para: **A.** Número de hojas máximo en *H. tubispatus* (H.t). Las letras son únicamente para los Tratamientos 1, 2 y 3. **B.** Número de hojas máximo en *Z. filifolia* (Z.f.). **C.** Número total de flores para H.t. Las letras son únicamente para los Tratamientos 1, 2 y 3. **D.** Número total de flores para Z.f. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cabe mencionar que al final del período de evaluación, se recolectaron los ensayos, y se encontró que para *Habranthus tubispatus* hubo una muerte del 44 % de los individuos que fueron sometidos al tratamiento de mayor estrés hídrico (T4). Este valor para *Zephyranthes filifolia* solo fue del 4 %, en el mismo tratamiento. El resto de los individuos involucrados en este estudio, para el resto de los tratamientos, se mantuvo vivo.

De acuerdo con Ruiters (1995), las geófitas presentan un modelo de reserva dado por pulsos (MRP), que describe la importancia de las reservas almacenadas a partir de las cuales se inicia un pulso de crecimiento, provocado por el inicio de la lluvia. Alternando períodos de

poco o ningún crecimiento durante la temporada adversa, con pulsos activos, donde la actividad de hojas y las raíces devuelven a las reservas los recursos consumidos para su producción.

Si bien las geófitas carecen de características xerofíticas específicas o definidas, las mismas poseen la capacidad de adaptarse a la sequía estacional, debido principalmente a que poseen un órgano de almacenamiento y su fuerte ciclo de crecimiento estacional. En general, aquellas especies geófitas que no poseen una sincronidad en la producción de hojas y flores, tienen como pre requisito para florecer contar con un período de acumulación de reservas (Ruiters, 1995). En el caso de *H. tubispathus* y *Z. filifolia*, este período coincide con el mayor desarrollo foliar de las especies, correspondiendo al período otoño-invernal-primaveral de la zona (desde los meses marzo a octubre).

1.3.3 Efecto de la temperatura sobre la floración y desarrollo de *H. tubispathus*

Cuando se realizó la comparación entre los tratamientos A (Tmax 25 °C y Tmin 17 °C) y B (Tmax 38 °C y Tmin 22 °C), no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la producción de flores (Figura 1.16). La misma fue en promedio de una flor por bulbo para A y 1,1 para B. Esto pudo deberse principalmente a que el número de flores ya estaba definido previamente, y dado que los bulbos tenían una edad similar, la floración resultó ser similar en número también. Sin embargo, la floración en A fue en forma adelantada y más distribuida en el tiempo, comparada con la floración en B que fue más concentrada después de cada riego y más uniforme a lo largo del período de floración. Para que esta especie comience su fase reproductiva, solo es necesario que alcance una temperatura determinada y, junto con la irrigación, la misma se desencadene.

Respecto a la duración de las fenofases, tanto para el tratamiento A como para el tratamiento B, la floración ocurrió de 3 a 4 días después de cada riego, al igual que ocurrió en invernáculo e *in situ*. La fructificación en A fue entre 6 y 7 DDF, en cambio en B se vió acelerada a 3 o 4 DDF ($p < 0,05$), evidenciando el efecto que posee una mayor temperatura en reducir el tiempo de formación del fruto. De la misma forma, la dehiscencia de los frutos demoró más en el tratamiento A (18 a 19 DDF) respecto de lo observado en invernáculo e *in situ*, y fue de 15 DDF para el tratamiento B, similar a lo observado para el resto de las condiciones evaluadas. Por lo tanto, la maduración de los frutos se prolonga a medida que la temperatura es menor.

Por otra parte, cuando se compara el número máximo de hojas producido, se encontró que fue mayor en las plantas cultivadas a temperaturas 25°-17 °C ($p < 0,05$) (Figura 1.16). Esto puede ser explicado principalmente por la adaptación de la especie a reducir su evapotranspiración reduciendo el número y tamaño de hojas por senescencia parcial apical, y sobrevivir a condiciones de temperatura más extrema.

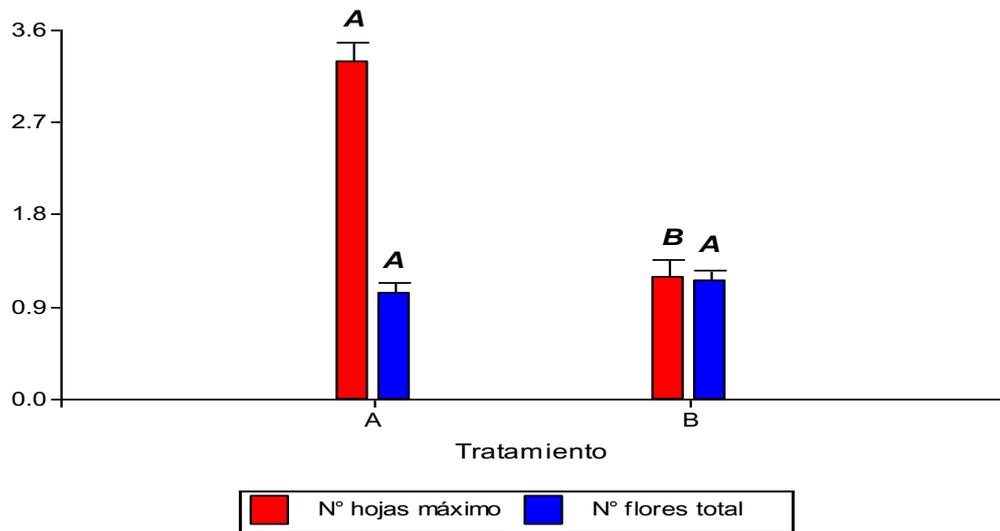
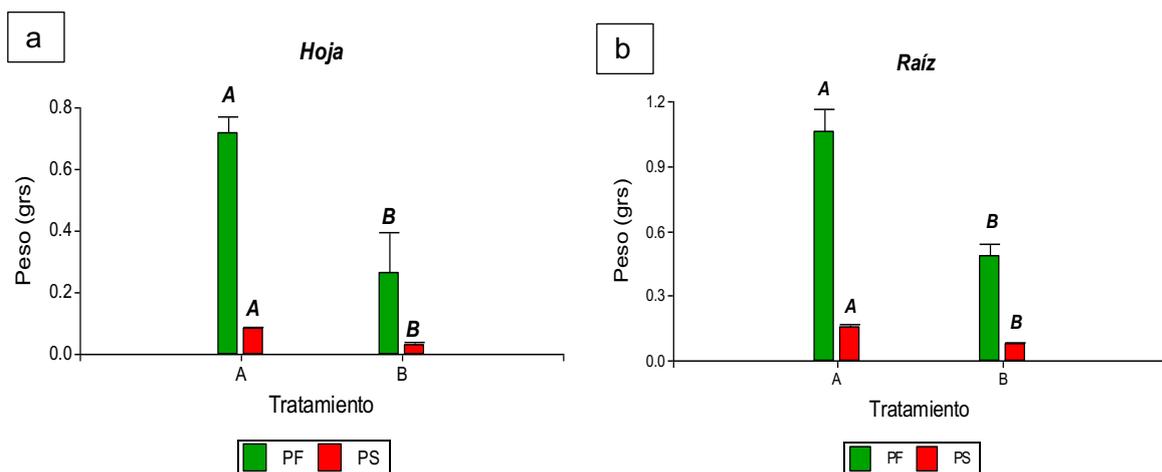


Figura 1.16: Número máximo de hojas y número total de flores por planta para los 2 tratamientos evaluados: A temperatura máxima 25 °C y B temperatura máxima 38 °C, para *H. tubispathus*. Letras distintas entre barras del mismo color indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se evaluó la biomasa de hoja, raíz y bulbo en *H.t.*, se determinó que en todos los casos el tratamiento A superó al tratamiento B ($p < 0,0001$) (Figura 1.17). Es decir, que, con temperaturas máximas de 38 °C y mínimas de 22 °C, la biomasa de *H.t.* se ve fuertemente afectada respecto de la temperatura de cultivo más baja. Además, el 45 % de las plantas del tratamiento B murieron al finalizar el ensayo, mientras que la totalidad de las del tratamiento A sobrevivieron.

Un comportamiento similar fue observado por Acosta (1989) en otra bulbosa, la cebolla (*Allium cepa*), en la que el número de hojas formadas y, por lo tanto, el tamaño final del bulbo, aumentan a medida que más dura la época óptima para la formación de hojas. Según Bult, citado por Izquierdo (1992), el número de hojas fue mayor a 20 °C y menor a 30 °C. Por lo tanto, a medida que las temperaturas son más elevadas, se acorta el ciclo vegetativo de la planta y limita la formación de nuevas hojas (Agüero Aguilar, 2002).



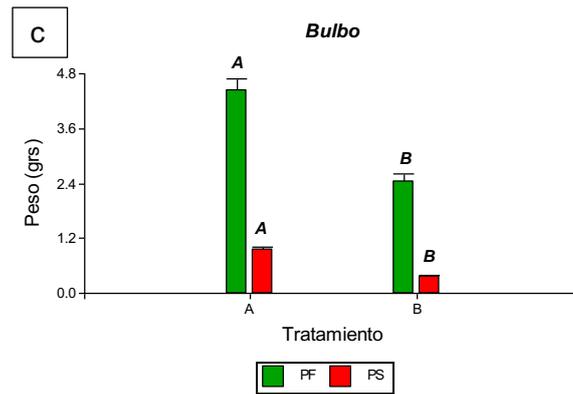


Figura 1.17: Peso fresco (PF), peso seco (PS) de hojas, raíz y bulbo para los 2 tratamientos evaluados: A temperatura máxima 25 °C y B temperatura máxima 38 °C, para *H. tubispathus*. Letras distintas entre barras del mismo color indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$).

1.4 CONCLUSIONES

En condiciones naturales, *Habranthus tubispathus* posee un comportamiento fenológico estacional y espacial bien marcado. Esto está dado por un estadio vegetativo otoño-invernal (marzo a octubre) donde aparecen las hojas y se acumulan reservas en el bulbo, seguido por un período reproductivo que va desde noviembre hasta febrero, con una mayor concentración de la floración en los dos primeros meses, la cual se produce luego de lluvias que superan los 10 mm. Durante el período reproductivo hay ausencia de hojas. *Zephyranthes filifolia* posee también floración estival y estacional durante los meses de noviembre y diciembre principalmente, y a diferencia de H.t., esta especie posee la capacidad de mantener su producción de hojas durante la fase reproductiva. A pesar de haber realizado los estudios *in situ* durante años con escasas de precipitaciones, se logró realizar una caracterización fenológica de ambas especies y determinar diferencias en función de la calidad de sitio.

La producción de hojas y flores totales en *Habranthus tubispathus* se ve favorecida por un aporte regular de agua, en cambio en *Zephyranthes filifolia* el mismo riego produce una caída significativa en la foliación y floración que, en cambio, se ven favorecidas por riegos mensuales y aún sin riego, evidenciando la ventaja adaptativa que posee esta especie a períodos prolongadas de déficit hídrico.

Cabe destacar que en ambas especies las plantas que permanecían 10 meses al año sin riego durante el período de evaluación de cuatro años, mantuvieron su habilidad de producir tanto hojas como flores. Sin embargo, en H.t. al final del período se observó una pérdida del 45 % de las plantas, en contraposición con solo un 4 % para Z.f.

El cultivo a altas temperaturas durante 14 semanas no provocó cambios en el número de flores producidas que ya estaban diferenciadas en el bulbo, pero sí produjo una disminución en el número de hojas y en la biomasa total de *Habranthus tubispathus*.

Si se considera el comportamiento fenológico y de adaptación a estrés hídrico de ambas especies en el contexto de su aplicación potencial en paisajismo, es posible proponer su uso en una jardinería sustentable, con bajos requerimientos de riego y usándolas como plantas acompañantes en el estrato cespitoso cuyo efecto ornamental es la floración formando extensas carpetas de flores que aparecen 3-4 días luego de una lluvia de primavera-verano en forma masiva y sincronizada. Por su escasa capacidad de competencia, bajo porte y su tolerancia al déficit hídrico, se adaptarían mejor a espacios cespitosos con corte y sin riego y/o con presencia de especies de crecimiento fuera de la época de foliación de H.t. y Z.f., como por ejemplo gramilla (*Cynodon dactylon*) u otras gramíneas nativas de la tribu clorídeas (*Bouteloua sp.*) con las que se las suele encontrar asociadas en la naturaleza.

1.5 **BIBLIOGRAFIA**

- Acosta D. y Gaurola J. 1989. Manual de Producción de semilla de cebolla. Red de Cooperación Técnica en Producción de Cultivos Alimenticios. FAO. Inst. Nacional de Tecnología Agropecuaria. 1° Edic. Argentina, 59p.
- Agüero Aguilar S. D. 2002. Efecto de la humedad edáfica en el desarrollo y propagación de *Ismene amancaes* (R. y P.) Herbert "Amancaes" (Amaryllidaceae) en condiciones "in situ" y "ex situ".
- Brendel, A.S. 2020. Estudio integral de los recursos hídricos y las coberturas del suelo de la cuenca media y baja del río Sauce Grande (Argentina). Tesis de Doctor en Geografía. Departamento de Geografía y Turismo, Universidad Nacional del Sur, 189 p.
- Chowdhury M.R. y Hubstenberger J. 2006. Evaluation of cross-pollination of *Zephyranthes* and *Habranthus* species and hybrids. Journal of the Arkansas Academy of Science, 60(1), pp.113-118.
- Condon A.G., Richards R.A., Rebetzke G.J. y Farquhar G.D. 2004. Breeding for high water-use efficiency. Journal of experimental botany, 55(407), 2447-2460.
- Damián-Domínguez M.D.J.X., Cano-Sanatana Z. y Castellanos-Vargas I. 2009. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae) y su relación con la lluvia. Biodiversidad Del Pedregal de San Ángel. UNAM, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y Coordinación de la Investigación Científica, México, 319-328.
- De Hertogh, A. y Le Nard, M. 1993. The Physiology of flower bulbs. Elsevier. Londres. 811 pp.
- de Steffens A.M.C., Piccolo M.C. y de Ferreras A.M.C. 2005. El clima urbano de Bahía Blanca. Editorial Dunken.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M. y Robledo Y.C. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>, 8, 195-199.
- Donnari M. y Torre L. 1974. Análisis de algunos aspectos del Clima de Bahía Blanca. Cátedra de Climatología del Dpto. de Geografía de la Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca. 32 p.
- Ferrelli, F. 2016. Análisis del clima local y micro-local de la ciudad de Bahía Blanca. Tesis de Doctor en Geografía. Departamento de Geografía y Turismo, Universidad Nacional del Sur, 268 p., 2020.
- Gentry A. 1974. Coevolutionary patterns in Central American Bignoniaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 61; 728-769,
- Izquierdo J. 1992. Producción, post cosecha y comercialización de ajo, cebolla y tomate. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. 1° Edic. Santiago. 413p.

- Kojima K., Mutsuga M., Inoue Mand Ogihara Y. 1997. Twoalkaloids from *Zephyranthes carinata*. *Phytochemistry* 48:7 1199-1202.
- Lageyre L.E., y Amiotti, N.M. 2005. Levantamiento edafológico de alta intensidad a nivel de predio. No. 631.47. Universidad Nacional del Sur.
- Meerow A. W. y Snijman D. A. 1998. Amaryllidaceae. In: Kubitzki, K. (ED.), Huber, H., Rudall, P. J., Stevens, P. S. y Stüzel, T. (COL.) *The Families and genera of vascular plants. Vol III. Flowering plants, Monocotyledons: Lilianae (except Orchidaceae)*. Springer. Berlin.
- Meerow A.W., Fay M.F., Guy C.L., Li Q.B., Zaman F.Q. y Chase M.W. 1999. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid sequence data. *American Journal of Botany*, 86(9), 1325-1345.
- Mormeneo I. 2003. Caracterización climática de Bahía Blanca 2p. www.agronomia.uns.edu.ar
- Ruiters C. 1995. Biomass and resource allocation patterns within the bulb of the perennial geophyte *Haemanthus pubescens* L. subsp. *pubescens* (Amaryllidaceae) in a periodic arid environment of lowland fynbos, South Africa. *Journal of Arid Environments*, 31(3), 311-323.
- Suni M.L., Pascual E. y Jara E. 2011. Desarrollo reproductivo del " amancay" *Ismene amancaes* (Amaryllidaceae) en su ambiente natural. *Revista peruana de biología*, 18(3), 293-298.
- Vidal P., Marinangeli P., Medrano H. y Gulías J. 2013. Water-Use Efficiency and Growth Capacity of Two Amaryllidaceae Species under Three Different Water Regimes. *Acta Hort.*, 1000:223-227

2. CAPITULO 2 - Cultivo *in vitro* de *Habranthus tubispathus*

2.1 INTRODUCCIÓN

Los floricultores han reconocido desde hace tiempo el valor ornamental que poseen las especies geófitas y así, en las últimas tres décadas, las plantas bulbosas, ya sea con cormos, tubérculos u otros órganos subterráneos de almacenamiento, participan del grupo de plantas más importantes para la industria florícola (Olate y Bridgen, 2005). Diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales, tales como el cultivo de embriones (Bridgen, 1994), la micropropagación (Lu *et al.*, 1990; Chiari y Bridgen, 2000) y la embriogénesis somática, se han utilizado con éxito en estas especies como propósitos diferentes como ser propagación, saneamiento y para asistir a la mejora genética clásica. Por ejemplo, en las especies bulbosas es muy común el establecimiento *in vitro* y la micropropagación a partir de segmentos de escamas usados como explantos primarios, permitiendo el fraccionamiento de la masa de microvástagos resultante en los repiques sucesivos (van Aartrijk y van der Linde, 1986).

El ajuste de biotécnicas como el cultivo *in vitro* suele acompañar el desarrollo de una especie silvestre como planta ornamental para diferentes fines, como la conservación del germoplasma, la propagación vegetativa, el saneamiento y el mejoramiento. Si bien estas estrategias del cultivo *in vitro* son particularmente aplicables a plantas ornamentales, la literatura muestra que su aplicación está más bien centrada en pocos géneros de bulbosas tradicionales, como *Lilium*, *Narcissus* e *Hippeastrum*, y silvestres como *Rodophiala*, entre otros (Flores, 2003). Sin embargo, hasta ahora solo existían estudios preliminares sobre los requerimientos básicos para el cultivo y la multiplicación *in vitro* de *H. tubispathus* (Rosselló *et al.*, 2004), de allí la necesidad de realizarlos a fin de optimizar un protocolo que permitiese instrumentar la propagación, conservación y asistencia al fitomejoramiento.

La micropropagación utiliza la técnica de cultivo de tejidos para la producción masiva de plantas a partir de un mínimo material de partida, el explanto, y es particularmente relevante para plantas de especies con las cuales los métodos de propagación convencionales son poco eficientes. Además en las geófitas, cobra gran importancia el contenido de sustancias de reserva del bulbo donante de explantos, siendo el factor interno que más influye en la tasa de propagación, pues condiciona la formación de raíces adventicias y la biomasa final de los bulbos (Marinangeli y Curvetto, 1997). Por otro lado, los bulbos no solo son excelentes materiales para iniciar la propagación sostenida por sus reservas en carbohidratos, sino también lo son por su natural capacidad organogénica (Leopold y Keiederman, 1975; Boyer, 1985). Para varias especies pertenecientes a las Amarilidáceas existen protocolos de micropropagación ajustados, tal es el caso de *Narcissus*, el cual fue revisado y ajustado por Seabrook (1990). Previamente Hussey (1982) informó la producción de primordios *in vitro* a partir del cultivo de explantos provenientes de doble escama de bulbo

o *twin scales*. Este tipo de explanto está formado por dos escamas adyacentes y conectadas por tejido originado desde el disco basal del bulbo. El mismo autor también encontró que los brotes se regeneraron a partir de, al menos, dos capas superficiales de células meristemáticas, cerca del disco basal del bulbo. Además, llegó a la conclusión que la multiplicación *in vitro* a partir de brotes adventicios podría ser uniforme genéticamente, así como lo es la multiplicación vegetativa que se produce naturalmente desde yemas axilares. En general, los explantos provenientes de *twin scales* han sido utilizados también con éxito para la multiplicación de otras Amarilidáceas, siendo necesario que parte del tejido del disco basal estuviese incluido en el explanto, ya que de lo contrario no se produciría la formación de vástagos (Fennell y Van Staden, 2004). La base del proceso es la estimulación del crecimiento de meristemas axilares en desarrollo o adventicios por separación del explanto de la fuente de dominancia apical, i.e. el brote central (Fennell *et al.*, 2001).

Para especies del género *Hippeastrum*, los explantos compuestos de dos escamas fueron los que produjeron mayor respuesta en comparación a la obtenida con una sola (George, 1996). En *Amaryllis*, otro género perteneciente a la familia de Amaryllidaceae, las escamas de bulbos fueron las que se utilizaron con éxito como explantos para el cultivo *in vitro* a fin de obtener bulbos adventicios (Murashige, 1974). Es decir que, si bien la obtención de explantos a partir de partes del bulbo es una técnica ampliamente utilizada en bulbosas, y en particular en Amarilidáceas, cada especie posee sus propios requerimientos y es necesario obtenerlos en cada caso.

El establecimiento del explanto trabajando en forma aséptica es la fase más crítica de la micropropagación, ya que los medios de cultivo son ricos en compuestos orgánicos como azúcares, aminoácidos y vitaminas, y ello ofrece condiciones favorables para el desarrollo de bacterias, hongos y otros microorganismos (George, 1996). Para explantos provenientes de bulbos, este factor es aún más crítico, debido a la alta carga microbiana intrínseca de estos órganos (Vidor, 1997).

Los principales factores que afectan a la efectividad de la desinfección del explanto son: el tipo y edad del material utilizado, la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición al mismo (Smith, 2000). Los desinfectantes que se han utilizado tradicionalmente incluyen etanol, hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio y cloruro de mercurio (Hartmann *et al.*, 1990; Vassil y Thorpe, 1994). Una exposición excesiva al desinfectante provoca frecuentemente la muerte más o menos extendida de las células y tejidos, la cual es una de las principales causas de la ausencia de respuesta *in vitro*; esto es frecuentemente observado cuando se trabaja con una metodología inadecuada para asepsia del material (Flores, 2003).

Por otro lado, con el fin de obtener un mayor éxito al momento del trasplante se conoce que es importante que, en la fase posterior a la multiplicación y previa a la rustificación en invernáculo, se promueva un incremento en las sustancias de reserva de los bulbos

(“engorde”) en el protocolo propuesto (Figura 2.1). Se ha reportado que el engorde de bulbos *in vitro* es fundamental para la aclimatación exitosa de las microplantas e incluso se ha informado una reducción del número de estaciones de crecimiento necesarias para que la plántula originada a través de cultivo de *in vitro* forme un bulbo comercial (tamaño crítico para floración) (Santos y Salema, 2000). Seabrook (1990) trabajando con *Narcissus* observó que el trasplante a suelo de brotes sin desarrollo de bulbo provenientes de micropropagación no fue muy exitoso. Además, otros autores (Hosoki y Asahira, 1980; Van Aartrijk y Van der Linde, 1986) han informado que la sobrevivencia y establecimiento en condiciones *ex vitro* de brotes cultivados *in vitro*, pueden ser mejorados por formación de bulbillos antes del trasplante. Por otra parte, Olate y Bridgen (2005) y Santos *et al.* (1998) enfatizan la importancia de producir bulbos *in vitro* del mayor tamaño posible para luego producir bulbos floríferos en un período de tiempo menor. En este sentido, diversos autores han encontrado que el número y peso de bulbos *in vitro* aumentan al incrementarse los niveles de sacarosa en el medio de cultivo, respecto de los tradicionalmente usados (30 g L⁻¹): *Lilium auratum* – 40 g L⁻¹ (Takayama y Misawa, 1980); *Lilium longiflorum* – 90 g L⁻¹ (Marinangeli y Curvetto, 1997); *Lilium speciosum* – 60, 90 y 120 g L⁻¹ (Gerrits y De Klerk, 1992); *Narcissus* – 90 g L⁻¹ (Chow *et al.*, 1992); *Tulipa* – 60 g L⁻¹ (George, 1993). Van Aartrijk y Van der Linde (1986) indicaron que la formación de bulbillos en muchas especies de Amarilidáceas es afectada por la concentración de sacarosa, citocininas y auxinas.

Es bien sabido que la tasa de propagación natural de las Amarilidáceas es muy baja (Santos *et al.*, 1998; Schiappacasse *et al.*, 2003; Angulo *et al.*, 2003), y como se mencionara precedentemente, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* pueden remover esta limitación al favorecer el crecimiento de estas especies, disminuyendo por ello el tiempo requerido para completar el ciclo vegetativo, ya que el bulbo alcanza antes el tamaño mínimo para iniciar el ciclo reproductivo (Murashige, 1974; Chen *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006). De allí que la principal ventaja de obtener un protocolo eficiente de micropropagación para *Habranthus tubispathus* es que posibilita la obtención de plantas a gran escala y en un periodo relativamente corto de tiempo. La única referencia de cultivo *in vitro* de esta especie corresponde a un estudio realizado por Rosselló y colaboradores (2004), en el cual se ajustó un protocolo de desinfección de semillas y establecimiento *in vitro* de explantos a partir de ellas.

El objetivo general del trabajo correspondiente a esta parte de la tesis fue establecer las bases de un protocolo de cultivo *in vitro* para *Habranthus tubispathus*, lo cual permitiría *a posteriori*: i) su aplicación para la multiplicación clonal de genotipos selectos, ii) como herramienta complementaria para la aplicación de otras biotécnicas, iii) para posibilitar la conservación de germoplasma de diferentes orígenes y iv) poder disponer de técnicas útiles para la posible reintroducción a su hábitat natural (Portaluppi *et al.*, 2002). En la figura 2.1 se

propone un protocolo para micropropagación de *H. tubispathus* basado en lo propuesto por Furmanowa y Oledzka (1983) para *Zephyranthes robusta*. El establecimiento *in vitro* de plántulas de *Habranthus tubispathus* a partir de semillas fue realizada con anterioridad en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS, Conicet-UNS) (Rosselló y *et al.*, 2004), por lo tanto se trabajó particularmente para en el establecimiento *in vitro* a partir de bulbos (órganos vegetativos) y el ajuste de las restantes fases: multibrotación, bulbificación y establecimiento *ex vitro*.

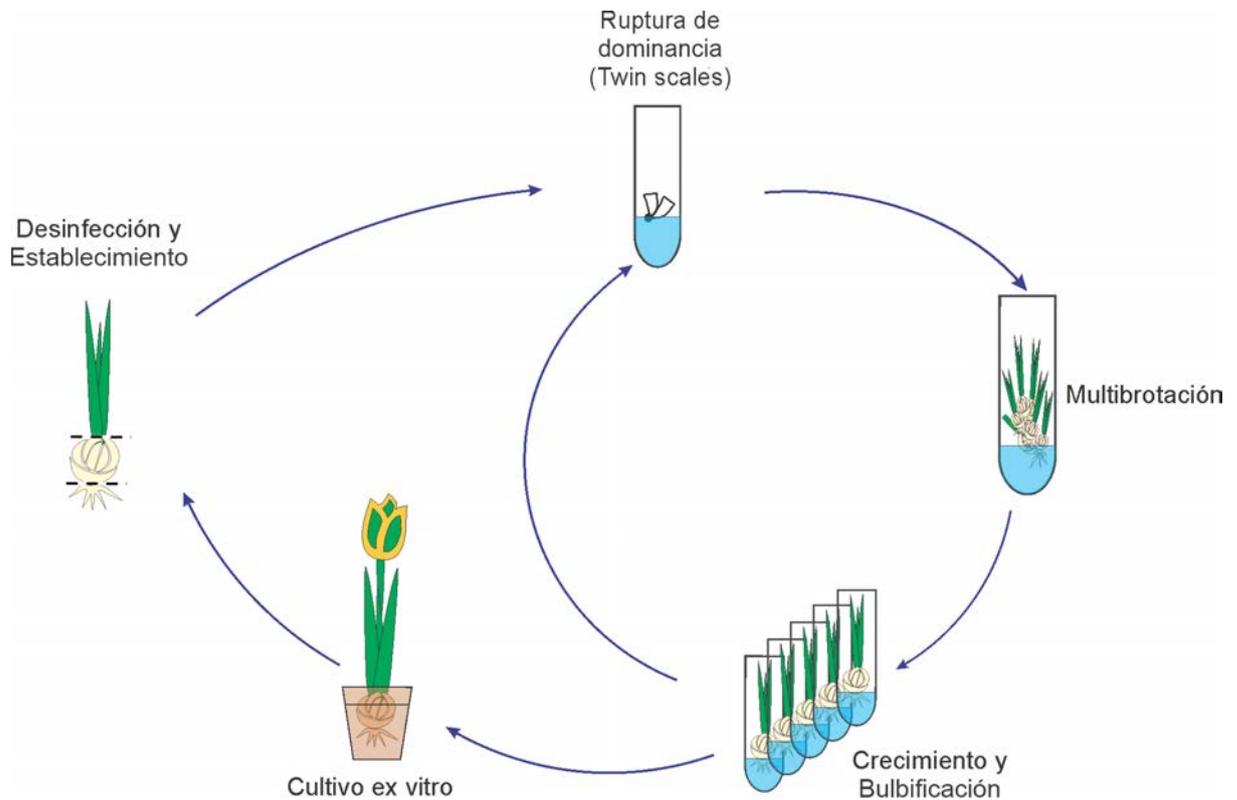


Figura 2.1: Esquema del flujo de operaciones correspondiente al protocolo propuesto para micropropagación de *Habranthus tubispathus* a partir de bulbos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Twin scaling en el establecimiento y multibrotación *in vitro* de *H. tubispathus*

Los explantos se extrajeron de plantas de *Habranthus tubispathus* cultivadas entre 7 y 8 años en el invernáculo del CERZOS. Las plantas de *H. tubispathus* pertenecían a una colección generada entre los años 2003 y 2004, a partir de recolecciones realizadas de una población natural situada en el predio del CONICET Bahía Blanca, ubicado en el camino La Carrindanga Km 7 de Bahía Blanca. Las plantas de *H. tubispathus* se cultivaron en

contenedores con mezcla 1:1 de suelo arenosos-franco y sustrato comercial Grow Mix Multipro (Terrafertil) que se mantuvieron regados y fertilizados durante la fase vegetativa (marzo-noviembre).

Una vez en el laboratorio, las plantas fueron lavadas bajo corriente continua de agua durante 15 minutos, a fin de retirar la mayor cantidad posible de sustrato y suelo presente en el exterior de los bulbos, cuyos tamaños oscilaron entre 3 y 5 cm de diámetro. Luego de retirar la parte aérea, radicular y sus catáfilas exteriores, con el objetivo de iniciar su desinfección, los bulbos se sumergieron durante tres horas en una solución conteniendo dos fungicidas: 1g L⁻¹ de Captan (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida) + 1 ml L⁻¹ de Carbendazim (2-metoxicarbamoil-bencimidazol); en agitación continua y dentro de una cámara de flujo laminar de aire estéril. Una vez retirada la solución de fungicidas, los bulbos se sumergieron consecutivamente por 1 minuto en etanol 70 %, y por 20 minutos en una solución acuosa de ClONa (0,8 % de cloro activo), con el agregado de 5 gotas por litro de Tween 20. Los bulbos fueron luego enjuagados y agitados en agua destilada estéril durante varios minutos, repitiendo este procedimiento tres veces.

Después de la desinfección, los explantos fueron asépticamente aislados desde los bulbos, trabajando en una cámara de flujo laminar de aire estéril. Las escamas externas, que estuvieron en contacto con el NaClO, fueron eliminadas con ayuda de pinza y bisturí, ya que pudieron verse afectadas por el mismo. Luego, los bulbos fueron cortados verticalmente en 8 segmentos iguales, y los explantos fueron separados en lo que llamamos doble escama o *twin scales*, formados por dos escamas unidas por una porción del disco basal, como se muestra en el esquema de la Figura 2.2. Inmediatamente, con el objetivo de evitar la deshidratación, los explantos fueron inoculados individualmente, de forma vertical y con la porción del disco basal levemente inserto en el medio, en tubos de vidrio (12 x 75 mm), cerrados mediante tapas plásticas y protegidos en sus bordes por film transparente de PVC. Cada tubo contenía 5 ml de medio de cultivo compuesto por medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar. Las combinaciones de los reguladores de crecimiento correspondientes a cada tratamiento, se describen en la siguiente sección. Luego de ajustar el pH a 5,8, el medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C de temperatura y 1,5 atm de presión, durante 20 minutos.

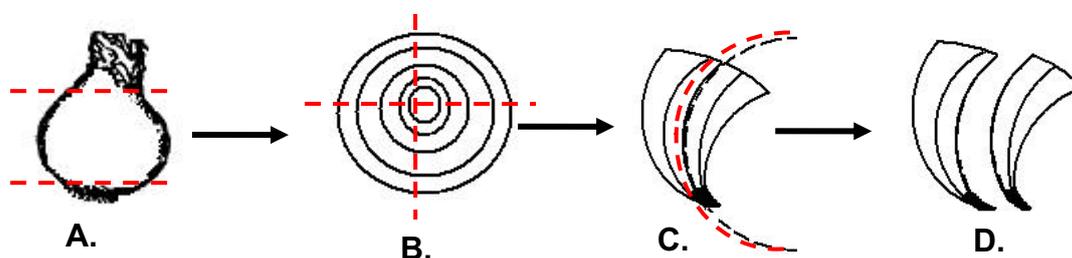


Figura 2.2: Esquema utilizado para la obtención de *twin scales* desde bulbos de *H. tubispathus*: **A.** El bulbo fue cortado transversalmente, la parte superior y restos de raíces fueron eliminadas; **B.** La parte media fue seccionada radialmente en 8 gajos, **C.** Cada gajo fue dividido en segmentos de doble escama, unidas por una porción del disco basal (Flores, 2003).

2.2.1.1 Producción de biomasa de bulbos y brotes por Twin scaling en *H. tubispathus*. Complemento de reguladores de crecimiento en medios de cultivos: ácido α -naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) y 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina (2iP).

Como primer ensayo para el ajuste del protocolo de micropropagación, se realizaron 28 tratamientos resultantes de la combinación de tres reguladores de crecimiento en tres concentraciones, dos auxinas y una citocinina en combinación factorial, más un control sin fitorreguladores, que fueron agregados al medio basal descrito anteriormente (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Combinación factorial de tres concentraciones de ANA y AIA con 2iP en el medio de cultivo.

Tratamiento	ANA (mg L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)	2iP (mg L ⁻¹)
1	0	0	0
2	0,011	0	0
3	0,053	0	0
4	0,106	0	0
5	0	0,1	0
6	0	1	0
7	0	10	0
8	0	0	0,1
9	0	0	1
10	0	0	10
11	0,011	0	0,1
12	0,011	0	1
13	0,011	0	10
14	0,053	0	0,1
15	0,053	0	1
16	0,053	0	10
17	0,106	0	0,1
18	0,106	0	1
19	0,106	0	10
20	0	0,1	0,1
21	0	0,1	1
22	0	0,1	10
23	0	1	0,1
24	0	1	1
25	0	1	10
26	0	10	0,1
27	0	10	1
28	0	10	10

Para cada uno de los 28 tratamientos se realizaron 25 repeticiones, en tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio de cultivo y un explanto de *twin scales* cada uno. Los mismos fueron distribuidos al azar y mantenidos durante 68 días en cámara de cultivo a 25±3

°C, 16 horas de fotoperiodo (DFF 48 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Al final de esta primera etapa se hizo el recuento de microvástagos producidos por explanto y se registró el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) por separado de raíces, bulbos y hojas; utilizando una termobalanza (Sartorius, modelo MA35) que realiza las mediciones por el método de termogravimetría, y posibilita tomar tanto el peso fresco como el peso seco, sin necesidad de retirar la muestra del recipiente de medición. Por otra parte, con un calibre digital (KÖLN) se midió el diámetro de los microbulbos en el tercio inferior de los mismos (diámetro mayor) y la longitud de las hojas.

El diseño estadístico de todos los experimentos fue completamente al azar simple. Los datos registrados fueron analizados estadísticamente con el software Infostat y las medias se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. Cada unidad experimental estuvo constituida por una planta por contenedor.

2.2.1.2 Producción de biomasa de bulbos y brotes por Twin scaling en *H. tubispathus*. Complemento de reguladores de crecimiento en medios de cultivos: ácido indol-3-acético (AIA), 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina 2iP y tidiazurón (TDZ)

En el siguiente ensayo se decidió incluir al TDZ, fitoregulator perteneciente al grupo de las citocininas, a fin de mejorar la performance de multibrotación obtenida en el ensayo anterior. Se evaluó la combinación factorial de la auxina con las dos citocininas más un tratamiento control y uno que incluyó los tres reguladores, resultando en 20 tratamientos (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Combinación factorial de tres concentraciones de ANA con 2iP y TDZ en el medio de cultivo.

Tratamiento	AIA (mg L ⁻¹)	2iP (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)
1	0	0	0
2	5	1	0
3	5	10	0
4	5	50	0
5	5	0	1
6	5	0	5
7	5	0	10
8	10	1	0
9	10	10	0
10	10	50	0
11	10	0	1
12	10	0	5
13	10	0	10
14	50	1	0
15	50	10	0

16	50	50	0
17	50	0	1
18	50	0	5
19	50	0	10
20	5	1	1

El protocolo de cultivo fue el mismo que el descrito para el ensayo anterior, así como el tiempo de cultivo que fue de 60 días. Los resultados se sometieron al análisis de varianza (ANOVA), y cuando los efectos o la interacción fueron estadísticamente significativos, se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de medias, utilizando $P < 0,05$ como significativo.

2.2.1.3 Producción de bulbos por Twin scaling en *H. tubispathus*. Ajuste del complemento de reguladores de crecimiento

En esta repetición de aquellos tratamientos con los mejores resultados de multibrotación, fue necesario hacer una nueva recolección de bulbos maduros en invernáculo. Su desinfección siguió los pasos anteriormente descritos, con combinación de fungicidas, etanol e ClONa. El número de repeticiones de cada tratamiento fue aumentado a 50, con un explanto en cada tubo de ensayo y con medio de cultivo que repetía las combinaciones de fitoreguladores con las que se obtuvo 5 o más vástagos por explanto en el ensayo 2.2.1.2. Además se agregó el tratamiento N° 5, que contenía la combinación de los 3 fitoreguladores empleados en este ensayo, con el aumento en la concentración de la auxina (AIA).

- 1) AIA 50 mg L⁻¹ + TDZ 0,5 mg L⁻¹
- 2) AIA 50 mg L⁻¹ + TDZ 1 mg L⁻¹
- 3) AIA 50 mg L⁻¹ + TDZ 5 mg L⁻¹
- 4) AIA 5 mg L⁻¹ + 2iP 1 mg L⁻¹ + TDZ 1 mg L⁻¹
- 5) AIA 50 mg L⁻¹ + 2iP 1 mg L⁻¹ + TDZ 1 mg L⁻¹

Los tubos de ensayo con los explantos de doble escama fueron distribuidos al azar en cámara de cultivo, a 25 ± 3 °C, 16 horas de fotoperiodo (DFF 48 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), durante 60 días. Transcurrido ese período se recolectaron datos del número de vástagos producidos por cada uno de los explantos, y se realizó un ANOVA y test de Tukey ($p < 0,05$) para comparación de medias.

2.2.1.4 Subcultivo de tratamientos con mayor multibrotación por explanto

Desde la evaluación de los resultados de la experiencia anterior se decidió repetirla, haciendo un subcultivo del material correspondiente a los dos tratamientos en los cuales se había obtenido la mayor cantidad de microvástagos por explanto. Para ello se usaron a los vástagos resultantes del ensayo 2.2.1.3, razón por la cual el número de explantos por

tratamiento fue distinto. Es así que el tratamiento N° 2 tuvo 120 explantos y el N° 5 140 explantos. Las concentraciones de fitorreguladores fueron las mismas que las empleadas en el establecimiento:

- 2) AIA 50 mg L⁻¹ + TDZ 1 mg L⁻¹
- 5) AIA 50 mg L⁻¹ + 2iP 1 mg L⁻¹ + TDZ 1 mg L⁻¹

El cultivo se mantuvo en cámara de crecimiento durante 60 días en las mismas condiciones ambientales que en la fase anterior. Al final del subcultivo se registraron la cantidad de bulbillos producidos por tubo, el número de brotes, el número de raíces, el peso fresco total y el peso fresco de los bulbos.

Una vez culminada la etapa de multiplicación, los explantos fueron transferidos a medio de cultivo de “engorde” o bulbificación *in vitro*, que contenía 60 gr L⁻¹ de sacarosa + 1 mg L⁻¹ de AIA, medio de cultivo ajustado para *Habranthus tubispathus*, en el ensayo de bulbificación *in vitro* de este capítulo. Posteriormente los microbulbos se colocaron en cámara de cultivo; luego de 2 semanas fueron trasplantados en macetas y se mantuvieron en invernáculo para completar la fase de cultivo *ex vitro*.

2.2.2 Bulbificación *in vitro*

Para este ensayo se partió de explantos provenientes de semillas, recolectadas de las fructificaciones de la población cultivada en el invernáculo. Dichas semillas fueron desinfectadas siguiendo el método de doble desinfección: se sumergieron 1 minuto en etanol 70 %, y luego por 15 minutos en una solución acuosa de ClONa (0,8 % de cloro activo), con el agregado de 5 gotas por litro de Tween 20; a continuación se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, para su imbibición, se las mantuvo sumergidas en el agua del último enjuague durante 14 horas. Al día siguiente, se realizó la segunda desinfección, repitiendo nuevamente los mismos pasos que se realizaron para la primera, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril (Rosselló *et al.*, 2004). Finalizadas ambas etapas, las semillas fueron sembradas *in vitro* en medio con sales y vitaminas de MS (Murashige y Skoog, 1962) pero sin sacarosa.

Una vez obtenidas las plántulas, se procedió a retirar la parte superior de las hojas y las raíces, con pinza y bisturí desinfectados, a fin de utilizar como explanto la base de las hojas con su disco basal. Dichos explantos fueron establecidos en medio con sales y vitaminas MS, solo o suplementado con 1 mg L⁻¹ de ácido indol-3-acético (AIA) y/o sacarosa en concentraciones variables, de acuerdo con lo reportado previamente para otros géneros de Amarilidáceas como *Cyrtanthus* (Morán *et al.*, 2003), *Narcissus* (Bergoñon *et al.*, 1992) y *Nerine* (Lilien-Kipnis *et al.*, 1992). Así, siguiendo un diseño factorial, se probaron los 10 tratamientos resultantes de la combinación de sacarosa (0, 30, 60, 90 y 120 g L⁻¹), con o sin

el agregado de 1 mg L⁻¹ AIA y pH ajustado a 5,8. Se hicieron 25 repeticiones por tratamiento en tubos con 5 mL de medio de cultivo previamente esterilizado en autoclave a 121 °C y 1,5 atm de presión, durante 20 minutos, con un único explanto en cada uno de ellos. Posteriormente los tubos fueron distribuidos al azar en cámara de cultivo y mantenidos por 120 días a 25±3 °C, con un fotoperiodo de 16 horas (DFF 48 μmol s⁻¹ m⁻²).

Finalizado el período de cultivo, se registró el peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas, bulbos y raíces por separado mediante la termobalanza descrita en el apartado anterior. Además se midió, con calibre digital (KÖLN), el diámetro a 1/3 de altura (diámetro mayor) y cuello de los bulbillos formados y su altura, tomada desde la base donde están insertas las raíces hasta la parte clorofílica de la planta donde aparecen las láminas de las hojas. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y test de comparación de medias de Tukey (p<0,05).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Twin scaling en el establecimiento y multibrotación *in vitro* de *H. tubispathus*

Un punto de partida importante fue realizar una selección de los bulbos dadores de explantos con buena condición fisiológica y sanitaria inicial, como la que ofrecían las plantas cultivadas en invernáculo, ya que son factores determinantes en el posterior comportamiento *in vitro* de los cultivos. Hasta el momento no existen técnicas de desinfección que aseguren una des-contaminación de la totalidad del material y que además no provoque un grado de daño en los tejidos, sin embargo, está comprobado que plantas con buena nutrición, sin déficit hídrico y buena sanidad, favorecen a la obtención de mejores explantos y mayor eficiencia en el establecimiento *in vitro* de los cultivos (Grattapaglia y Machado, 1990).

A partir del análisis de la técnica de desinfección seleccionada, se puede concluir que el resultado fue satisfactorio, observándose en promedio un 27 % de explantos contaminados por bacterias y/u hongos, un valor aceptable teniendo en cuenta el origen de los explantos, i.e. secciones de bulbos en contacto continuo con el sustrato de cultivo. En efecto, durante el establecimiento a partir de bulbos de otras Amaryllidaceae se registraron índices de contaminación variables y muy superiores a la de este ensayo. Como ejemplo, para *Eucomis autumnalis* se reportó un 90 % de contaminación de los explantos (Ault, 1995), 20-90 % en *Hippeastrum sp.* (Smith *et al.*, 1999) y 50-80 % en *Traubia modesta*, una especie con potencial ornamental endémica de Chile (Paredes *et al.*, 2014). Muchas especies bulbosas presentan mucílago y bacterias en el interior de sus bulbos que dificultan el establecimiento de un cultivo *in vitro* en condiciones axénicas (Hoi y Van Der Linde, 1992; Chang *et al.*, 2003; Sochacki y Orlikowska, 2005). Si bien *Habranthus tubispathus*, presenta un mucílago espeso

entre las catáfilas que conforman el bulbo, esta condición no fue un impedimento para obtener explantos con baja contaminación, ya sea de hongos como de bacterias.

2.3.1.1 Producción de biomasa de bulbos y brotes por Twin scaling en *H. tubispathus*. Complemento de reguladores de crecimiento en medios de cultivos: ácido α -naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) y 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina (2iP).

Como se observa en la Tabla 2.3, el peso fresco (PF) de los explantos al final del cultivo se vió afectado significativamente por la combinación de los distintos fitorreguladores utilizados en este ensayo, mientras que el peso seco (PS) siguió una tendencia similar sin encontrarse diferencias significativas ($p > 0,05$). En los tratamientos que solo se aplicaron 3 concentraciones diferentes de un solo regulador de crecimiento (del tratamiento N° 2 al 10), se encontró que el aumento de las auxinas, ya sea ácido naftalenacético (ANA) o ácido 3-indolacético (AIA), provoca un aumento en el PS y en el PF de las raíces, el cual es significativo ($p < 0,05$) para el AIA. La citocinina 2iP provocó el efecto contrario, es decir que tanto los PF como PS de las raíces fueron menores que en el control sin el agregado de reguladores de crecimiento y disminuyeron con el aumento de concentración, aunque dicha diferencia no fue significativa. Para el resto de los tratamientos (del N°11 al 28), en los cuales se utilizó una combinación de ambos tipos de reguladores, se obtuvo, como era de esperar, un mayor peso radicular cuando disminuyó la concentración de 2iP en el medio de cultivo; ya sea en combinación con ANA o con AIA. A pesar de que las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos, esta tendencia confirma que la citocinina 2iP tiene un efecto negativo en la producción de raíces, ya sea sola o en combinación con auxinas, respecto a los tratamientos con auxinas solas o sin reguladores. Para otra especie perteneciente a la misma familia, como es el caso de *Amaryllis sp.*, evaluada en un medio de proliferación de vástagos, se encontró el mismo efecto provocado por la adición de los mismos fitorreguladores. Esto es debido a que normalmente las auxinas como ANA o AIA inhiben el desarrollo de nuevas yemas caulinares y estimulan la producción de raíces. Por otra parte las citocininas, como la benzilaminopurina (BAP) o el 2iP, aplicadas *in vitro* inducen la producción de yemas caulinares e inhiben la formación de raíces (Kerbaui, 1984).

En cuanto a la biomasa de hojas (Tabla 2.3), en los tratamientos del N°2 al 10 se encontró una tendencia similar a la hallada con las raíces; las auxinas solas provocaron un aumento en el PF y la citocinina una disminución respecto al control ($p > 0,05$). Por otra parte, el peso y la longitud fueron mayores en todos aquellos tratamientos que contenían la máxima concentración de AIA (10 mg L^{-1}), solo o en combinación con 2iP (Tratamientos N°7, 26, 27 y 28). Una tendencia similar se obtuvo en los tratamientos con mayor concentración de ANA en combinación con 2iP, aunque la misma no fue tan marcada.

La variación en el peso de los bulbos no fue muy grande (Tabla 2.3), pero sí mostró un aumento significativo respecto al control cuando se agregó AIA solo al medio de cultivo (tratamientos N° 5, 6 y 7) o en la concentración más alta (10 mg L⁻¹) en combinación con 2iP en las tres concentraciones (tratamientos N° 26, 27 y 28), sin embargo las diferencias no fueron significativas (p>0,05). La combinación AIA 10 mg L⁻¹ – 2iP 1 mg L⁻¹ (tratamiento número 27) indujo el mayor peso promedio de bulbos dentro de todas las combinaciones evaluadas, presentando diferencias significativas respecto a los tratamientos N° 16, 22 y 23. En cuanto al diámetro promedio de los bulbos, únicamente se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento N° 26 (3,7 mm) y el 16 (1,7 mm).

Tabla 2.3: Producción de biomasa de bulbos y brotes de *H. tubispathus* obtenidos por twin scaling. Efectos del ANA y del AIA solos o en combinación con 2iP. Se muestran el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) de hojas, raíces y bulbos; y el diámetro del bulbo (mm) y el largo de la hoja (cm). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

N° trat.	ANA mg L ⁻¹	AIA mg L ⁻¹	2iP mg L ⁻¹	Hoja (mg)		Raíz (mg)		Bulbo (mg)		Diámetro bulbo (mm)
				PF	PS	PF	PS	PF	PS	
1	0	0	0	16,4 AB	8,1 ABC	122,3 D	17,7 CDE	79,3 AB	17,8 A	3,6 AB
2	0,011	0	0	20,6 AB	4,6 ABC	151,2 D	14,4 CDE	65,9 AB	11,9 A	3,0 AB
3	0,053	0	0	30,6 AB	9,1 AB	231,6 BCD	21,3 BCDE	77,2 AB	15,7 A	3,0 AB
4	0,106	0	0	24,0 AB	5,4 ABC	381,8 BCD	31,2 BCD	59,4 AB	14,7 A	2,5 AB
5	0	0,1	0	44,3 AB	5,7 ABC	171,7 D	12,9 DE	97,9 AB	14,5 A	3,5 AB
6	0	1	0	34,4 AB	3,1 BC	247,8 BCD	16,1 CDE	118,1 AB	12,9 A	3,2 AB
7	0	10	0	75,2 A	9,8 A	826,6 A	56,4 A	126,1 AB	18,3 A	3,4 AB
8	0	0	0,1	11,1 B	3,7 ABC	67,6 D	7,6 E	57,6 AB	8,9 A	3,0 AB
9	0	0	1	14,5 AB	4,9 ABC	38,2 D	5,8 E	78,5 AB	11,1 A	3,4 AB
10	0	0	10	10,7 B	2,8 BC	30,0 D	5,2 E	77,3 AB	7,3 A	3,1 AB
11	0,011	0	0,1	30,9 AB	4,3 ABC	229,3 BCD	15,4 CDE	86,6 AB	10,3 A	2,8 AB
12	0,011	0	1	9,9 B	1,8 C	67,8 D	7,6 E	63,9 AB	9,9 A	2,9 AB
13	0,011	0	10	31,0 AB	3,8 ABC	71,6 D	9,5 E	53,2 AB	7,0 A	2,3 AB
14	0,053	0	0,1	36,5 AB	4,8 ABC	362,3 BCD	25,1 BCDE	50,0 AB	7,1 A	2,9 AB
15	0,053	0	1	37,6 AB	6,0 ABC	242,5 BCD	18,1 BCDE	79,2 AB	10,7 A	2,4 AB
16	0,053	0	10	39,5 AB	4,5 ABC	75,3 D	9,2 E	37,1 B	5,2 A	1,7 B
17	0,106	0	0,1	49,1 AB	4,8 ABC	421,8 BCD	25,9 BCDE	78,8 AB	11,5 A	3,0 AB
18	0,106	0	1	34,5 AB	3,6 ABC	212,6 CD	16,1 CDE	67,3 AB	9,5 A	3,3 AB
19	0,106	0	10	47,4 AB	5,8 ABC	111,1 D	16,0 CDE	58,9 AB	7,8 A	2,0 AB
20	0	0,1	0,1	20,0 AB	4,4 ABC	105,2 D	9,1 E	47,1 AB	9,4 A	2,5 AB
21	0	0,1	1	14,3 AB	3,1 BC	58,9 D	6,8 E	58,5 AB	9,7 A	2,8 AB
22	0	0,1	10	26,3 AB	2,8 ABC	36,8 D	6,1 E	34,4 B	5,2 A	2,2 AB
23	0	1	0,1	12,2 B	3,3 ABC	174,5 D	18,7 E	41,7 B	7,3 A	2,7 AB
24	0	1	1	28,5 AB	4,3 ABC	162,3 D	11,7 DE	73,9 AB	12,0 A	2,8 AB
25	0	1	10	30,0 AB	4,1 ABC	74,8 D	8,3 E	64,9 AB	9,5 A	2,7 AB
26	0	10	0,1	49,4 AB	7,1 ABC	614,8 AB	38,3 AB	107,7 AB	13,9 A	3,7 A
27	0	10	1	53,9 AB	5,5 ABC	587,8 ABC	35,2 ABC	151,1 A	17,2 A	3,4 AB
28	0	10	10	55,2 AB	5,8 ABC	259,7 BCD	18,6 BCDE	116,5 AB	10,3 A	3,0 AB

Si bien la tasa de propagación no evidenció diferencias significativas y fue muy baja en promedio, con gran variabilidad entre explantos; los valores extremos fueron para los tratamientos N°23 (1 mg L⁻¹ AIA + 0,1 mg L⁻¹ 2iP) donde se encontró una multiplicación casi nula (1,1 vástagos por explanto) y N° 7 (AIA 10 mg L⁻¹) con 3,5 vástagos promedio por explanto (Figura 2.3).

En micropropagación de *Rodophiala bagnoldii* (Amarilidácea nativa de Chile) se encontró que el tratamiento que contenía 2,5 µM (12 mg L⁻¹) 2iP producía un menor peso fresco total (Olate y Bridgen, 2005). Ello está en buen acuerdo con lo obtenido en el presente ensayo para *Habranthus tubispathus*, en el tratamiento N° 10, el cual es casi equivalente a la concentración utilizada en *R. bagnoldii*, y en los otros con 2iP solo. Además, en el estudio mencionado, los tratamientos con diferentes dosis de 2iP produjeron un número similar de bulbos que los producidos por las plantas de control. Esto también coincide con lo hallado en *H. tubispathus*, en los tratamientos que solo contenían 2iP como regulador de crecimiento, representados por los tratamientos 8, 9 y 10, con tasas promedio de propagación de 1,2, 1,5 y 1,3 respectivamente (Figura 2.3).

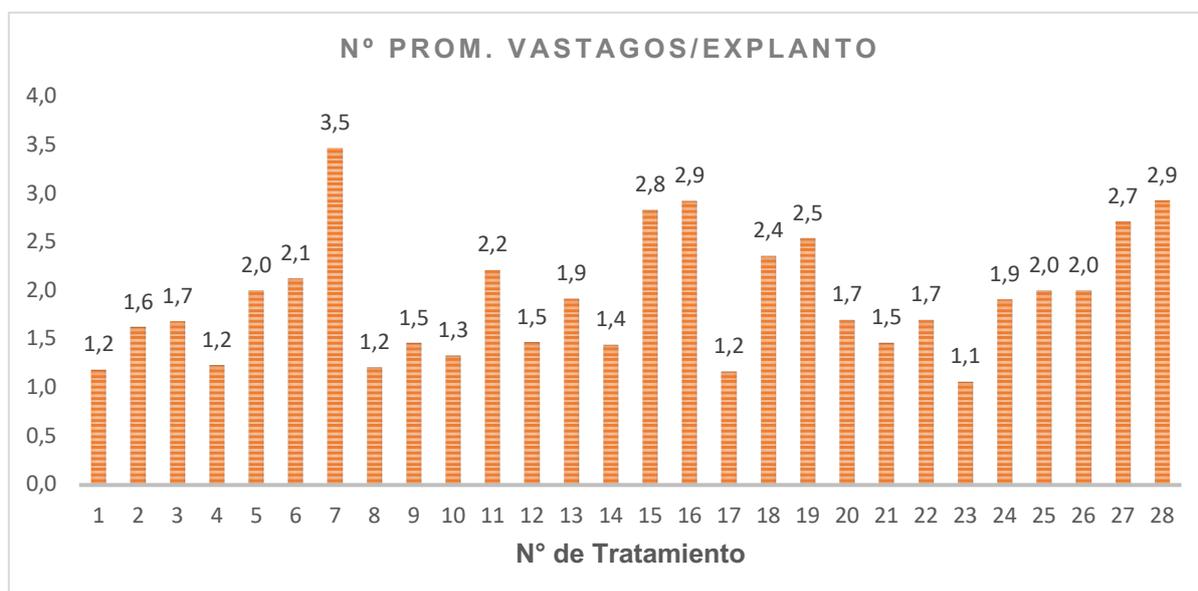


Figura 2.3: Producción de vástagos por explanto en *twin scaling* de *H. tubispathus*. Efectos del ANA y del AIA solos o en combinación con 2iP. No se encontraron diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$).

El ANA se utiliza durante la fase de enraizamiento en la micropropagación de un gran número de especies bulbosas, incluyendo algunas Amarilidáceas (George, 1996). Además puede estimular la formación de bulbos (Hartmann *et al.*, 1990). Sin embargo, para el género *Hippeastrum*, Flores (2003) informó que el ANA inhibía la formación de bulbos en la micropropagación y que inducía un mayor número de raíces cuando se comparaba con AIA o AIB. Seabrook y Cumming (1977) y Slabbert *et al.* (1993), trabajando en micropropagación

de las Amarilidáceas *Hippeastrum spp.* y *Crinum macowani*, respectivamente, encontraron que la mayor producción de brotes a partir de bulbos seccionados cultivados *in vitro* ocurría en aquellos casos en que los medios no contenían citocininas. Cuando se utilizó $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, sólo o combinado con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BA, se formaron raíces y no hubo aumento en la cantidad de brotes en ninguno de los casos.

La baja tasa en la producción de vástagos por explanto de este experimento pudo deberse a factores tales como la dormición natural de los bulbos, la cual ha sido observada después de varios subcultivos en varias Amarilidáceas (Mielke *et al.*, 1989, Gerrits y De Klerk, 1992; George, 1996), y la fuerte dominancia apical de la yema principal (Hussey y Hargreaves, 1974; Bergoñon *et al.*, 1992). Estos caracteres son asociados a menudo con una baja producción de vástagos *in vitro*, principalmente en especies de plantas bulbosas. Por lo tanto, es posible que tengan alguna relación con la escasa respuesta a las distintas concentraciones de reguladores de crecimiento utilizadas (Flores, 2003).

A fin de desafiar esta hipótesis, y con el principal objetivo de aumentar la tasa de multiplicación, y de esta forma completar un protocolo eficiente de micropropagación como el propuesto, se planteó un nuevo ensayo utilizando solo una auxina (AIA) en combinación con dos citocininas, 2iP y 1-phenyl-3-(1,2,3 thiadiazol-5-yl) urea (TDZ). Esta selección fue realizada principalmente debido al efecto que posee el TDZ en la multiplicación de vástagos, por sobre otras citocininas como son BAP, cinetina y zeatina. Aquel regulador de crecimiento era capaz de disparar la iniciación de los brotes para varias especies; como ejemplos de ello podemos mencionar a la Amarilidácea *Cyrtanthus mackenii* (Joseph *et al.*, 2016), *Lilium*, donde tal habilidad del TDZ para disparar la multiplicación está bien documentado (Park *et al.*, 1996). Lo mismo ocurrió con *Urginea maritima* donde el TDZ provocó un aumento de la regeneración de bulbos (Aasim *et al.*, 2008).

2.3.1.2 Producción de biomasa de bulbos y brotes por Twin scaling en *H. tubispathus*. Complemento de reguladores de crecimiento en medios de cultivos: ácido indol-3-acético (AIA), 6-(γ , γ -dimetilalilamino) purina 2iP y Thidiazuron (TDZ)

La contaminación promedio durante el establecimiento en este ensayo fue de 32 % de los explantos, producida mayoritariamente por bacterias y hongos. Si bien no representa una alta eficiencia, como mencionamos para el ensayo anterior, la desinfección ha resultado ser un proceso más complejo de controlar para otras especies de la familia Amaryllidaceae (Ault, 1995; Smith *et al.*, 1999; Paredes *et al.*, 2014). Por lo tanto, podemos decir que la contaminación hallada en este ensayo representa un valor relativamente bajo para una desinfección proveniente de explantos retirados de sustrato en invernáculo, y resulta aceptable como inicio de un cultivo bajo condiciones de asepsia.

La formación de brotes se produjo a partir del tejido de la placa basal y, en la mayoría de los casos, éstos se desarrollaron entre las dos escamas del explanto (Figura 2.4A). Si bien la inducción de brotes ocurrió en todos los tratamientos (Figura 2.5), hubo varias combinaciones de fitorreguladores que produjeron mayor cantidad de explantos sin respuesta y que presentaron distinto grado de oxidación (Figura 2.4B). Este efecto se encontró principalmente en los tratamientos con altas dosis de citocininas, i.e. 10 o 50 mg L⁻¹ 2iP y 5 y 10 mg L⁻¹ de TDZ, siendo esta última concentración la que produjo mayor porcentaje de explantos sin respuesta.

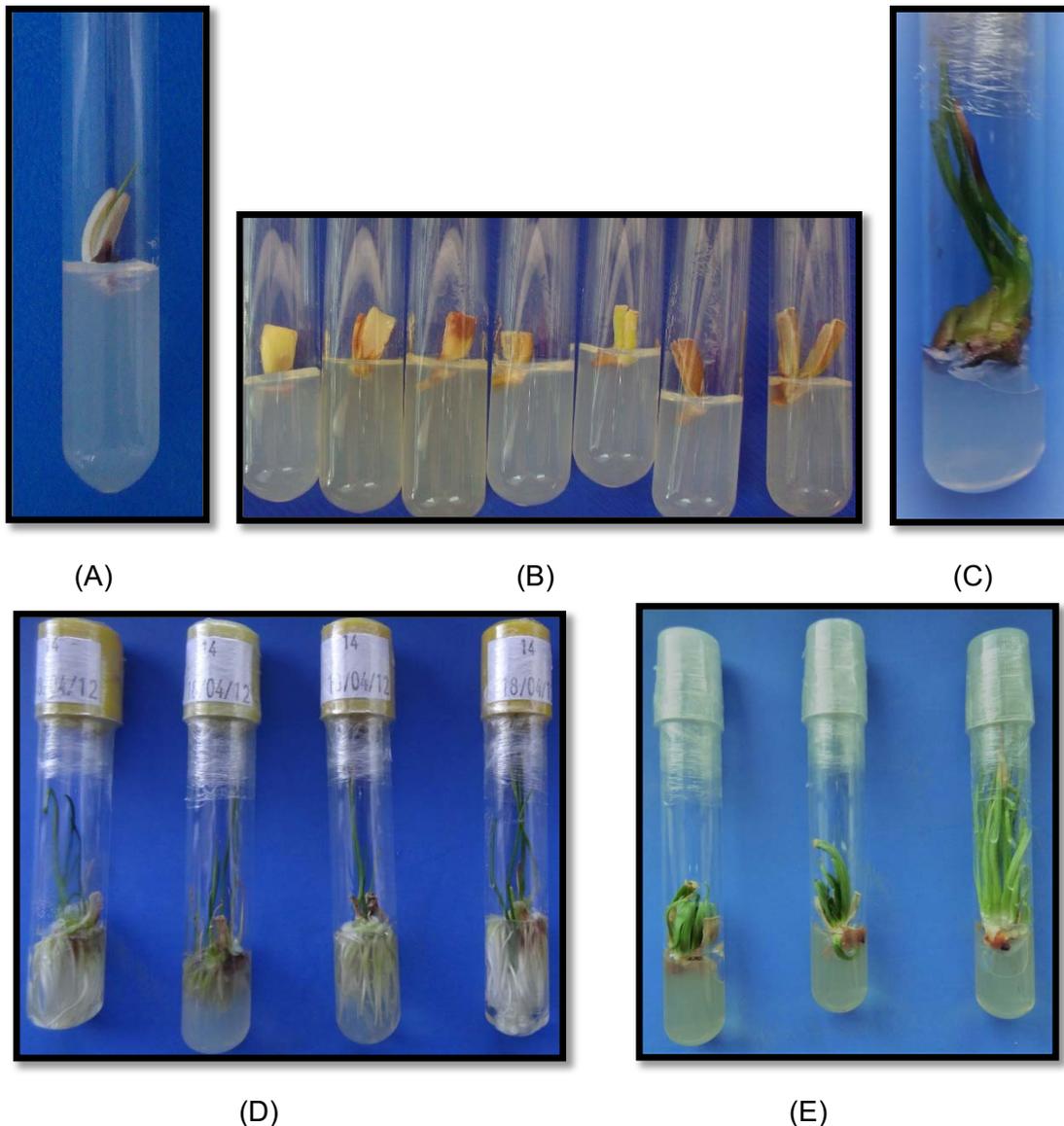


Figura 2.4: Fotografías mostrando la respuesta a *twin scaling* en *H. tubispathus*. **A.** Evidencia de una nueva brotación a partir del disco basal entre ambas escamas del explanto. **B.** Tratamientos sin respuesta con distintos grados de oxidación. **C.** Callosidades reemplazando a raíces. **D.** Crecimiento radicular exuberante en tratamiento N°14. **E.** Distintos grados de multibrotación.

En cuanto al desarrollo y crecimiento de hojas, tanto el PF como el PS fueron mayores en los tratamientos con TDZ respecto a aquellos valores correspondientes a los tratamientos que contenían 2iP y hubo un incremento al aumentar la concentración de AIA en el medio (Tabla 2.4). Por otra parte, el 2iP también produjo un aumento en la biomasa foliar comparado con el control cuando se combinó con altas dosis de AIA.

El desarrollo y crecimiento radicular tuvo un comportamiento significativamente diferente entre los distintos tratamientos probados (Tabla 2.4). La mayor biomasa radicular se produjo en aquellos que contenían la mayor concentración de AIA (50 mg L^{-1}) en combinación con las 3 concentraciones de 2iP, y dentro de estos podemos destacar al tratamiento con 2iP 1 mg L^{-1} (N°14) como el que mayor PF y PS radicular tuvo; esto condice con lo observado visualmente (Figura 2.4D). También hubo evidencia del efecto que tienen las citocininas en la producción de raíces, ya que en todos los tratamientos que tenían la concentración máxima 2iP o TDZ, las raíces se vieron reemplazadas en su totalidad por callosidades, contrarrestando el efecto de la auxina en cualquiera de sus concentraciones (Figura 2.4C). Este resultado muestra la acción conjunta sobre la respuesta fisiológica que se desencadena cuando se combinan auxinas y citocininas, la cual fue sugerida por Takayama y Misawa (1982) en su trabajo con *Lilium*, donde una alta relación citocinina/auxina resulta en la formación de brotes y bulbos en detrimento de la formación de raíces, coincidiendo con Saniewski (1992) y Brown y Charlwood (1990). Este efecto también fue observado en *Hippeastrum aulicum* (Flores, 2003), donde hubo mayor producción de biomasa radicular cuanto menor fue la concentración de citocininas en el medio de cultivo.

La biomasa de bulbos tuvo un comportamiento muy variable y posiblemente esté ligada a la cantidad de vástagos producidos y al grado de diferenciación en bulbo que estos tuvieron (Tabla 2.4). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la longitud de los bulbos, ni tampoco en la relación entre el diámetro máximo y el diámetro del cuello. Existen dos tratamientos en los que no se registraron estos datos, el 7 (5 mg L^{-1} AIA + 10 mg L^{-1} TDZ) en el que prácticamente no se produjo respuesta de crecimiento, como se observa en la Figura 2.4B; y el número 18 (50 mg L^{-1} AIA + 5 mg L^{-1} TDZ) que dio como resultado principal la proliferación de hojas, resultando en bulbos demasiado pequeños para ser medidos con calibre (Figura 2.4E).

Tabla 2.4: Producción de biomasa de bulbos y brotes de *H. tubispathus* obtenidos por twin scaling. Efectos del AIA en combinación con 2iP y TDZ. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS) de hojas, raíces y bulbos y en adición; el diámetro del bulbo (mm) y el largo de la hoja (cm). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Nº trat.	AIA mg/l	2iP mg/l	TDZ mg/l	Hoja (mg)		Raíz (mg)		Bulbo (mg)		Largo del bulbo (mm)
				PF	PS	PF	PS	PF	PS	
1	0	0	0	26,0 ^{BC}	3,0 ^{CD}	213,5 ^B	18,5 ^{ABCD}	183,7 ^{AB}	40,9 ^A	6.9 ^A
2	5	1	0	89,8 ^{BC}	10,1 ^{BCD}	273,5 ^B	23,5 ^{ABCD}	151,5 ^{AB}	32,8 ^{AB}	7.0 ^A
3	5	10	0	58,8 ^{BC}	6,8 ^{CD}	196,3 ^B	26,0 ^{ABCD}	125,4 ^{AB}	26,2 ^{AB}	6.1 ^A
4	5	50	0	7,0 ^C	1,3 ^D	263,7 ^B	42,3 ^{ABCD}	36,7 ^B	9,7 ^B	6.4 ^A
5	5	0	1	206,6 ^{ABC}	18,4 ^{ABCD}	127,9 ^B	24,6 ^{ABCD}	106,7 ^{AB}	22,6 ^{AB}	5.3 ^A
6	5	0	5	162,8 ^{ABC}	14,8 ^{ABCD}	182,8 ^B	18,0 ^{ABCD}	88,7 ^{AB}	13,8 ^{AB}	6.5 ^A
7	5	0	10	180,0 ^C	2,0 ^D	48,0 ^B	4,0 ^D	113,5 ^{AB}	16,5 ^{AB}	s/d
8	10	1	0	28,3 ^{BC}	3,4 ^{CD}	115,2 ^B	11,9 ^{BCD}	70,3 ^{AB}	17,7 ^{AB}	4.9 ^A
9	10	10	0	26,9 ^{BC}	6,9 ^{CD}	41,0 ^B	6,5 ^{CD}	76,3 ^{AB}	20,0 ^{AB}	5.7 ^A
10	10	50	0	20,3 ^C	0,7 ^D	52,7 ^B	7,7 ^{CD}	28,5 ^B	7,5 ^B	5.5 ^A
11	10	0	1	147,2 ^{ABC}	16,5 ^{ABCD}	83,0 ^B	9,4 ^{BCD}	58,0 ^{AB}	9,5 ^B	6.0 ^A
12	10	0	5	236,1 ^{ABC}	19,8 ^{ABCD}	128,4 ^B	19,1 ^{ABCD}	48,6 ^B	8,1 ^B	5.0 ^A
13	10	0	10	116,4 ^{ABC}	13,8 ^{ABCD}	84,7 ^B	17,5 ^{ABCD}	51,2 ^B	9,2 ^B	4.9 ^A
14	50	1	0	84,0 ^{BC}	5,5 ^{CD}	888,2 ^A	56,1 ^{AB}	93,8 ^{AB}	13,4 ^{AB}	6.5 ^A
15	50	10	0	56,8 ^{BC}	3,9 ^{CD}	434,1 ^{AB}	35,4 ^{ABCD}	103,3 ^{AB}	19,2 ^{AB}	6.3 ^A
16	50	50	0	115,8 ^{ABC}	11,5 ^{BCD}	463,0 ^{AB}	45,0 ^A	132,3 ^{AB}	29,5 ^{AB}	3.0 ^A
17	50	0	1	575,9 ^A	42,1 ^A	263,5 ^B	22,0 ^{ABCD}	240,9 ^A	27,2 ^{AB}	2.8 ^A
18	50	0	5	490,1 ^{AB}	38,7 ^{AB}	288,3 ^{AB}	30,3 ^{ABCD}	82,5 ^{AB}	13,0 ^{AB}	s/d
19	50	0	10	341,3 ^{ABC}	31,5 ^{ABC}	307,4 ^{AB}	42,8 ^{ABC}	161,0 ^{AB}	30,5 ^{AB}	5.5 ^A
20	5	1	1	125,2 ^{ABC}	10,2 ^{BCD}	125,4 ^B	19,7 ^{ABCD}	157,6 ^{AB}	26,9 ^{AB}	4.6 ^A

En cuanto a la multibrotación (Figura 2.5), mediante el test de Tukey se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en favor del tratamiento con 50 mg L⁻¹ de AIA en combinación con 1 mg L⁻¹ de TDZ (Nº 17), respecto del resto. Si bien este tratamiento fue claramente el que produjo el mayor número de vástagos por explanto (23,8 en promedio), el tratamiento Nº18 que contenía la misma cantidad de AIA y 5 mg L⁻¹ de TDZ, también tuvo una tasa promedio de propagación alta (8,8 vástagos por explanto). En el tratamiento Nº19, en el cual la concentración de TDZ fue aún mayor (10 mg L⁻¹), la tasa de propagación se vió más reducida (2,3 vástagos por explanto), marcando de esta manera el efecto negativo que provoca un aumento en la concentración de esta citocinina en el medio y confirmando que la concentración óptima estaría cercana a 1 mg L⁻¹. También se observó una buena tasa de

propagación (6,5 vástagos por explanto) cuando se combinaban los tres fitorreguladores AIA, 2iP y TDZ, en sus menores dosis, 5, 1 y 1 mg L⁻¹, respectivamente.

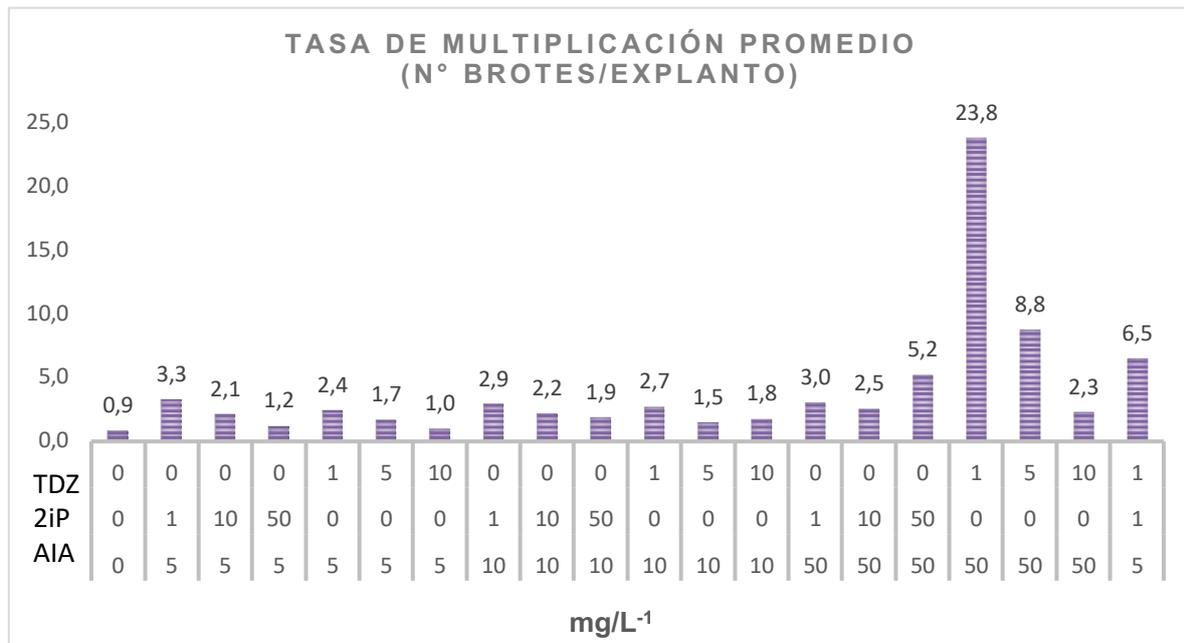


Figura 2.5: Producción de vástagos por explanto en *twin scales* de *H. tubispathus*. Efectos del AIA en combinación con 2iP y TDZ. No se encontraron diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$).

El Thidiazuron (TDZ), una fenilurea sustituida, ha demostrado ser un regulador del crecimiento altamente efectivo en varias respuestas morfogénicas y embriogénicas de diferentes especies de plantas (Mithila *et al.* 2001; Jones *et al.* 2007; Arshad *et al.* 2012; Baskaran *et al.* 2012). Característicamente, el TDZ es una citocinina potente y de bajo costo, cuya alta actividad puede atribuirse en parte a su extrema estabilidad en los tejidos vegetales (Mok *et al.*, 2000). En un estudio de propagación de la bulbosa *Tigridia pavonia*, se utilizó un medio de cultivo MS suplementado con citocininas como TDZ, zeatina, kinetina y auxinas como AIA, ANA e AIB, individualmente o en diferentes combinaciones. Como resultado el mayor número de brotes (6,4) se obtuvo en un medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ TDZ (Kumar *et al.*, 2012). Respecto al efecto en la proliferación de brotes de *Habranthus tubispathus*, observado en aquellos tratamientos que incluían TDZ en el medio, en combinación con AIA y 2iP, los resultados obtenidos son consistentes con hallazgos previos en otras especies de la misma familia, como es el caso del género *Cyrtanthus* (Ncube *et al.*, 2015), que sugieren que es ventajoso utilizar TDZ en lugar de BAP en el cultivo de tejidos de estas especies.

2.3.1.3 Producción de bulbos por twin scaling en *H. tubispathus*. Ajuste del complemento de reguladores de crecimiento

Si bien este tratamiento no estuvo contemplado en el ensayo descrito en la sección anterior, se decidió incluirlo ya que la combinación de los tres reguladores había proporcionado una buena tasa de propagación con menos AIA (5 mg L^{-1}) y había dado buen resultado cuando se lo agregó a 50 mg L^{-1} combinado solo con TDZ.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p < 0,05$). Tal como se observa en la Figura 2.6, el tratamiento con el que se obtuvo el mayor número promedio de vástagos por explanto (10,8) fue el que contenía una combinación de los 3 fitorreguladores 1 mg L^{-1} TDZ, 1 mg L^{-1} 2iP y 50 mg L^{-1} AIA.

El tratamiento con mayor multibrotación del ensayo anterior (1 TDZ y 50 mg L^{-1} AIA), produjo una proporción de multiplicación menor, i.e. 7 vástagos por explanto, pero con una gran variabilidad, porque si bien todos los explantos produjeron más de 1 vástago, hubo valores extremos entre 50 y 2 vástagos por explanto (Figura 2.7). No se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos restantes y la respuesta de los tratamientos repetidos también fue menor a la obtenida en el ensayo anterior, lo que podría deberse a una diferencia en el estado fisiológico de los bulbos entre ambos ensayos.

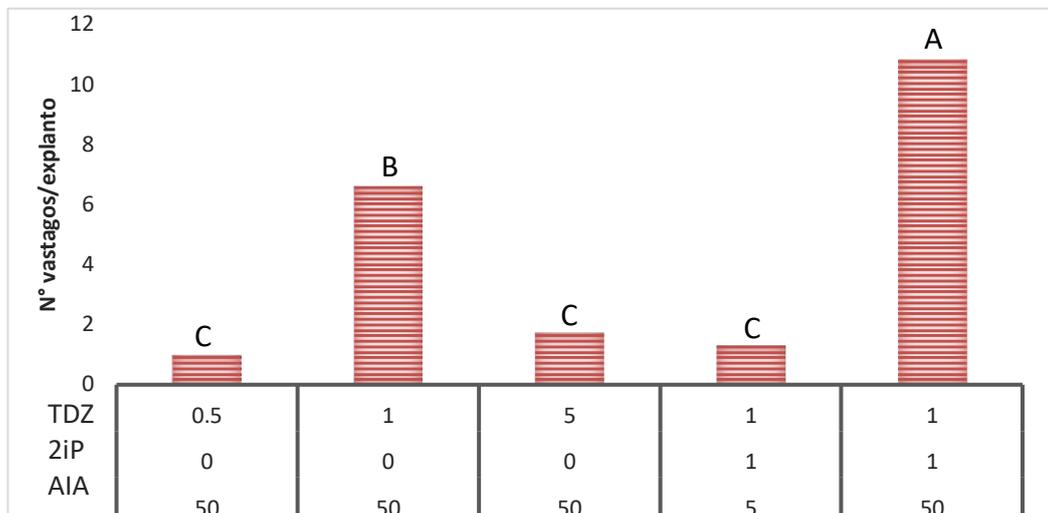


Figura 2.6: Producción de vástagos por explanto en twin scales de *H. tubispathus*. Efectos del AIA en combinación con 2iP y TDZ. No se encontraron diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$).



Figura 2.7: La figura es una muestra representativa de la multibrotación *in vitro* obtenida por twin scaling en *Habranthus tubispathus*. Medio de cultivo con 1 mg L^{-1} de TDZ + 50 mg L^{-1} AIA.

2.3.1.4 Subcultivo de tratamientos con mayor multibrotación por explanto

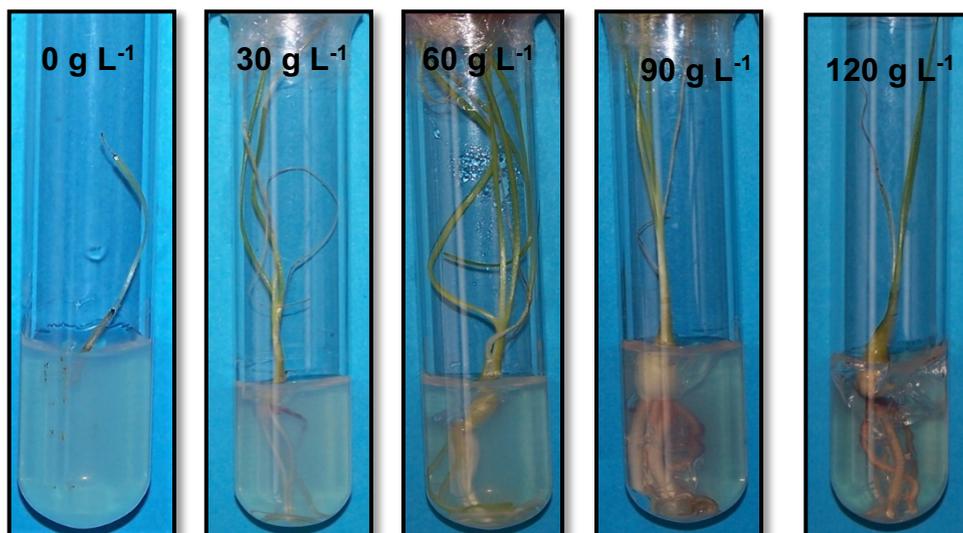
Cuando se comparó la proporción de multiplicación de ambos tratamientos, se confirmó que 1 TDZ, 1 2iP y 50 mg L⁻¹ AIA indujo cerca del doble de vástagos por explanto (6,32) que 1 TDZ y 50 mg L⁻¹ AIA (3,06). Si bien la multibrotación promedio bajó, se mantuvo en un valor aceptable para un protocolo eficiente de micropropagación.

Las proporciones de propagación obtenidas no difieren significativamente de otras especies de la familia Amaryllidaceae en las que también se han utilizado secciones de escamas de bulbo, como en *Ismene amancaes* (Pascual, 2007), o en Liliaceae, donde se obtuvo un promedio de siete brotes por explanto en *Lillium spp.* (Menzel, 2009).

2.3.2 Bulbificación *in vitro*

Los explantos que fueron cultivados en los medios sin sacarosa (control), con o sin el agregado de AIA, murieron casi en su totalidad o bien produjeron plántulas muy pequeñas (Figura 2.8). Esta respuesta estaría indicando que las microplantas de *Habranthus tubispathus* requieren para crecer de una fuente de carbohidratos solubles en el medio de cultivo, la cual puede ser sacarosa, debido a que la fotosíntesis que producen no es suficiente para sustentar su crecimiento y desarrollo en condiciones *in vitro*. Esto se debe a que por lo general en condiciones de cultivo *in vitro* las plantas no se comportan como autótrofas (George, 1993).

A



B

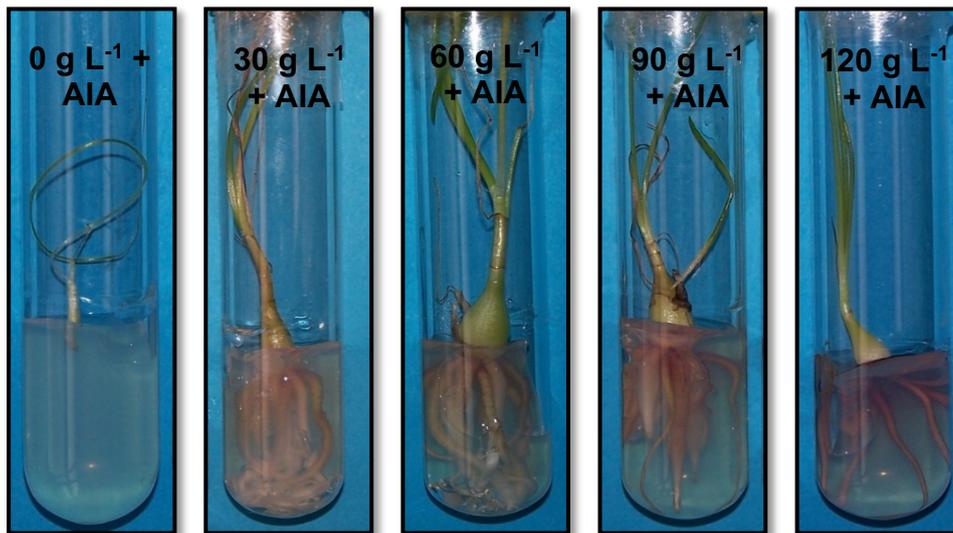


Figura 2.8: Comparación del crecimiento de bulbos de *H. tubispathus* en medio de cultivo con 0, 30, 60, 90 y 120 g L⁻¹ de sacarosa, A. con, o B. sin el agregado de 1 mg L⁻¹ de AIA.

El agregado de AIA 1 mg L⁻¹ al medio produce un aumento en la biomasa radicular, ya sea en peso fresco como en peso seco ($p < 0,05$) (Figura 2.9). Sin embargo el mayor efecto lo produce la concentración de sacarosa, que también estimula la proliferación radicular con 60 y 90 g L⁻¹ en aquellos tratamientos donde se agregó AIA, y el mismo comportamiento aunque con menor biomasa en aquellos que no contenían el regulador de crecimiento. Los dos tratamientos que contenían 120 g L⁻¹ de sacarosa produjeron menor biomasa de raíces de las microplantas, evidenciando que la sacarosa en altas concentraciones comienza a producir un efecto negativo sobre el desarrollo radicular. Esto pudo deberse a un aumento excesivo de la osmolaridad del medio. La mayor producción de materia seca radicular se produjo en el tratamiento que contenía 90 g L⁻¹ de sacarosa con el agregado de AIA (Figura 2.9) aunque sin diferencias significativas con los resultados obtenidos con otros tratamientos. De esta forma queda en evidencia el importante rol que juega el agregado no solo de sacarosa sino también de esta hormona al medio de cultivo en la producción y crecimiento radicular.

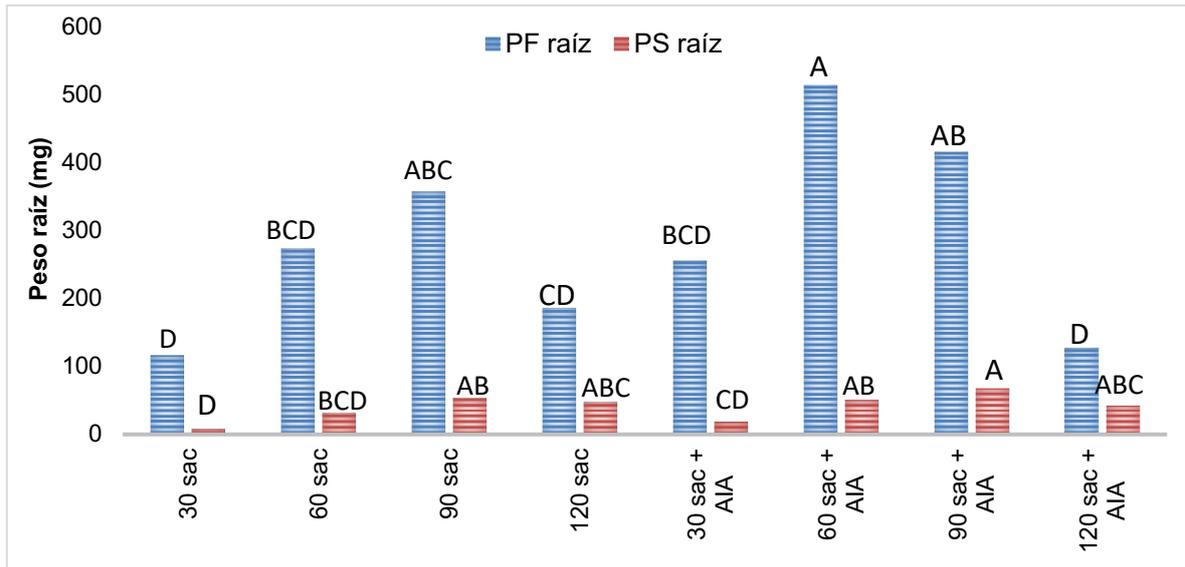


Figura 2.9: Producción de biomasa de raíces de *H. tubispathus*. Efecto de cuatro concentraciones de sacarosa, con y sin el agregado de 1 mg L^{-1} de AIA. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Entre los tratamientos que contenían AIA, el que contenía 60 g L^{-1} de sacarosa produjo el mayor peso fresco y peso seco de hojas, aunque no se encontraron diferencias significativas en peso fresco y seco respecto de aquel que contenía 30 g L^{-1} y en peso seco con el que contenía 120 g L^{-1} (Figura 2.10). No se encontraron diferencias significativas en PS entre los tratamientos que no contenían AIA. Al igual que para las raíces, el agregado de 120 g L^{-1} de sacarosa al medio también provocó una disminución del PF de las hojas, siendo este efecto mayor en el tratamiento que contenía AIA.

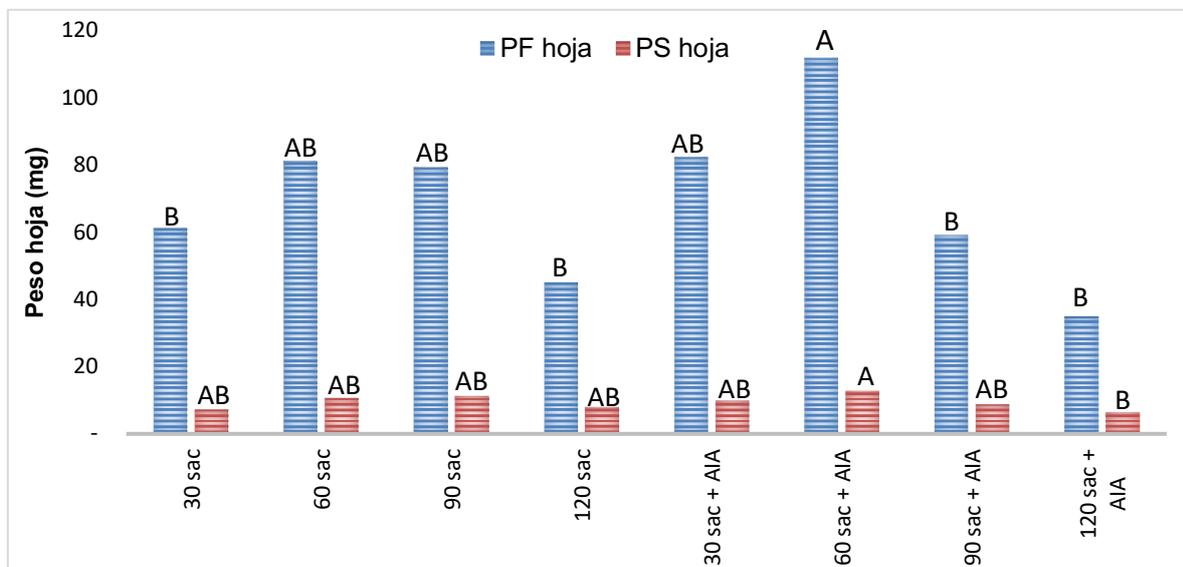


Figura 2.10: Producción de biomasa de hojas de *H. tubispathus*. Efecto de cuatro concentraciones de sacarosa, con y sin el agregado de 1 mg L^{-1} de AIA. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Los tratamientos correspondientes a los sustratos conteniendo 60 y 90 g L⁻¹ de sacarosa con el agregado de AIA y 90 g L⁻¹ de sacarosa sin AIA, fueron los que indujeron bulbos con mayor PF promedio (Figura 2.11). El agregado de 120 g L⁻¹ de sacarosa (con o sin AIA) produce bulbos de menor PF, este efecto es más marcado en el tratamiento que contenía AIA, al igual que con las raíces y hojas. Ello sería debido a un efecto osmótico negativo del carbohidrato sobre los explantos. En cuanto al PS promedio de los microbulbos (Figura 2.11), los mayores valores se dieron en los tratamientos que contenían 60, 90 y 120 g L⁻¹ de sacarosa con AIA, y 90 g L⁻¹ sin el agregado del regulador de crecimiento, sin diferencias significativas entre ellos.

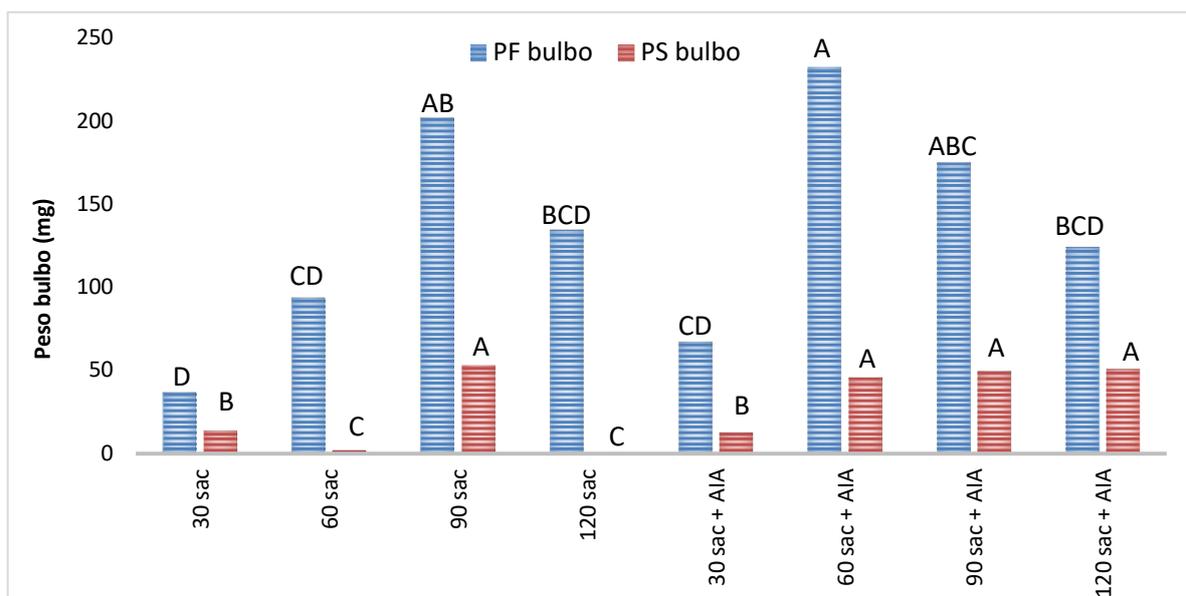


Figura 2.11: Producción de biomasa de bulbos de *H. tubispathus*. Efecto de cuatro concentraciones de sacarosa, con y sin el agregado de 1 mg L⁻¹ de AIA. Se muestran el peso fresco (PF) y los pesos secos (PS). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como ya se mencionó, se ha informado para muchas especies sobre la estimulación *in vitro* de la formación de órganos de almacenamiento vegetativo aumentando la concentración de sacarosa en el medio de cultivo (Hussey y Stacey, 1984; van Aartrijk y van der Linde, 1986; Marinangeli y Curvetto, 1997). Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo fueron informados también para otras Amarilidáceas como *Zephyranthes filifolia* (Fernández, 2008), en la cual los bulbillos con mayor PF y calibre fueron aquellos que se habían cultivado en los medios con 1 mg L⁻¹ de AIA y 60 o 90 g L⁻¹ de sacarosa. Para otra especie de la misma familia, *Cyrtanthus mackenii*, donde se evaluaron las mismas concentraciones de sacarosa, también se encontró que 60 g L⁻¹ fue la que provocó el mayor aumento en el peso de los bulbos (Joseph *et al.*, 2016). El mismo efecto se observó para

Rhodophiala bagnoldii, que evidenció el gran beneficio que proporciona aumentar la cantidad de sacarosa en el medio para producir bulbos más grandes y con mayor rapidez (Olate y Bridgen, 2005). En esta especie se obtuvieron incrementos en el crecimiento total de plantas y bulbos mediante la adición de 60 y 90 g L⁻¹ de sacarosa al medio de cultivo. También encontraron que el aumento de los niveles de sacarosa aumentaba el tamaño de los bulbos, aunque no había un aumento significativo en la cantidad de bulbos que se producían. En su trabajo, estos autores postularon que este procedimiento puede ser útil para los criadores que deseen producir bulbos de floración a partir de semillas en un período de tiempo más corto.

El efecto que produce la sacarosa en el medio de cultivo es aumentar la osmolaridad y la disponibilidad de carbohidratos, sin embargo es necesaria una cantidad mucho menor para satisfacer las necesidades nutricionales de las microplantas. Por esto, la fuerte estimulación que produce la sacarosa en la formación y crecimiento de bulbos de *Narcissus* (Chow *et al.*, 1992), que también estuvo presente en la gran cantidad de especies mencionadas incluyendo a la de estudio, podría deberse no solo a un efecto de sustrato, sino también ser un efecto osmótico (Staikidou *et al.*, 2005). Condierto que no son excluyentes uno del otro, por un lado este carbohidrato entraría en el metabolismo secundario que es donde se producen, entre otras cosas, las hormonas de crecimiento y diferenciación tisular y orgánica, y por otro lado el efecto osmótico vinculado a la turgencia celular que supone incrementarse; lo que puede afectar, dentro de un cierto rango de concentraciones, la turgencia celular de manera de favorecer el crecimiento al promover la elongación célula actuando sobre plasticidad de la pared celular. El aumento en el tamaño de los microbulbos es deseable dada la correlación positiva entre el éxito del trasplante y el tamaño de los bulbillos *in vitro* (Squires *et al.*, 1991), y también entre el tamaño del bulbo y el tiempo en llegar a la floración (Hanks, 1993).

Las etapas siguientes a la bulbificación *in vitro*, i. e. rustificación en cuarto de cultivo y luego cultivo en invernáculo, fueron cumplimentadas con éxito, con 100% de supervivencia de los microbulbos implantados en sustrato, completando de esta forma el protocolo de micropropagación *in vitro* para *Habranthus tubispathus* en un tiempo menor a 6 meses de cultivo desde establecimiento hasta plantas rustificadas.

2.4 CONCLUSIONES

Fue posible producir vástagos en medio de cultivo semisólido y luego formar nuevas plantas de *Habranthus tubispathus* utilizando la técnica de Twin scaling, partiendo de bulbos adultos. Si bien muchos explantos se contaminaron durante la fase de establecimiento (27-32 %), este porcentaje fue aceptable considerando los resultados obtenidos con otras geófitas, y que en todas ellas el material de partida fueron órganos subterráneos. El sustrato que produjo la mayor proporción de multiplicación, i.e. el mayor número de vástagos por

explanto durante la multibrotación, fue el que contenía 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2iP + 50 mg L⁻¹ AIA, obteniéndose una proporción de propagación de 10,8 para el primer subcultivo, y de 6,3 para el segundo.

Futuros estudios con la utilización de menores concentraciones de las citocininas TDZ y 2iP, respecto a las utilizadas en este ensayo, en combinación con altas concentraciones de AIA, podrían llevarse a cabo para obtener un mayor número de brotes durante la multibrotación. Sin embargo, comparando los resultados de propagación emergentes de este trabajo con los de la literatura consultada para otras especies bulbosas, se concluye que fueron iguales o superiores a aquellos, demostrando que la aplicación de Twin scaling en la micropropagación de *H. tubispathus* es una técnica de multiplicación vegetativa eficiente.

Para aumentar la biomasa total de los vástagos obtenidos durante la multibrotación o por germinación *in vitro* de semillas de *Habranthus tubispathus*, las concentraciones óptimas de sacarosa se encuentran entre 60 y 90 g L⁻¹, con el agregado de AIA 1 mg L⁻¹, constituyéndose un medio de cultivo apto para la fase de engorde de bulbos que reemplaza a la de enraizamiento de las especies no bulbosas.

Mediante el ajuste de estas dos fases de multiplicación y de engorde de bulbos, para su posterior rustificación en invernáculo, junto con el establecimiento a partir de semillas que fue ajustado previamente por Rosselló *et al.* (2004), queda ajustado un protocolo completo de micropropagación para la especie *Habranthus tubispathus* como el propuesto (Figura 2.1). El mismo nos permite estimar una proporción de propagación superior a 1500 microbulbos por bulbo en un período de dos ciclos de multibrotación (c.a. 6 meses).

Este protocolo de cultivo *in vitro* de *H. tubispathus*, tal y como fue presentado en la Figura 2.1, puede ser útil no solo para su multiplicación masiva, sino también con otros propósitos, como la conservación *ex situ*, la aplicación de otras biotécnicas, el mantenimiento y amplificación de genotipos selectos, etc.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Aasim, M., Khawar, K.M. y Ozcan, S. 2008. *In vitro* regeneration of red squill *Urginea maritima* (L.) Baker. Using Thidiazuran. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22 (4):925-928.
- Angulo, M., Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. y Codina, C. 2003. *In vitro* production of bulblets of *Cyrtanthus loddigesianus* and *Cyrtanthus speciosus*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78:441–446.
- Arshad, M., Silvestre, J., Merlina, G., Dumat, C., Pinelli, E. y Kellerhoff, J. 2012. Thidiazuron-induced shoot organogenesis from mature leaf explants of scented *Pelargonium capitatum* cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 108:315–322
- Ault, J.R. 1995. *In vitro* propagation of *Eucomis autumnalis*, *E. comosa*, and *E. zambesiaca* by twin scaling. *HortScience* 30:1441–1442.
- Baskaran, P., Ncube, B. y Van Staden, J. 2012. *In vitro* propagation and secondary product production by *Merwillia plumbea* (Lindl.) Speta. *Plant Growth Regul* 67:235–245
- Bergoñon, S., Codina, C., Bastida, J., Viladomat, F. y Mele, E. 1992. The shake liquid culture as an alternative way to the multiplication of *Narcissus* plants. *Acta Hort.* 325, 447–452.

- Boyer, C.D. 1985. Synthesis and breakdown of starch. In: Neyra, C. A. Biochemical basis of plant breeding. Florida: CRC Press. v. 1, p. 133-153.
- Bridgen, M.P. 1994. A review of plant embryo culture. Hortscience 29: 1243–1246.
- Brown, J.T. y Charwood, B.V. 1990. Organogenesis in Callus culture. In: Pollandro J. W.; Walker, J. M. Plant Cell and Tissue Culture. Methods in Molecular Biology. New Jersey: The humana Press, v. 6, p 65-70.
- Chang, H., Chakrabarty, E., Hahn, E. y Paek, K. 2003. Micropropagation of Calla Lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant* 36:129–134.
- Chen, J., Hall, D. y De Luca, V. 2005. Effects of the Growth Retardant Paclobutanol on Large-scale Micropropagation of Daylily (*Hemerocallis spp.*). *In vitro*. 41(1):58-63.
- Chiari, A. y Bridgen, M. 2000. Rhizome splitting: A new micropropagation technique to increase *in vitro* propagule yield in *Alstroemeria*. *J. Plant Cell, Tiss. Org. Cul.* 62:39-46.
- Chow, Y., Selby, C. y Harvey, M. 1992. Stimulation by sucrose of *Narcissus* bulbil formation *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 67(2): 289-293.
- Fernández, A.C. 2008. Cultivo *in vitro* de *Zephyranthes filifolia*. Trabajo final para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. Argentina.
- Fennell, C.W., Crouch, N.R. y Van Staden, J. 2001. Micropropagation of the River Lily, *Crinum variable* (Amaryllidaceae). *South African Journal of Botany* 67, 74–77.
- Fennell, C.W. y Van Staden, J. 2004. Biotechnology of southern African bulbs. *South African Journal of Botany* 70, 37–46.
- Flores, P.S. 2003. Propagação *in vitro* e *in vivo* de *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.
- Furmanowa, M. y Oledzka, H. 1983. Cap. 33: Zephyr-lily. En: Handbook of plant cell culture, Ornamental species, Vol. 5. PV Ammirato, D. Evans, W Sharp y Y Bajaj, Eds. Ed. Mc Graw Hill, 1983. 833 pp.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology (No. Ed. 2). Exegetics limited.
- George, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2: in practice (No. Ed. 2). Exegetics limited.
- Gerrits, M. y De Klerk, G. 1992. Dry-matter partitioning between bulbs and leaves in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated *in vitro*. *Acta Bot. Neerl.* 41(4): 461-468.
- Grattapaglia, D. y Machado, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. y Buso, J.A. (ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. P.331-353.
- Hanks, G.R. 1993. *Narcissus*. In: Le Nard M y De Hertogh AA (eds) *The Physiology of Flower Bulbs* (pp 463–558). Elsevier, Amsterdam
- Hartmann, H.T., Kester, D.E. y Davies, F.T. 1990. Propagation by specialized stems and roots. In: *Plant Propagation: principles and practices*. 5 Ed. New Jersey: Prentice-Hall. P.429-458.
- Hoi, G.M. y Van Der Linde P.C.G. 1992. Reduction or contamination in bulb-explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 75-79
- Hosoki, T. y Asahira, T. 1980. *Hort Science*, 15(5), 602-603.
- Hussey, G. y Hargreaves, J. 1974. Multiplication of *in vitro* plantlets in bulbous species. *Ann Rep John Innes Inst., s.l.*, 1974 58-59.
- Hussey, G. 1982. *In vitro* propagation of *Narcissus*. *Annals of Botany* 49: 707-719.
- Hussey, G. y Stacey, N.J. 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 53: 565–578
- Jones, M.P.A., Yi, Z., Murch, S.J. y Saxena, P.K. 2007. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: micropropagation in solid and liquid culture systems. *Plant Cell Rep* 26:13–19
- Joseph, S. y Kumar, L.V.N.B. 2016. Micropropagation of *Cyrtanthus mackenii* Hook. from tri scales. *Eur J Biotechnol Biosci.*; 4(8):67-72.
- Kerbauy, G.B. 1984. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of roots tips of *Catasetum* (Orchidaceae). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 113: 287-291.
- Kumar, L., Sincy, J. y Narmatha, B. 2012. Micropropagation of *Tigridia pavonia* (L.f) DC-a potential floricultural plant from twin scale explants. *Asian Pacific Journal of Reproduction*; 1(1): 38-41.
- Leopold, A.C. y Keiederman, P.E. 1975. Tuber and bulb formation. In: Fuller, M. S. y Licht, P. *Plant growth and development*. UK: MacGraw Hill Book Co. Lim. p. 337-345.

- Lilien-Kipnis, H., Ziv, M., Kahany, S., Azizbekov, N., 1992. Proliferation and regeneration of *Nerine* in liquid culture. *Acta Hort.* 325, 467–474.
- Lu, C.Y., Nugent, G. y Wardley, T. 1990. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Royal Purple). *Plant Cell. Rep* 8:733-6.
- Marinangeli, P. y Curvetto, N., 1997. Increased sucrose and salt concentrations in the culture medium improve growth of micropropagated *Lilium* bulblets. *Biocell* 21, 161–164.
- Menzel, E. 2009. Evaluación de la capacidad de regeneración *in vitro* y aclimatación de diferentes variedades híbridas de *Lilium*. Universidad Austral de Chile, Facultad de Agronomía. Tesis de Licenciatura. 57pp.
- Mielke, K.A., 1989. Anderson, W. C. *In vitro* bulblet formation in Dutch Iris. *Hortscience*, Alexandria, v. 24, n. 6, p. 1028-1031.
- Mithila, J., Murch, S., Krishna, S. y Saxena, P.K. 2001. Recent advances in *Pelargonium in vitro* regeneration systems. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 67:1–9
- Mok, M.C., Martin, R.C. y Mok, D.W.S. 2000. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:102–107
- Morán, G.P., Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. y Codina C. 2003. Mass propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. *Scientia Hort.* 98:49–60.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- Ncube, B., Finnie, J.F. y Van Staden, J. 2015. *In vitro* regeneration of *Cyrtanthus* species: ornamental plants with medicinal benefits. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 51 (1), pp. 42-51
- Olate, E. y Bridgen, M. 2005. Techniques for the *in vitro* propagation of *Rhodophiala* and *Leucocoryne* spp. *Acta Horticulturae* 673: 335 – 339.
- Pascual, M.E.P. 2007. Propagación *in vitro* de *Ismene amancaes* (R&P.) Herbert "Amancay" (Amaryllidaceae). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Tesis de Licenciatura. 47pp.
- Paredes, K., Delaveau, C., Carrasco, P., Baeza, C., Mora, F. y Uribe, M.E. 2014. *In vitro* bulbing for the propagation of *Traubia modesta* (Amaryllidaceae), a threatened plant endemic to Chile. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 41(2), 207-214.
- Park, S.Y., Kim, S.D., Cho, J.T., Kim, T.J. y Paek, K.Y. 1996. Effect of growth regulators on *in vitro* propagation through shoot tip, bulbscale and bulblet culture of regenerated bulblet *in Lilium concolor* var. *partheneion*. *RDA J Agri Sci Bio technol.*; 38:302-306.
- Portaluppi, B., Lucero, M., Roitman, G. y Frayssinet, N. 2002. Conservación *ex-situ* de plantas nativas de la Argentina de interés ornamental: *H. martinezii* (Amaryllidaceae). Libro de Resúmenes 1er Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales y 4ta Jornadas Nacionales de Floricultura: 103.
- Rosselló, F., Marinangeli, P. y Curvetto, N. 2004. Establecimiento *in vitro* de plántulas de *Habranthus tubispathus*. *Actas* (ISBN 987 521 142-7). II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales, I Encuentro latinoamericano de Floricultura. Buenos Aires. 106-109.
- Saniewski, M. y Kawa-Miszczak L. 1992. Hormonal control of growth and development of tulips. *Acta Hort.* 325:43–54.
- Santos, J., Santos, I. y Salema, R. 1998. *In vitro* production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth. *Scientia Horticulturae* 76:205–217.
- Santos, I. y Salema, R. 2000. Promotion by jasmonic acid of bulb formation in shoot cultures of *Narcissus triandrus* L. *Plant Growth Regulation*, 30, 133±8.
- Schiappacasse, F., Peñailillo, P. y Yañez P. 2003. Propagación de bulbosas chilenas ornamentales. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 65 pp.
- Seabrook, J. y Cumming B. 1977. The *in vitro* propagation of *Amaryllis* (*Hippeastrum* spp. hybrids). *In vitro* 13(12): 831-836.
- Seabrook, J.E.A. 1990. *Narcissus* (Daffodil). In: Academic Press. DA, Sharp WT, Bajaj YPS, eds. *Handbook of plant cell culture* Vol. 5. Ornamental species. New York: McGraw Hill, 577-597.
- Slabbert, M., De Bruyn, M., Ferreira, D. y Pretorius J. 1993. Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum macowanii in vitro*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 33:133-141.
- Smith, R.H., Burrows, J. y Kurten, K. 1999. Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippesatrum* sp. (Amaryllidaceae). *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 35:281–282.
- Smith, J. 2000. Micropropagation of the Gynea Lily. Rural Industries Research & Development Corporation. p 50.

- Sochacki, D. y Orlikowska, T. 2005. The obtaining of narcissus plants free from potyviruses via adventitious shoot regeneration *in vitro* from infected bulbs. *Scientia Horticulturae* 103:219–225.
- Squires, W.M., Langton, F.A. y Fenlon, J.S. 1991. Factors influencing transplantation success of micropropagated *Narcissus* bulblets. *J. Hortic. Sci.* 66: 661–671
- Staikidou, I., Watson, S., Harvey, B.M.R. y Selby, C. 2005. *Narcissus* bulblet formation *in vitro*: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 80:313–320.
- Takayama, S. y Misawa, M. 1980. Differentiation in liliun bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiol. Plant.* 48: 121-125.
- Takayama, S. y Misawa, M. 1982. Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scales growth *in vitro*. *Plant cell Physiology, Tokyo*, v. 23, n.1, p. 67-74.
- Van Aartrijk, J. y van der Linde, P.E.C. 1986. *In vitro* production of flower bulb crops. In: Zimmerman RH, Griesbach RJ, Hamerschlag FA, Lawson BRH, eds. *Tissue culture as a plant propagation system for horticultural crops*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 317-331.
- Vassil, I.K. y Thorpe, T.A. 1994. *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 593p.
- Vargas, T.E., Oropeza, M. y de Garcia, E. 2006. Propagación *in vitro* de *Hippeastrum sp.* *Agronomía Trop*, 56(4), 621-626.
- Vidor, M.A. 1997. Técnicas assépticas para limpeza de bulbos de algumas ornamentais cultivadas *in vitro*. *Revista Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v. 10, n.2, p.49-54.

3. CAPITULO 3 - Estudios de la Biología floral de *Habranthus tubispathus*

3.1 INTRODUCCIÓN

La floración de las geófitas depende de factores genéticos, fisiológicos y ambientales. Así, las diferentes especies deben llegar a un estado fisiológico determinado antes de que sean capaces de florecer, lo que puede tomar menos de un año hasta seis años desde su emergencia como plántulas (De Hertogh y Le Nard, 1993). En algunas bulbosas la capacidad de floración está directamente relacionada con el tamaño del órgano geofítico, el cual varía de acuerdo al género. Por ejemplo, *Hippeastrum* florece cuando los bulbos alcanzan una circunferencia de aproximadamente 20 cm (equivalente a 6 cm de diámetro), *Scadoxus* florece cuando la circunferencia del órgano geofítico es de 15 cm (4,5 cm de diámetro), mientras que para *Eucharis* los bulbos necesitan alcanzar una circunferencia de 3 a 5 cm (1 cm de diámetro) antes de que se produzca la primera floración (Theron y De Hertogh, 2001).

Un número de factores ambientales afectan el crecimiento, desarrollo y floración de las bulbosas. Estos incluyen su hábitat natural y los parámetros relacionados con el microclima, como el rango de temperatura, la lluvia, la radiación solar, el fotoperiodo, la altitud, la humedad, el tipo de suelo y la disponibilidad de nutrientes. Con la excepción de algunas áreas ecuatoriales que tienen ambientes bastante uniformes, las geófitas a menudo están expuestas a una amplia gama de condiciones climáticas durante su ciclo de crecimiento (De Hertogh y Le Nard, 1993).

Entre los factores ambientales que afectan el crecimiento y desarrollo del bulbo, los más importantes son la temperatura, la luz y la humedad. Estas condiciones ambientales pueden ser manipuladas para forzar¹ a los bulbos, debido a que actúan directamente sobre las raíces, el desarrollo de flores, la elongación de los tallos y la bulbificación (engrosamiento del bulbo). La temperatura es el factor externo que controla el crecimiento, el desarrollo, la floración, la latencia y la madurez fisiológica de los bulbos. La intensidad lumínica y el fotoperiodo afectan también a varios procesos fisiológicos, principalmente la fotosíntesis, y su provisión anómala puede ser causa de fisiopatías como el aborto y la abscisión de flores (Bryan, 1989).

En cuanto a los géneros *Habranthus* y *Zephyranthes*, la formación de los primordios florales se produce de forma alternada o simultánea con la formación de las hojas durante el período invernal. En el caso particular de estas especies, los botones florales (yemas

¹ Técnica para programar la floración de una especie ornamental en una época determinada fuera de la natural. La técnica de forzado generalmente consiste en la manipulación externa de factores ambientales como la temperatura, el fotoperíodo, la humedad, etc.

florales jóvenes en desarrollo y de un año de edad) están presentes entre las catáfilas del bulbo, y se mantienen de forma latente allí hasta que las condiciones ambientales son favorables para continuar su desarrollo y crecimiento.

Dentro de las especies de la familia Amaryllidaceae se han realizado pocos estudios palinológicos hasta el momento. Para el caso particular de *Habranthus spp.* Herb., la primera referencia la aportó Alves-Araújo *et al.* (2007) y se limita a la descripción morfológica. Estos autores informaron que esta especie posee granos de polen grandes, achatados en los polos, dando una forma esférica-ovalada. Además poseen un surco principal, que es tan largo como los mayores diámetros ecuatoriales y márgenes irregulares. La ornamentación de los granos de polen de esta especie no difiere de la de los taxones que fueron analizados para otras Amaryllidaceae. El patrón reticulado está muy difundido, siendo constatado en los géneros *Crinum L.* (Huang, 1972; Erdtman, 1966), *Eucharis Planch.* (Meerow y Dehgan, 1988), *Haemanthus L.* (Sharma, 1967), *Hymenocallis Salisb.* (Huang, 1972; Erdtman, 1966), *Lycoris Herb.* (Huang, 1972), *Narcissus L.* (Huang, 1972), entre otros.

La germinación del polen y el crecimiento de los tubos polínicos son, en principio, necesarios para la fecundación y la formación de semillas de plantas con flores. Estudios *in vitro* sobre la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico son muy útiles para explicar la presencia o ausencia de fertilidad (Pfahler, *et al.* 1997), y no se han realizado para especies del género *Habranthus*. La germinación del polen *in vitro* es uno de los métodos más convenientes y fiables utilizados para probar la viabilidad de los granos de polen frescos o almacenados. Es una herramienta valiosa para abordar cuestiones básicas de la reproducción sexual, debido a que la capacidad de fertilización de los granos de polen depende tanto de la germinación como del crecimiento del tubo polínico (Gwata *et al.*, 2003).

3.1.1 Viabilidad y longevidad polínica

Existen diversos factores que afectan la viabilidad polínica (VP), tanto en el momento de la colecta como en almacenaje. Entre ellos se pueden nombrar factores ambientales como la humedad relativa, la temperatura y la radiación solar (Kearns e Inouye, 1993). Estos factores afectan la VP en dos momentos críticos: el primero durante su desarrollo dentro de la antera y el segundo es después de la dehiscencia, cuando los granos de polen quedan expuestos al ambiente. El efecto que estos factores tienen en la VP depende de la fisiología del grano de polen y de la presencia o ausencia de modificaciones estructurales en los mismos (Bots y Mariani, 2005).

Otros factores que afectan la VP son el tiempo transcurrido desde la dehiscencia de las anteras y momento de colecta del polen, la hora del día en que se colecta el polen, el estado de desarrollo floral de la planta donadora y la metodología usada en la colecta del polen (anteras y/o flores completas) (Kearns e Inouye, 1993). En general, la VP es máxima en

el momento de dehiscencia de la antera, disminuyendo rápidamente a través del tiempo, aún más si es expuesto al ambiente (Kearns e Inouye, 1993).

Bots y Mariani (2005) concluyen que el polen es viable bajo una gran variedad de circunstancias y que la VP se ve afectada hasta cierto punto por los factores ambientales mencionados anteriormente. Además, el efecto que las mismas producen es estrictamente dependiente de la especie en cuestión y varias poseen adaptaciones para evitar la pérdida de viabilidad. Considerando los factores en conjunto, parecería que la VP es afectada por el ambiente, pero que no se pierde completamente dentro de ciertos límites; esto es obvio considerando la función de transferencia del gameto masculino que tiene el polen en las plantas. Además, algunos estudios han demostrado que los mismos factores que afectan la viabilidad del polen a campo influyen de la misma forma durante su almacenamiento (Bots y Mariani, 2005).

Si bien la interacción más directa entre los granos de polen y el ambiente ocurre después de que son liberados de la antera, en algunos casos, la ocurrencia de estreses durante el desarrollo del polen dentro de la antera puede afectar fuertemente su viabilidad. Los estreses que reducen la viabilidad son diferentes, pero el efecto que producen en el polen es similar e involucra cambios en la concentración de azúcar y de almidón, así como también de enzimas que participan en el metabolismo de los mismos (Bots y Mariani, 2005). Por el contrario, el crecimiento del tubo polínico en el estilo es relativamente insensible a estreses.

3.1.1.2 Evaluación de la viabilidad polínica

La estimación de la viabilidad de los granos de polen es un parámetro importante al momento de realizar cruzamientos, para evaluar la capacidad reproductiva de híbridos y para conocer su longevidad y eficiencia de almacenamiento. Considerando la función que posee el polen en el ciclo de vida de la planta, una de las vías para evaluar la VP es realizar la polinización de los estigmas y luego analizar la producción de semillas a partir de flores auto-fecundadas o de polinización cruzada. A pesar de que este método puede indicar la presencia o ausencia de polen fértil, solo puede proporcionar un valor de viabilidad relativo y no permite determinar el verdadero nivel de viabilidad. Sumado a esto, posee la desventaja de requerir un tiempo prolongado para la estimación de la VP (Kearns e Inouye, 1993).

En condiciones de laboratorio, la viabilidad se puede cuantificar con mayor precisión mediante ensayos simples: evaluación de la germinación del polen *in vivo* o *in vitro* (Artschwager y McGuire, 1949; Lansac *et al.*, 1994), mediante el uso de colorantes vitales (Sun *et al.*, 1991) incluyendo azul de anilina para detectar calosa en tubos de polen o yodo para determinar el contenido de almidón (Brooking, 1979; Heslop-Harrison *et al.*, 1984), o por la medición de la actividad enzimática. Se considera que la germinación del polen *in vitro* es la que provee la mejor estimación de la VP *in vivo* (Stone *et al.*, 1995). El porcentaje de

viabilidad se mide contando los granos que han germinado respecto del total al ser cultivados durante un tiempo determinado en un medio que generalmente contiene ácido bórico y un compuesto osmóticamente activo (Taylor y Hepler, 1997). Una desventaja de este método, es que la germinación en los medios de cultivo puede ser distinta a aquella que se produce sobre el estigma, y brindar como resultado una subestimación de la VP. Esto se debe a que la superficie estigmática proporciona todas las condiciones ideales para que este proceso se desencadene. Para muchas especies el boro y el calcio son dos elementos esenciales para que se produzca germinación y el crecimiento del tubo polínico. El boro es suministrado por el estigma y el estilo, facilitando el transporte del azúcar y posee un rol en la producción de pectina en el tubo polínico al igual que el calcio, el cual se encuentra en la superficie de algunos granos de polen y es requerido frecuentemente en la germinación para controlar las condiciones osmóticas, y su gradiente puede regular el crecimiento del tubo polínico en el estilo. Kearns e Inouye (1993) mencionan 79 géneros que requieren medios con sacarosa, ácido bórico y calcio para la germinación *in vitro* del polen.

Los métodos más rápidos para analizar la VP son los que utilizan colorantes vitales que reaccionan con enzimas del polen, y de este modo indican la presencia de contenidos celulares intactos. Una de las estimaciones utilizadas es la tinción vital fluorocromática definida por Greissl en 1989, en el cual el diacetato de fluoresceína (FDA) es disuelto en un medio con alto contenido de sacarosa para prevenir la germinación de polen. El FDA es tomado por los granos, debido a que en condiciones normales de permeabilidad puede atravesar el plasmalema, y luego queda atrapado en el interior de los mismos, si las membranas están intactas. Dentro de las células, es hidrolizado por enzimas intracelulares, y el producto fluoresce cuando es excitado por la luz ultravioleta (UV). El análisis es realizado mediante microscopio de epifluorescencia, usando dos filtros: 450 y 365 nm. La reacción fluorocromática mide dos rasgos del grano de polen: la presencia de una membrana intacta, y la presencia de enzimas hidrolíticas capaces de partir la porción de diacetato de fluoresceína que es el fluorocromo (Heslop-Harrison *et al.*, 1984). Las ventajas de este método consisten en que bajo la luz UV, los granos de polen pueden verse fácilmente como fluorescentes (viables), o bien con leve o sin fluorescencia (no viables). Además este protocolo puede ser llevado a cabo rápidamente en el laboratorio. Sin embargo, en un gran número de experimentos fueron reportados falsos positivos o bien, no hubo correlación con los resultados de producción de semilla. En general, los colorantes vitales suelen producir falsos positivos, dando como resultado una sobreestimación de la VP.

La coloración de Alexander también ha sido utilizada para distinguir entre el polen viable y el no viable en muchas especies (Alexander, 1969, 1980). Esta coloración contiene verde de malaquita, que tiñe la celulosa presente en las paredes del polen y la fucsina ácida, que tiñe el protoplasma del polen en caso de ser viable. Barrow (1983) menciona que el

colorante de Alexander permite además distinguir entre granos de polen maduros y viables respecto de aquellos que abortaron durante su desarrollo temprano y no desarrollaron protoplasma.

Finalmente, la VP puede ser evaluada luego de la polinización, analizando la germinación sobre el estigma. Este método de fluorescencia permite determinar si el polen posee la capacidad de germinar, pero no estimar el grado de viabilidad del mismo.

Estos métodos de análisis de viabilidad *in vitro*, aún con numerosos cuestionamientos por su sensibilidad diferencial (Bots y Mariani, 2005), son considerados buenos estimadores de la VP real, además de ser simples y poco costosas. Sin embargo, para lograr una correcta evaluación es necesario realizar un ajuste para cada especie.

3.1.2. Conservación y almacenamiento del polen

La importancia del almacenamiento adecuado para cada tipo de polen se debe a que facilitaría el cruzamiento de especies que poseen diferentes períodos de floración, y de aquellas especies que se encuentran en diferentes localidades (Cabello, 2003). Sumado a esto, puede jugar un rol importante en la preservación del germoplasma.

Un factor importante que hace variar la longevidad del polen es la forma de agruparse que poseen los granos, ya que cuando se presentan agrupados permiten generar una protección de la desecación y de los efectos de la luz ultravioleta (Dafni y Firmage, 2000). Sumado a esto la presencia de sustancias viscosas que contienen algunos granos de polen aumenta su grado de protección, prolongando su viabilidad fuera del saco polínico. Los mismos autores agregan que el contenido y calidad de los carbohidratos presentes en los granos de polen también hacen variar la duración de la viabilidad (longevidad del grano de polen), ya que protegen a la membrana otorgándole mayor longevidad polínica.

Una adecuada conservación del polen debe ser a temperaturas cercanas a los 5 °C, hasta temperaturas de criopreservación (entre -180 °C hasta -271 °C), lo que debe ir acompañado por un ambiente de baja humedad relativa (Stanley y Linskens, 1974). Efectivamente, según Cabello (2003), los factores de mayor relevancia en el almacenamiento de polen son la temperatura y la humedad relativa.

3.1.3 Estudios de biología floral

Los estudios sobre el sistema reproductivo, la producción de semillas, la frecuencia y el tipo de polinización, son esenciales para la comprensión de los mecanismos de flujo de genes dentro y entre poblaciones (Barrett y Eckert, 1990).

El establecimiento de una estrategia de mejoramiento de las plantas requiere comparar la autopolinización con la polinización cruzada, un tema central en los estudios de la biología reproductiva. En ausencia de polen extraño, el análisis de auto-polinización

artificial proporciona información adecuada sobre la formación de frutos y semillas. Los estudios de los índices de cruzamientos espontáneos, reflejan la producción de semillas en condiciones naturales con el estigma expuesto a la polinización cruzada, así como también la geitonogamia y la auto-polinización (Fernández *et al.*, 2013).

Es muy poco conocida la biología floral de *Habranthus tubispathus*. Por lo tanto, con el objetivo de iniciar estudios de reproducción de esta Amaryllidaceae nativa, su biología reproductiva fue investigada teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- (1) el grado de auto-compatibilidad,
- (2) la eficiencia reproductiva,
- (3) el crecimiento de los tubos polínicos en los ovarios, y
- (4) la producción de semillas de las flores, de auto-polinización cruzada y auto-polinización espontánea.

Además se pretende identificar las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* del polen, realizar la comparación de técnicas para determinar la viabilidad polínica y estimar la medida en que reflejan su capacidad real para germinar sobre el estigma de la flor.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Viabilidad y longevidad polínica

Fueron utilizadas plantas de *Habranthus tubispathus* recolectadas de una población natural situada en el Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS, CONICET-UNS), ubicado en el camino La Carrindanga Km 7 de Bahía Blanca; las cuales fueron mantenidas bajo luz natural y temperatura ambiente en invernáculo para la inducción floral durante la primavera y verano de 2007, 2008, 2009 y 2010. Durante el período estival, en el cual esta especie florece, el riego semanal fue suspendido a fin de obtener una sincronización en la floración, carácter específico y destacado de esta especie. Mediante este procedimiento, se buscó obtener una abundante cantidad de flores y poder proceder con los siguientes estudios. A fin de determinar la cantidad y calidad del polen producido, se realizaron los análisis de recuento de granos de polen por flor (GPF), viabilidad del polen (VP) y germinación *in vitro* de polen (GP). Para estimar cuál es método que mejor representa la capacidad real del polen para germinar, se realizó una comparación de las técnicas con la germinación *in vivo* sobre el estigma.

3.2.1.1 Análisis de la cantidad de polen por flor

Para realizar el recuento de GPF se evaluó un total de 13 flores inmediatamente antes de que se produjera su antesis. De cada una de ellas se recolectaron los 6 estambres cerrados y se colocaron en fijador FAA (50 % alcohol etílico, 35 % agua destilada, 10 %

formol, 5 % ácido acético glacial), para su posterior análisis. El recuento del polen en las flores fijadas se realizó siguiendo el procedimiento definido por Godini (1979). El mismo consistió en colocar los 6 estambres de cada flor dentro de un recipiente Eppendorf de 1,5 ml, conteniendo 250 µl de una solución acuosa de detergente Triton X-100 (Octyl Phenoxy polyethoxyethanol) al 1 %. Los mismos se trituraron con una varilla plástica dentro del recipiente y la suspensión se agitó en un agitador vertical "vórtex" para facilitar la salida del polen desde el interior de las anteras, y lograr una suspensión homogénea. Finalmente, se tomó una muestra de esta suspensión con un gotero, y se colocó una gota en un hematocitómetro, el cual retiene un volumen de 0,1 µl en cada cuadrante (Figura 3.1).

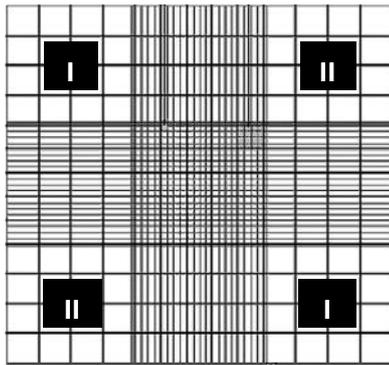


Figura 3.1: Esquema de la cámara del hematocitómetro utilizada para el recuento, con los cuatro cuadrantes identificados como I, II, III y IV.

Para obtener el número de granos de polen por flor, a partir del número contado en la alícuota observada en el hematocitómetro, se realizaron los siguientes cálculos:

$$\frac{(\text{N}^\circ \text{ granos contados} / \text{N}^\circ \text{ cuadrantes utilizados})}{0,0001 \text{ ml}} = \text{N}^\circ \text{ granos de polen/ml} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{N}^\circ \text{ granos/ml} \times \text{Volumen Original (en ml)} = \text{N}^\circ \text{ granos de polen/flor} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde N° granos contados se refiere a la cantidad de granos que se cuentan en los cuatro cuadrantes del hematocitómetro (Figura 3.1). Para cada flor se realizaron 2 conteos con el hematocitómetro, por lo tanto el N° de cuadrantes utilizados fue de ocho.

3.2.1.2 Análisis de la germinación *in vitro*

Para el análisis de la germinación polínica (GP) *in vitro*, se realizó un estudio preliminar exploratorio de medios de cultivo sólidos para determinar cuál podría ser el más apropiado. En primer lugar se determinó el efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento del tubo polínico, para lo cual se probaron cinco concentraciones, incluyendo 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 y 1 M en el medio de cultivo que contenía además 1 mM de BO_3H_3 y 2 mM de Cl_2Ca disueltos en el agua destilada y 1 % de agar, pH 6,5. El medio se fundió calentándolo en

microondas hasta ebullición y se volcó en cajas de Petri de 100 x 15 mm. El polen fue colocado sobre los medios de cultivo inmediatamente luego de la recolección, y fue cultivado a 20 °C durante 30 minutos antes de evaluar su germinación. Los granos de polen cuyos tubos eran más largos que su diámetro fueron considerados germinados (Tuinstra y Wedel, 2000). Al menos nueve campos de cada caja fueron examinados con un microscopio Nikon Eclipse 80 (Japón), para contar aproximadamente 200 granos de polen por caja. Se cuantificó el porcentaje de granos germinados, y se cultivaron 4 cajas por tratamiento.

De la misma forma que la descrita anteriormente, se realizó un experimento siguiendo un diseño factorial donde se probaron 9 tratamientos resultantes de la combinación de tres concentraciones de BO_3H_3 , (1, 2 y 4 mM) y tres de Cl_2Ca , (1, 2 y 4 mM) en el medio que además contenía 0,5 M de sacarosa, pH 6,5. Se realizaron cuatro réplicas de cada tratamiento. En ambos experimentos se evaluó además el crecimiento del tubo polínico, haciendo mediciones mediante el programa ImageJ (Rasband, 2015).

Con el fin de completar el estudio de germinación de polen, se evaluaron también medios de cultivo líquido, los cuales contenían: Polietilenglicol 6000 (PEG6000), sacarosa, 240 mg L⁻¹ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (equivalente a 1,5 mM) y 100 mg L⁻¹ H_3BO_3 (equivalente a 1,6 mM). En este caso, se probaron tres concentraciones de sacarosa, (50, 100 y 150 g L⁻¹, equivalente a 0,8, 1,6 y 2,4 M respectivamente), las cuales se combinaron con tres concentraciones de PEG (10, 15 y 20 %) para determinar cuál de ellas brindaba los mejores resultados de germinación *in vitro*.

Se utilizó PEG debido a que es relativamente inerte en el metabolismo del polen y no puede ingresar a las células (Read *et al.*, 1993). Por otra parte, se ha probado que su incorporación en el medio de cultivo promueve el desarrollo del tubo polínico, debido a que regula la permeabilidad y brinda estabilidad a la membrana del tubo polínico (Read *et al.*, 1993), simulando lo que ocurre en el estigma.

El medio de cultivo fue preparado disolviendo el PEG6000 y luego añadiendo la sacarosa, por último el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y el H_3BO_3 . Para promover la germinación, se utilizó la técnica de la gota suspendida en cámara húmeda a 25 °C y pH 7,0 (Li *et al.*, 2010). Esta técnica fue implementada colocando con un gotero una alícuota del medio de cultivo en un portaobjetos, y sobre ella se esparcieron los granos de polen con un pincel. Luego el portaobjetos se invirtió para dejar la gota suspendida y se colocó en cámara húmeda a 25 °C durante 90 minutos.

En todos los casos los granos de polen en germinación se observaron bajo un microscopio óptico Nikon Eclipse 80 (Japón), con un aumento de 20X. La medición del largo del tubo polínico requirió de un mayor aumento, 40X.

3.2.1.3 Análisis de la calidad de polen y determinación del momento de óptimo de recolección de muestras

Para determinar la viabilidad polínica al momento de realizar la prueba de germinación, se utilizaron los dos métodos de tinción descritos anteriormente, Alexander (Alexander, 1969) y contrastante de fluorescencia (Greissl, 1989), los cuales evidencian principalmente la integridad del plasmalema celular (Heslop-Harrison *et al.*, 1984).

Para ambas coloraciones se tomaron al azar 10 flores antes de la antesis, se extrajeron los granos de polen de las anteras y se contaron seis campos por cada muestra, calculándose el porcentaje de granos de polen viables e inviables. De esta manera se pretendió determinar cual era el método que mejor se ajustaba para evaluar la calidad que presentaba el polen de las flores de *H. tubispathus*.

En el caso de la tinción de Alexander, se colocaron en un portaobjetos dos gotas de la solución de este colorante y luego se agregó el polen, el cual fue depositado sumergiendo suavemente las anteras en la solución. Los portaobjetos se mantuvieron sobre una placa a 60 °C durante veinte minutos. Finalmente, se cuantificaron bajo un microscopio de campo claro Nikon Eclipse 80, más de 2500 granos de polen. Aquellos que eran viables tomaron una coloración oscura casi negra, y los inviables, quedaron de color verde claro (Figura 3.2).

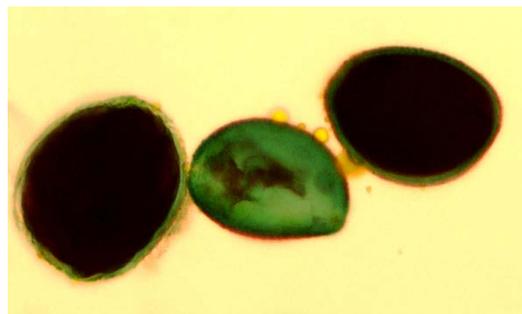


Figura 3.2: Coloración de Alexander en granos de polen de *Habranthus tubispathus*. En la foto se observa un grano de polen central de coloración verde claro, el cual es no viable. En contraste, sobre su derecha e izquierda se observan dos granos viables, de coloración negra oscura.

Para la tinción con FDA se colocó el polen en un portaobjetos con dos gotas de sacarosa 0,3 M, a fin de restablecer la función de la membrana plasmática. Luego se agregaron dos gotas de Diacetato de Fluoresceína (FDA) y Propidio Iodado (PI) dejándose por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras resultantes de esta tinción fueron evaluadas con un microscopio de epi-fluorescencia OLYMPUS BX 50 (Japón) utilizando dos filtros de luz: 330-385 nm para excitación y 420 nm para emisión. Los granos de polen viables presentaron fluorescencia, y aquellos que eran inviables se observaron coloreados pero sin la presencia de fluorescencia (Figura 3.3).

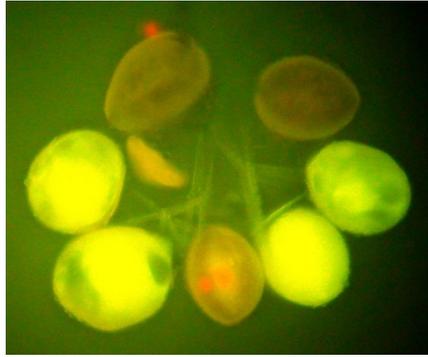


Figura 3.3: Coloración con FDA en granos de polen de *Habranthus tubispathus*. Se observan cuatro granos fluorescentes, correspondientes a aquellos viables; y 3 que no presentan fluorescencia, correspondientes a los inviables.

Con el objetivo de determinar el momento adecuado de recolección del polen, se colectaron anteras *H. tubispathus* antes y después de la antesis, en horarios regulares: 10:00, 11:30, 13:00, 14:30, 16:00 y 17:30 hs, a los cuales se denominaron T1, T2, T3, T4, T5 y T6 respectivamente. Luego fue evaluada su viabilidad mediante el método de Alexander por haber sido el que mejor evidenciaba la VP de acuerdo al ensayo anterior.

3.2.1.4 Crecimiento del tubo polínico en el pistilo

Para evaluar el crecimiento del tubo polínico en el pistilo de flores polinizadas, se recolectaron seis ovarios a las 8, 12, 24 y 36 horas post-polinización (hpp). Luego de cada muestreo, los pistilos se colocaron en el fijador FAA (formaldehído: ácido acético: etanol = 1:0.5:8 v/v) al menos durante 24 horas, para su posterior análisis. Posteriormente fueron lavados en agua destilada para remover el excedente de FAA, y tratados con Na(OH) 8N a 60 °C, durante dos horas para lograr su decoloración (Martin, 1958). Transcurrido este tiempo, se realizaron 6 lavados con agua destilada para remover el exceso de Na(OH). Por último, se tiñeron con una solución acuosa de azul de anilina (5 mg de Azul de Anilina en 100 ml de K_2PO_4 , a pH=8,2) durante 1 hora (Martin, 1958). Finalmente, los pistilos teñidos fueron montados en un portaobjetos usando una gota de la solución de azul de anilina y presionados suavemente con un cubreobjetos. Los tubos polínicos fueron observados bajo un microscopio de epi-fluorescencia OLYMPUS BX 50 (Japón), utilizando un filtro de emisión de 420 nm y uno de excitación de entre 330-385 nm (4x y 10x). Bajo estas condiciones se pueden distinguir los tubos polínicos y los tapones de calosa de color verde fluorescente (Martin, 1958) (Figura 3.4).

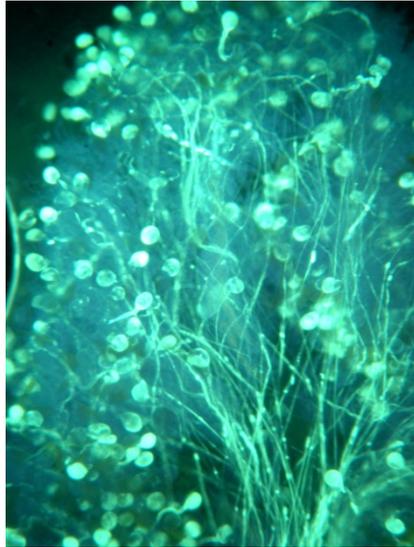


Figura 3.4: Granos de polen y tubos polínicos germinando en el estigma y parte del estilo de una flor de *H. tubispathus* evidenciados por fluorescencia. Escala 100x.

La cuantificación fue realizada considerando 6 niveles de crecimiento del tubo polínico, como se observa en la figura 3.5, siendo 1 cuando solo se observaron tubos polínicos en el estigma, 2 cuando los tubos alcanzaron el primer cuarto del estilo, 3 cuando se observaron en el segundo cuarto, 4 en el tercer cuarto, 5 en el cuarto final del estilo y 6 cuando lograban alcanzar los sacos embrionarios y óvulos en el ovario.

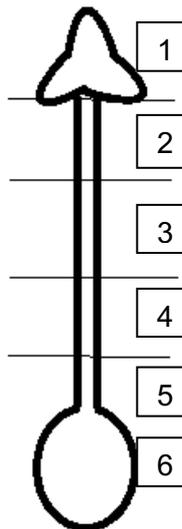


Figura 3.5: División del gineceo a fin de evaluar el crecimiento del tubo polínico en su interior.

3.2.2 Conservación del polen y comparación de técnicas de estimación de la viabilidad

Con el fin de ampliar en el tiempo la posibilidad de realizar cruzas por polinización artificial para *Habranthus tubispathus*, se evaluó la conservación del polen a mediano plazo.

Por otro lado, a fin de estimar cuál método indirecto, i.e. germinación *in vitro* o tinción de Alexander, representa mejor la capacidad real del polen para germinar sobre el estigma, se realizó una comparación de estas técnicas con la germinación *in vivo*. Como no es posible la cuantificación debido a la gran concentración de granos de polen sobre el estigma, la germinación *in vivo* se consideró positiva cuando los granos de polen germinaban masivamente y negativa cuando lo hacían en forma marginal (1 a 4 granos germinados) o nula. Para encontrar diferencias en la capacidad de germinación *in vivo*, *in vitro* y en la viabilidad por tinción, se usó polen fresco y conservado durante uno y dos meses.

El ensayo fue realizado en los meses de verano de 2010. Se colectaron anteras de 28 plantas de la población presente en el invernáculo, que se encontraban por florecer al momento de la recolección. Dichas anteras fueron depositadas dentro de cápsulas que permitían el intercambio gaseoso con el exterior. Las cápsulas fueron colocadas en cajas de Petri con su tapa entreabierta, y éstas en cajas de poliestireno que contenían sílica gel a fin de generar un ambiente con bajo contenido de humedad. Las muestras fueron mantenidas a 25 ± 2 °C por 60 días.

Al momento de la recolección de las anteras, se realizó un análisis de la germinación y viabilidad a fin de realizar la comparación de las siguientes técnicas:

- Germinación *in vivo* usando la técnica de fijación, clarificación y observación de pistilos con fluorescencia.
- Germinación *in vitro* en medio líquido, que contenía 2 gr L⁻¹ de PEG6000; 0,8 M de Sacarosa; 1,5 mM de Ca (NO₃)₂ y 1,6 mM de H₃BO₃.
- Coloración de Alexander (Alexander, 1969).

En todos los casos se cuantificaron más de 1000 granos de polen mediante la observación en microscopio como se describió precedentemente para cada técnica.

A los 30 y 60 días de la recolección se evaluó la germinación y viabilidad, realizando una rehidratación previa de los granos de polen, y comparándolos con polen fresco tomado al momento del análisis. A los 30 días se aplicaron las cuatro técnicas de germinación y viabilidad, pero a los 60 días de conservación solo se utilizaron los métodos de Alexander y de germinación *in vivo*, ya que los primeros resultados demostraron que la germinación *in vitro* subestima la viabilidad.

3.2.3 Estudios de biología floral

Para este ensayo fueron colectadas plantas de *H. tubispathus* de una población natural situada en Bahía Blanca (38°42'S, 62°16'W), durante los meses de verano, los cuales coinciden con la etapa de floración a fin de asegurar la identificación de la especie. Luego

fueron cultivadas en contenedores plásticos con sustrato comercial (GrowMix, Terrafertil), y mantenidas bajo condiciones controladas en invernáculo.

Previo a la realización de los cruzamientos se evaluó la receptividad estigmática usando la prueba de Osborn *et al.* (1988). Este método se basa en el hecho de que la presencia de la enzima peroxidasa refleja la receptividad del estigma (Galen *et al.*, 1985). La actividad de la enzima se evidencia con peróxido de hidrógeno que reacciona formando burbujas de oxígeno. Por lo tanto, para esta determinación, se colocó peróxido de hidrógeno al 10 % sobre los estigmas de *H. tubispathus* y se observó si se producían burbujas. Se consideraron 6 estigmas con las ramas estigmáticas abiertas (antesis) y 6 con ramas cerradas (1 día previo a la antesis).

Se realizaron de manera controlada, autopolinizaciones y cruzamientos dentro de dicha población, de la siguiente manera: las flores fueron tapadas con capuchones de lámina de aluminio previo a la antesis, con el objetivo de evitar la llegada de polen de otras flores al estigma y de forzar su autofecundación. Para las flores que iban a ser cruzadas se realizó la emasculación, removiendo sus anteras antes de la dehiscencia por medio de pinzas. La polinización fue realizada utilizando el polen de la misma planta (autopolinización) o de plantas diferentes (alopolinización), dependiendo de cada caso. Luego, las flores fueron cubiertas nuevamente y mantenidas de esta manera hasta que la receptividad del estigma fue nula y el fruto comenzó a desarrollarse, aproximadamente 4 o 5 días después.

Con el fin de tener un control en el ensayo, otro grupo de flores fue emasculado antes de su antesis y cubierto de la misma manera, con la única diferencia que no fueron polinizadas, para evidenciar la eventual formación de semillas.

Los cruzamientos controlados fueron realizados durante el verano del 2009-2010 y 2010-2011. Durante el primer año, las autofecundaciones se llevaron a cabo solo cubriendo las flores, obteniendo un resultado de fructificación no tan bueno. Por lo tanto, el segundo año se retiró el capuchón cobertor luego de la antesis, y se realizó el forzado de la autopolinización.

Se recolectaron datos de número de frutos formados en las plantas que fueron autofecundadas y cruzadas, y también en un grupo de plantas a campo en la población natural, las cuales fueron tapadas para autofecundación y sin tapar para la libre polinización. Estos datos fueron colectados de plantas individuales identificadas en el campo e invernáculo, durante tres períodos consecutivos de floración (2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011).

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de fructificación (% Fructificación) y la eficiencia reproductiva (ER) según Wiens *et al.* (1987):

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ frutos formados}}{\text{N}^\circ \text{ de flores polinizadas}} \times 100 = (\%) \text{ Fructificación} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\left(\frac{\text{N}^\circ \text{ frutos formados}}{\text{N}^\circ \text{ de flores polinizadas}} \right) \times \left(\frac{\text{promedio de semillas por fruto}}{\text{promedio de óvulos / ovario}} \right) \times 100 = \% \text{ ER} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Para calcular la ER fue necesario realizar un conteo de óvulos por ovario, el cual fue llevado a cabo bajo estereomicroscopio (Figura 3.6). Se recolectaron un total de 68 flores y se contó en todos los casos la cantidad de óvulos que había por cada lóculo, para luego multiplicarlo por 3 y así obtener el número total de óvulos por ovario. Con el fin de incluirlo en la fórmula, se hizo un promedio del total de óvulos cuantificados.

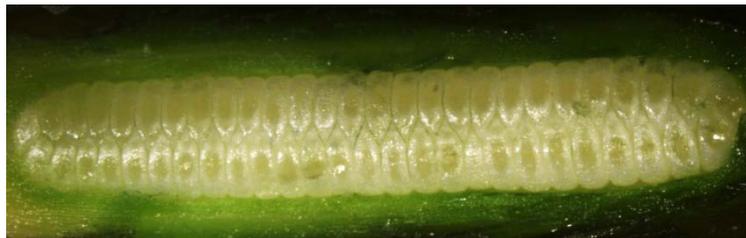


Figura 3.6: Lóculo abierto para la cuantificación del número de óvulos por ovario en *H. tubispathus*. Magnificación x 10.

Mediante la cuantificación del número de semillas por fruto producido como resultado de 69 cruzamientos y 95 autofecundaciones en invernáculo, se realizó la estimación del porcentaje de frutos producidos en cada caso, a fin de calcular el índice de auto-incompatibilidad (IAI) para esta especie. Este índice fue definido por Zapata y Arroyo (1978), de la siguiente forma:

$$\frac{\% \text{ de frutos producidos por autopolinización}}{\% \text{ de frutos producidos por cruzamiento}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

También fue realizado un estudio del crecimiento del tubo polínico de pistilos fijados, provenientes de dos tratamientos: flores autopolinizadas y flores de polinización cruzada, para corroborar la llegada del polen a los óvulos en cada caso, y de esta forma poder detectar la compatibilidad o incompatibilidad de la especie. Los pistilos fueron recolectados 24 horas luego de su polinización y fijados en FAA, al menos durante 24 horas a temperatura ambiente, como fue descrito anteriormente, utilizado el procedimiento propuesto por Martin (1959).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Viabilidad y longevidad polínica

3.3.1.1 Análisis de la cantidad de polen por flor

En este ensayo, además de determinar la cantidad y calidad de polen producido, se pretendía cuantificar diferencias entre flores provenientes de plantas hexaploides y tetraploides, determinadas previamente mediante citometría de flujo como se describe en el Capítulo 4. Esto último no fue posible, debido a que las plantas hexaploides no produjeron flores durante el período evaluado. Esta característica es frecuente en aquellas plantas que presentan poliploidía, y es bien sabido que cuanto mayor sea el número cromosómico, generalmente menor es la reproducción sexual que presentan las especies. Es decir que, la poliploidía se encuentra asociada con la capacidad de reproducción asexual (Gustafsson 1948; Stebbins 1950; Mable 2004; Baldwin y Husband 2013). Por lo tanto, los resultados expuestos son únicamente provenientes de plantas tetraploides.

Habranthus tubispatus posee 6 anteras por flor, las cuales son biloculares y producen la salida del polen por medio de una dehiscencia longitudinal. El número de GPF, tuvo variaciones entre 51.875 y 132.750, siendo el promedio 93.837 y el desvío estándar (DE) de 26.194, evidenciando el gran volumen de polen que esta especie produce. Hay estudios que demuestran que existen grandes variaciones en el número de GPF para otras especies de la familia Amaryllidaceae, como es el caso *Clivia miniata* (Yamburov *et al.*, 2014). Estas variaciones fueron producidas por diferencias de humedad en el ambiente, mostrando que tanto la sequía como el exceso hídrico disminuyen el número de GPF, y que este aspecto resulta ser el más sensible a condiciones ambientales adversas, cuando se lo compara con la germinación y viabilidad del polen.

Al estudiar la biología reproductiva, el recuento de polen es una característica importante, debido a que la relación polen/óvulos es un aspecto esencial en los protocolos de mejoramiento de plantas (Kannely, 2005).

3.3.1.2 Análisis de la germinación *in vitro*

En los resultados del análisis de la germinación *in vitro* con cinco concentraciones diferentes de sacarosa, se observó que el porcentaje de germinación fue máximo para las concentraciones de 0,1 y 0,5 M, no encontrándose diferencias significativas entre ellas (Figura 3.7A). La concentración 0,1 M mostró el valor más elevado del estudio, siendo este 30,6 %. El medio con la mayor concentración de sacarosa evaluada (1 M) inhibió por completo la GP. Esto puede deberse a que los niveles altos de sacarosa en los medios de cultivo alteran la permeabilidad de la membrana del tubo polínico en crecimiento, dando lugar a la lixiviación de los metabolitos y los iones hacia el medio (Crowe *et al.*, 1989; Golan-Goldhirsh *et al.*, 1991; Subbaiah, 1984; Zhang y Croes, 1982).

En cuanto al crecimiento del tubo polínico, se encontró que el medio con la concentración 0,1 M de sacarosa presentaba los de mayor longitud (572,4 μm), siendo esta significativamente superior a la de los tratamientos de 0,01 y 0,5 M (Figura 3.7B). Por otra

parte, no se encontraron diferencias significativas con el tratamiento que tenía una concentración de sacarosa de 0,05 M.

Los resultados de este ensayo permitieron establecer que la concentración de sacarosa 0,1 M, no solo produjo el mayor número de granos germinados, sino que también estos presentaron un crecimiento del tubo polínico más acelerado.

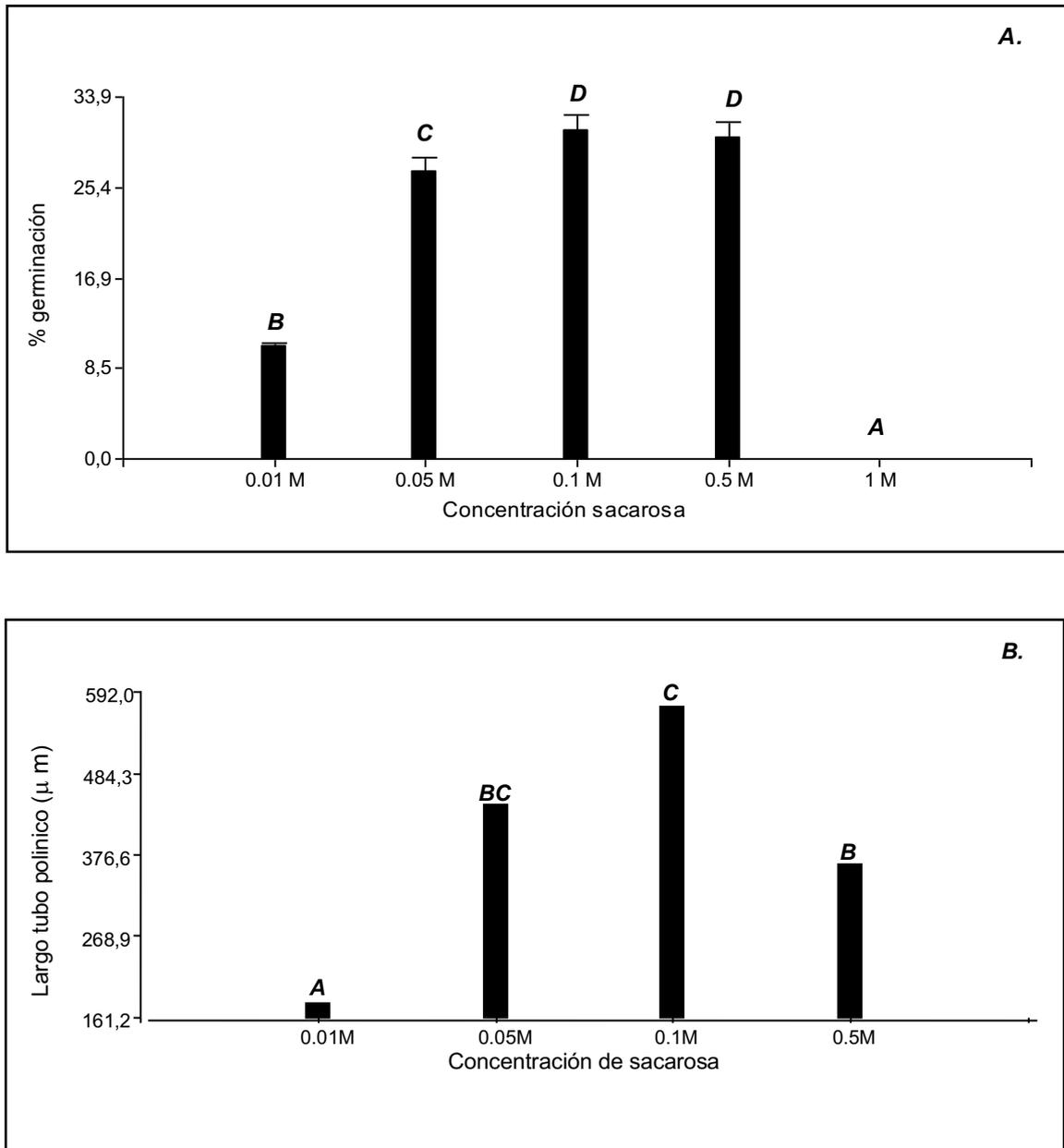


Figura 3.7: Germinación *in vitro* de polen de *H. tubispathus* en medios de cultivo sólido con distintas concentraciones de sacarosa (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 y 1 M). A. Porcentaje de germinación. B. Longitud del tubo polínico (μ m). Las barras indican el error estándar de la media. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos, por el test Tukey ($<0,05$).

Para el experimento de germinación *in vitro*, en el que se evaluaron 9 tratamientos con distintas concentraciones de BO_3H_3 y Cl_2Ca , se pudo determinar que éstas afectaron el porcentaje de germinación, observándose una interacción significativa ($p < 0,001$) entre el efecto de ambas moléculas (Figura 3.8A).

Las combinaciones de Cl_2Ca - BO_3H_3 1-2, 2-4, 4-2, y 1-1 mM respectivamente, evidenciaron los menores porcentajes de germinación, sin diferencias entre ellos, dando valores entre 21,1 y 22,9 %. Los valores más altos se obtuvieron en los tratamientos 2-1, 4-1 y 2-2 mM, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos, siendo en el medio con 2-2 mM donde se obtuvo la mayor germinación (31,3 %).

En la evaluación de la longitud del tubo polínico, solo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos 2-4 y 1-1 con 4-2, 2-2 y 4-1 mM de Cl_2Ca y BO_3H_3 , respectivamente (Figura 3.8B). Siendo los obtenidos en los primeros los que menor longitud presentaron, 387,0 y 393,7 μm ; en contraposición al segundo grupo que produjeron los de mayor longitud, 636,8, 663,4 y 638,9 μm , respectivamente.

Por lo tanto, los medios con concentraciones 2-2 y 4-1 mM de Cl_2Ca y BO_3H_3 , combinaron un alto porcentaje de GP con la mayor longitud del tubo polínico. Sin embargo, el tratamiento con 2 mM de BO_3H_3 y 2 mM de Cl_2Ca fue el que evidenció los mayores valores para los dos parámetros evaluados.

El polen de la mayoría de especies germina y produce un tubo polínico cuando se coloca en una solución de calcio, boro, y un componente osmótico. A pesar de ser un sistema experimental controlado, la germinación *in vitro* no genera una mímica completa del crecimiento que se produce *in vivo*. Incluso optimizando los medios de germinación, los tubos polínicos producidos *in vitro* sólo llegan a 30-40 % de las longitudes que alcanzarían *in vivo*, y con frecuencia se observan anomalías estructurales (Read *et al.*, 1993). Además, el polen de algunas especies, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*, no germina bien *in vitro* sin importar las condiciones que se utilicen (Preuss *et al.*, 1993).

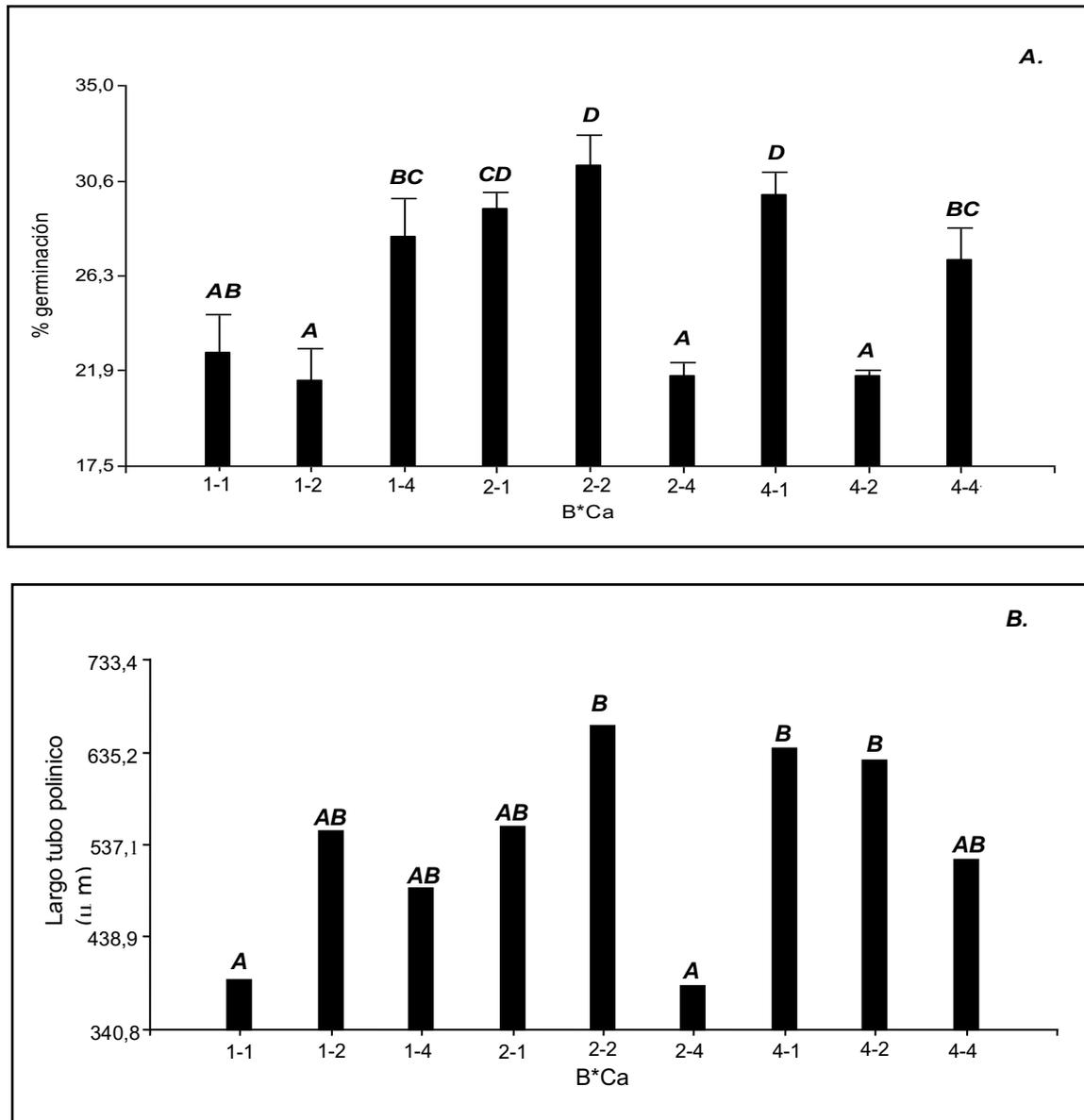


Figura 3.8: Germinación *in vitro* de polen de *H. tubispathus* en medios de cultivo sólido con tres concentraciones de BO_3H_3 (1, 2 y 4 mM) y tres de Cl_2Ca (1, 2 y 4 mM). **A.** Porcentaje de germinación. **B.** Longitud del tubo polínico (μm). Los valores 1, 2 y 4 en el eje x del gráfico, se refieren a concentraciones de 1, 2 y 4 mM respectivamente. Las barras indican el error estándar de la media. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos por el test Tukey ($<0,05$).

Debido a que con los medios de cultivo sólidos no se superó el 31,3 % de germinación, se decidió evaluar el cultivo en medios líquidos usando la técnica de la gota suspendida en cámara húmeda. Estos medios de cultivo contenían como componentes comunes 240 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 100 mg/L H_3BO_3 , y variaron en la concentración de PEG y de sacarosa.

En la figura 3.9, se observa que la combinación de PEG y sacarosa que dio porcentajes de germinación significativamente mayores (43,13 %), fue la que contenía 20 % PEG y 5 % sacarosa (equivalente a 0,8 M), i.e. el medio que contenía la mayor concentración

de PEG y la menor de sacarosa. Por otra parte, no se encontraron diferencias entre los porcentajes resultantes de los tratamientos con las demás combinaciones de PEG y sacarosa. La composición del medio de cultivo puede afectar dramáticamente el metabolismo de polen. En condiciones osmóticamente equivalentes, el medio de cultivo basado en PEG aumentó la frecuencia de germinación de granos de polen de *Nicotiana tabacum*, e impidió la explosión del tubo polínico, en comparación con la sacarosa (Read *et al.*, 1993). El PEG es relativamente inerte metabólicamente y no puede entrar en las células (Subbaiah, 1984), mientras que la sacarosa y/o los monosacáridos ingresan en el polen y aumentan aún más las altas concentraciones internas (Hoekstra *et al.*, 1989; Kawaguchi *et al.*, 1996).

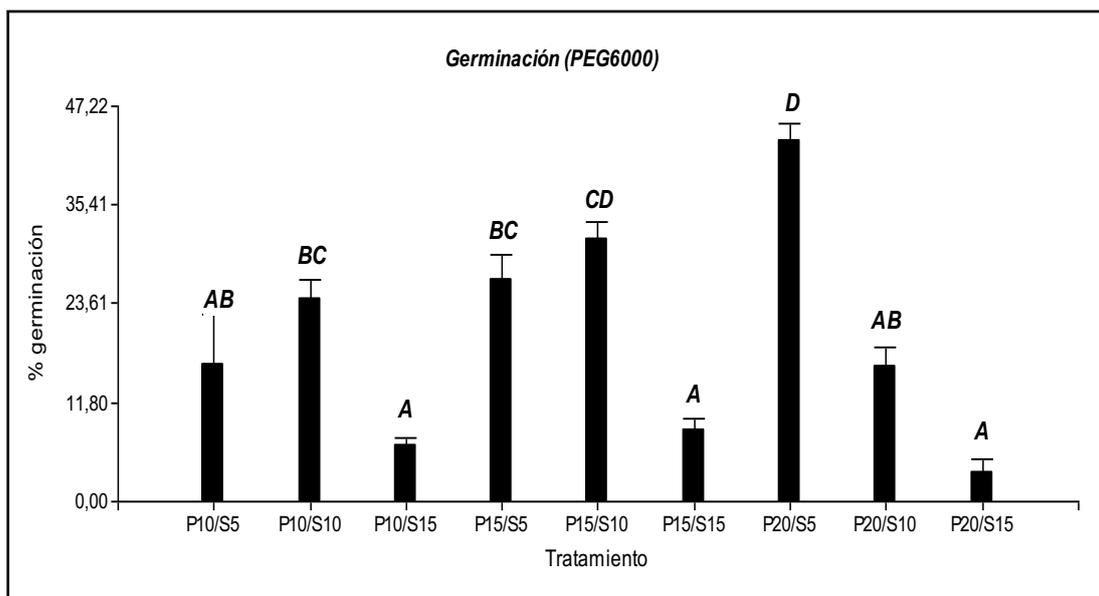


Figura 3.9: Porcentaje de germinación *in vitro* de polen de *H. tubispathus* en medios de cultivo líquido con tres concentraciones de PEG (10, 15 y 20 %) y tres de sacarosa, (5, 10 y 15 %). Las barras indican el error estándar de la media. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos, por el test Tukey ($<0,05$).

3.3.1.3 Análisis de la calidad de polen y determinación del momento óptimo de recolección de muestras

Al comparar las técnicas de estimación de viabilidad del polen, germinación *in vitro*, tinción por Alexander y tinción de Greissl o FDA, se encontró que los porcentajes fueron significativamente diferentes entre los tres métodos ($p < 0,05$). El mayor valor se obtuvo con la tinción de Alexander (82,8 %), seguido por la de FDA (54,2 %) y en último lugar la germinación *in vitro* en medios sólidos (25,2 %). Debido a estos resultados, se concluyó preliminarmente que el método de FDA y germinación *in vitro* evidenciaban una subestimación de la viabilidad polínica, y que el método de Alexander era el que mejor se ajustaba para una adecuada determinación.

En vista de los resultados precedentes, se realizó la evaluación de viabilidad del polen en distintos momentos de recolección de muestras usando la técnica de Alexander. Se encontró que los mayores porcentajes de viabilidad se obtuvieron cuando el polen se recolectó a las 13 y a las 16 hs, aunque las diferencias no fueron significativas entre los tratamientos (Figura 3.10). Una observación interesante fue que el porcentaje de viabilidad fue menor a las 14:30 hs, un horario intermedio. Si bien esto pudo deberse a varios factores, posiblemente la elevada temperatura de esa hora fuera la responsable (13 hs: 27 °C, 14:30 hs: 31 °C y 16 hs: 28,5 °C). Finalmente, a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas, se consideró el horario de las 13 como el óptimo para la recolección de muestras de granos de polen, dado que presentó los valores de viabilidad más elevados.

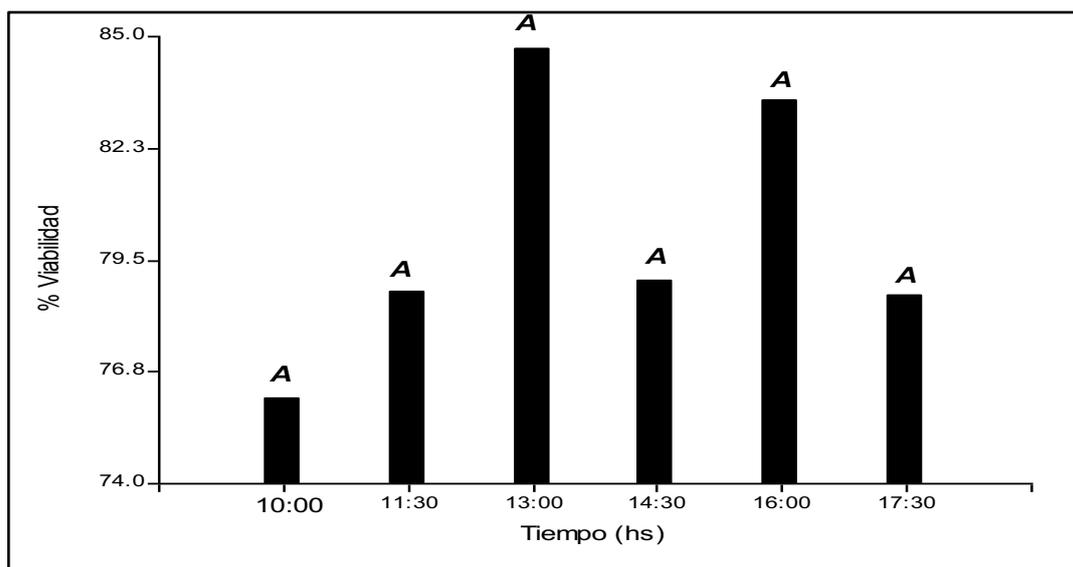


Figura 3.10: Viabilidad polínica de *H. tubispathus* evaluado por el método de tinción de Alexander, medida en intervalos de tiempo: 10:00, 11:30, 13:00, 14:30, 16:00 y 17:30 h.

3.3.1.4 Crecimiento del tubo polínico en el pistilo

La evaluación del crecimiento del tubo polínico dentro del estigma dio como resultado que a las 8 horas post-polinización (hpp), solo lograron alcanzar el primer cuarto del estilo (Figura 3.2, porción N°2). Luego de 12 hpp, se observó que los tubos polínicos se encontraban en todos los casos en el último cuarto del estilo, entre el sitio N° 4 y el N° 5 (Figura 3.2). En el caso de 24 hpp y 36 hpp, todas las muestras evaluadas evidenciaron la llegada del tubo polínico no solo al saco embrionario, sino también a los óvulos (Figura 3.11).

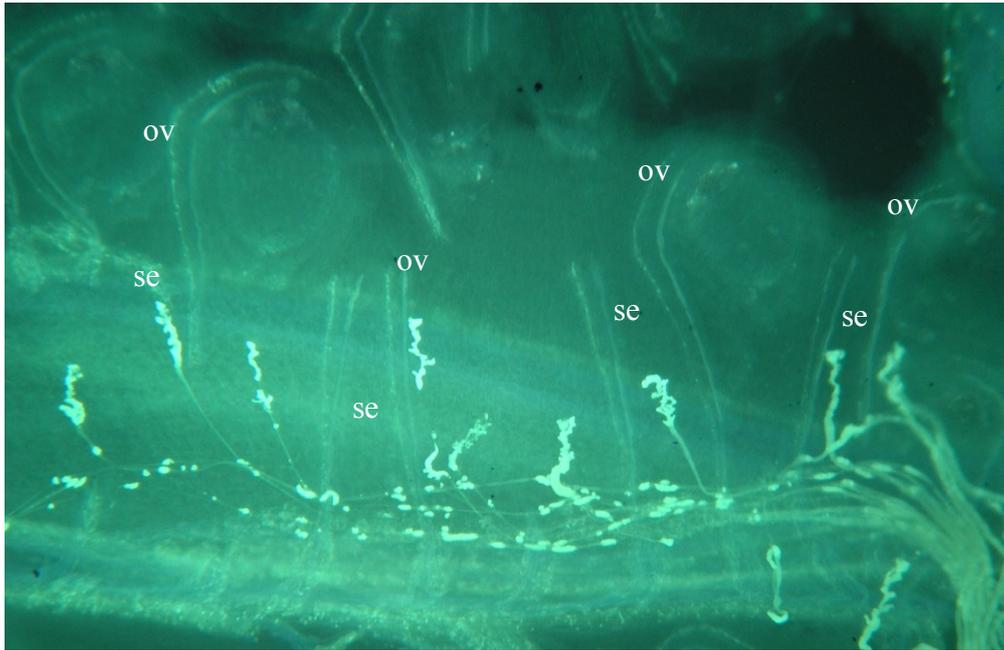


Figura 3.11: Tubos polínicos, mostrando engrosamientos de calosa, dentro del saco embrionario (se) y arribando a los óvulos (ov).

3.3.2 Conservación del polen y comparación de técnicas de estimación de la viabilidad

En la comparación de técnicas, el polen fresco germinó masivamente sobre los estigmas, mientras que la germinación *in vitro* fue del 25,2 % y la tinción de Alexander mostró 82,8 % de viabilidad. Luego de un mes de conservación, la germinación *in vitro* fue nula, en cambio aquella realizada sobre los estigmas fue positiva; demostrando de esta forma una subestimación de la capacidad real cuando se utilizó la germinación *in vitro*.

Al mes de conservación, la viabilidad por Alexander fue del 84,7 % y a los dos meses del 82,8 %, mientras que la germinación *in vivo* fue marginal (menor a 4 granos germinados por estigma), lo que indicaría una sobreestimación de la real capacidad de germinar si nos basamos en la técnica de tinción. Esto puede deberse, a que la tinción de Alexander asume que la presencia de protoplasto vivo indica la capacidad del polen para germinar y esto no es estrictamente así (Kearns y Inouye, 1993).

Uno de los factores más determinantes en la conservación del polen, es la deshidratación, que por lo general se produce justo antes de la antesis, e induce un estado metabólicamente inactivo que confiere tolerancia a los estreses ambientales encontrados durante la dispersión por el agua, el viento, los insectos o animales, y puede ser un requisito previo necesario para la viabilidad del polen y la posterior germinación (Lin y Dickinson, 1984). Cuando se libera de la antera, el polen es parcialmente deshidratado, con contenidos de agua que van de 6 a 60 %; si bien el grado de hidratación es específico de cada especie (Kerhoas

et al., 1987). A pesar de la desecación, en algunas especies el polen es viable si los cambios estructurales que se producen durante la deshidratación son reversibles luego de la rehidratación; en otras, las condiciones en que se produce la pérdida de agua, pueden afectar significativamente la posterior adhesión y germinación del polen (Kerhoas *et al.*, 1987; Lin y Dickinson, 1984; van Bilsen *et al.*, 1994). Es posible que en *H. tubispathus* una deshidratación de los granos de polen mayor que la que tienen en el momento de la dehiscencia de la antera o incluso 30 días después, afecte irreversiblemente su capacidad de polinizar efectivamente el pistilo (falla en la adherencia y germinación), aunque permanezcan vivos por al menos 60 días.

3.3.3 Estudios de biología floral

Los estigmas evidenciaron estar receptivos tanto en antesis como un día previo a la misma. Esto último proporciona una valiosa herramienta para el mejoramiento de la especie, ya que permitiría realizar cruzamientos controlados previos a la antesis, sin posibilidad de contaminación de polen no deseado (interno o externo).

Se obtuvieron frutos tanto en las plantas que fueron autofecundadas, como en aquellas a las que se les realizó la polinización cruzada (Tabla 3.1), aunque la aptitud para producir frutos sí fue dependiente del tipo de polinización. El porcentaje de fructificación fue menor en las plantas autofecundadas (59,4 %), comparado con aquellas de polinización cruzada (91 %), las cuales mostraron un porcentaje de fructificación similar a las que fueron polinizadas naturalmente (93 %). De manera consistente, la ER que se obtuvo para las plantas de polinización cruzada y para aquellas autofecundadas fue de 0,37 y 0,26, respectivamente. Para aquellas flores que fueron emasculadas y no polinizadas, se observó que en ningún caso produjeron fruto.

Por otra parte, la cantidad de semillas obtenidas por fruto fue similar en ambos casos (Tabla 3.1), con un promedio de 54,4 semillas para las plantas auto-polinizadas y 51,1 semillas para las plantas con polinización cruzada. En la Amaryllidaceae *Narcissus triandrus* (Sage *et al.*, 1999) y *Hippeastrum advenum* (Saavedra *et al.*, 1996), la auto-polinización produce menor número de semillas cuando se la compara con la polinización cruzada. Sin embargo, Broyles y Wyatt (1991) encontraron que *Zephyranthes atamasco*, una especie que pertenece a la misma tribu que *H. tubispathus*, produce la misma cantidad de semillas en los frutos provenientes de ambos tipos de polinización.

En nuestros experimentos, el IAI para *H. tubispathus* fue de 0,65. El valor para las especies que son completamente auto-compatibles es 1, aquellas que son parcialmente compatibles presentan valores entre 0,2 y 1, mientras que para especies auto-incompatibles el límite superior es 0,2 (Bawa, 1974; Ruiz y Arroyo, 1978). Por lo tanto, teniendo en cuenta

esta escala de valores, *Habranthus tubispathus* debe ser considerada una especie parcialmente auto-compatible.

La observación del crecimiento del tubo polínico reveló que en los pistilos tanto las flores auto-polinizadas como las de polinización cruzada, los granos de polen fueron capaces de germinar y llegar a los ovarios en grandes cantidades. Se lograron cuantificar más de 100 tubos polínicos que llegaron a los ovarios en cada caso, lo cual es consistente con el número de semillas obtenido (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Fructificación (%), promedio del número de semillas producidas por fruto y eficiencia reproductiva (ER), en auto-fecundaciones, polinización cruzada y plantas no polinizadas *H. tubispathus*.

	Auto- polinización	Polinización cruzada	Sin polinización
N° de flores emasculadas	96	70	25
N° de frutos obtenidos	57	64	0
% Fructificación	59,4	91,4	0
Promedio del número de semillas/fruto	54,4	51,1	---
90Eficiencia Reproductiva (% ER)	30	41	---

De los resultados de las auto-polinizaciones, es posible establecer que *Habranthus tubispathus* es una especie parcialmente auto-compatible, a pesar que las anteras están localizadas por debajo del estigma. Las 3 anteras que están más cercanas al estigma, y tenían una distancia promedio de 1,1 mm por debajo del mismo; y las otras 3 anteras, se encontraban aún más alejadas, con una distancia promedio de 5,3 mm por debajo del estigma (Figura 3.12). Esta morfología floral es conocida como hercogamia, término que se refiere a la separación espacial de la presentación del polen, y la recepción de polen dentro o entre las flores de una planta individual (Webb y Lloyd, 1986).

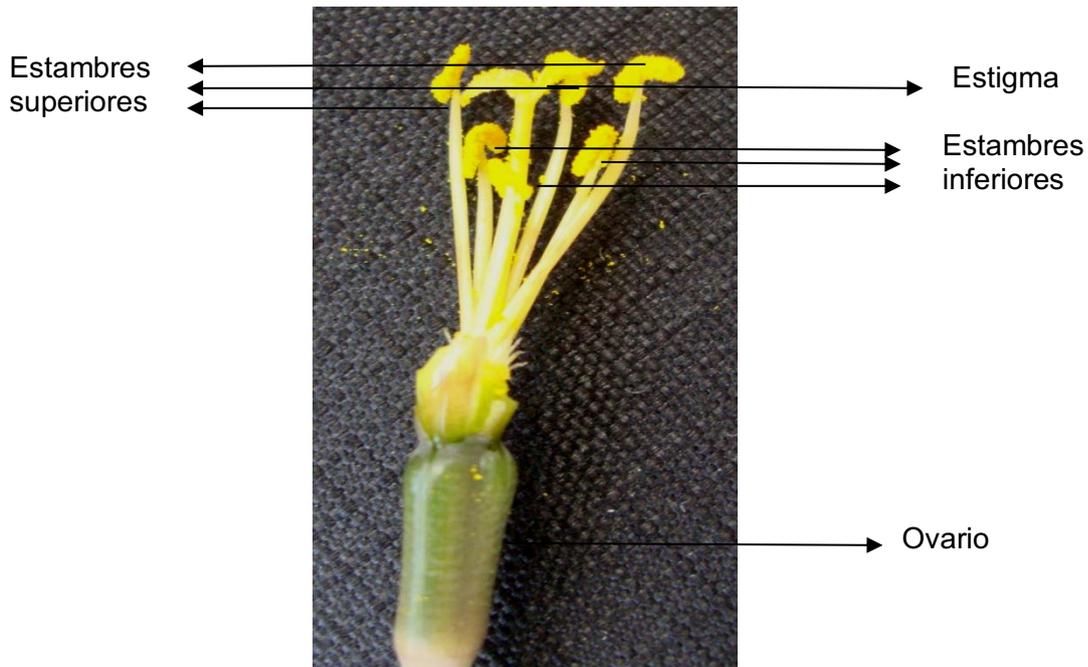


Figura 3.12: Flor sin perigonio de *Habranthus tubispathus* donde se observa la hercogamia.

En condiciones de campo, para *H. tubispathus*, la formación de frutos alcanzó el 60 % en las auto-polinizaciones forzadas, comparadas con el 36 % en las plantas en las que la auto-polinización fue realizada cubriendo y agitando suavemente las flores. Esta diferencia, puede deberse a la hercogamia presente en esta especie, la cual de acuerdo a la morfología floral, puede ser una hercogamia desordenada o un acercamiento ordenado a la hercogamia.

Como Webb y Lloyd (1986) concluyeron, es más probable que la hercogamia haya evolucionado a fin de prevenir la interferencia entre la dispersión del polen y recepción del mismo en las flores, que para favorecer el cruzamiento de las mismas. A favor de este punto de vista, ellos observaron que muchas especies con flores hercogamas presentan auto-incompatibilidad.

En las Amaryllidaceae, la hercogamia ocurre en varias especies que poseen estigmas fuertemente exsertos, forzando de esta manera a que los insectos que las visitan tomen contacto con los estigmas antes que con la superficie de las anteras (Brantjes y Bos, 1980; Webb y Lloyd, 1986). Al igual que otras especies longistilias, como *Z. atamasco* (Broyles y Wyatt, 1991), *H. tubispathus* es al menos parcialmente auto-incompatible, y la cantidad de semillas producidas por auto-polinización y polinización cruzada es similar. Sin embargo, la formación de frutos es mayor cuando la auto-polinización es forzada, depositando el polen sobre el estigma, en vez de solo cubrir las flores. Entonces, la presencia de hercogamia sería un mecanismo que favorece la polinización cruzada en *H. tubispathus*, mientras que la auto-polinización es también posible. Otro mecanismo que favorece la polinización cruzada es la dicogamia (protandria o protógina), la cual es una aislación temporal de la maduración de los

órganos femeninos y masculinos en una flor perfecta (*Webb y Lloyd, 1986*). Este mecanismo no parece estar presente en *H. tubispathus* ya que se observó que el estigma es receptivo en el momento de la dehiscencia de las anteras, inmediatamente después e incluso antes de la antesis.

3.4 CONCLUSIONES

Habranthus tubispathus, es una especie que posee un gran volumen de polen en sus flores solitarias, con alta capacidad de germinación tanto *in vivo* como *in vitro*, brindando en este estudio un promedio de 93.837 granos por flor.

Se pudo ajustar un medio sólido para cuantificar la germinación *in vitro* de granos de polen de *Habranthus tubispathus*, i.e. con 0,1 M de sacarosa y 2 mM de BO_3H_3 y de Cl_2Ca , encontrándose valores superiores al 30 % de germinación, aceptables para esta técnica. Y además un medio líquido bajo técnica de gota suspendida, i.e. que contenía 20 % PEG y 0,8 M de sacarosa, resultando en valores de germinación mayores a 40 %. Sin embargo, éstas técnicas subestiman la capacidad de germinación *in vivo* del polen y son más lentas que las basadas en tinción.

Se comprobó que la determinación de la viabilidad por tinción morfológica no es una técnica confiable para estimar la verdadera capacidad para germinar del polen de *H. tubispathus* fresco y almacenado, pues la sobrestima. Esto es debido a que estos métodos, se basan en determinar la viabilidad más no la germinabilidad, y puede suceder que granos no abortados pierdan la capacidad de germinar, sin que ello se traduzca en malformaciones morfológicas. No obstante puede ser usado para un análisis preliminar de estimación de la viabilidad, ya que es un método rápido y de bajo costo. Los resultados confirman que el polen de esta especie se puede conservar en las condiciones evaluadas con baja humedad relativa por no más de un mes, lo que limitaría su posibilidad de uso en cruzamientos con especies o individuos de floración asincrónica.

H. tubispathus es una especie parcialmente auto-compatible y posee preferencia por la polinización cruzada. Es evidente la necesidad de fecundación para el cuajado de frutos y producción de semillas. Más allá de la importancia de estos resultados, no se pueden hacer mayores especulaciones sobre su implicancia en los posibles métodos de mejoramiento de la especie, en vista de los resultados sobre el modo reproductivo expuestos en el capítulo siguiente.

3.5 BIBLIOGRAFIA

Alves-Araujo, A., Santos, F.A. y Alves, M. 2007. Caracterizacáo palinológica de espécies de Amaryllidaceae sensu stricto ocorrentes no nordeste brasileiro. *Acta Bot Bras* 21:967–976.

- Artschwager, E., y McGuire, R.C. 1949. Cytology of reproduction in *Sorghum vulgare*. J. Agric. Res. 78:659–673.
- Alexander, M.P. 1969. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. Stain Technol. 44:117–122.
- Alexander, M.P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast, and bacteria. Stain Technol. 55:13–18.
- Baldwin, S.J. y Husband, B.C. 2013. The association between polyploidy and clonal reproduction in diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. Molecular Ecology 22:1806-1819.
- Barrett, S.C.H. y Eckert, C.G. 1990. Variation and evolution of mating systems in seed plants. In: S. Kawano (ed.), Biological approaches and evolutionary trends in plants. Academic Press. London. pp. 229-254
- Barrow, J.R. 1983. Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton. Crop Sci. 23:734–736.
- Bawa, K. S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. Evolution 28:85-92.
- Bots, M. y Mariani C. 2005. Pollen viability in the field. Report de la Commissie Genetische Modificatie, Univ of Nijmegen, COGEM report (CGM 2005-05), 52 pp.
- Brantjes, N.B. y Bos, J.J. 1980. Hawkmoth behaviour and flower adaptation reducing self-pollination in two Liliflorae. New Phytol.84:139-143.
- Brooking, I.R. 1979. Male sterility in *Sorghum bicolor* induced by low night temperature. II. Genotypic differences in sensitivity. Aust. J. Plant Physiol. 6:143–147.
- Broyles, S.B. y Wyatt, R. 1991. The breeding system of *Zephyranthes atamasco* (Amaryllidaceae). Bulletin of the Torrey Botanical Club 118:137-140.
- Bryan, J.E. 1989. Bulbs, volume I, A-H. Timber Press. Portland, Oregon.
- Bucher, M., Brander, K.A., Sbicego, S., Mandel, T. y Kuhlemeier, C. 1995. Aerobic fermentation in tobacco pollen. Plant Mol. Biol. 28:739–50
- Cabello, P. 2003. Viabilidad polínica en dos estados florales de Maqui, *Aristotelia chilensis* (MOL.) Stuntz. (Elaeocarpaceae). Tesis Lic. Agro. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 72p.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. y Crowe L.M. 1989. Membrane phase transitions are responsible for imbibition damage in dry pollen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:520–23.
- Dafni, A. y Firmage, D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. In: Dafni, A. Hesse, M. y Pacini, E. (eds). Pollen and pollination. Springer Verlage. Viena, (Austria). 113-132.
- De Hertogh, A. y Le Nard, M. 1993. The Physiology of Flower Bulbs. Elsevier Science. Amsterdam, Netherlands. 811 p.
- Erdtman, G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy - Angiosperms. New York, Hafner Publishing Company.
- Fernández, A.C., Marinangeli, P., Curvetto, N. y Facciuto, G. 2013. Reproductive Biology of *Habranthus tubispathus*. Acta Hort. 1000, 183-188.
- Galen, C., Plowright, R.C. y Thompson, J.D. 1985. Floral biology and regulation of seed set and size in the lily, *Clintonia borealis*. American Journal of Botany, Columbus, v.72, n.10, p.1544-1552.
- Godini, A. 1979. Counting pollen grains of some Almond cultivars by means of an haemocytometer. CIHEAM- Options Méditerranéennes. Instituto di Coltivazioni. Arboree, Università di Bari. pp. 83-86.
- Golan-Goldhirsh, A., Schmidhalter, U., Muller, M. y Oertli, J.J. 1991. Germination of *Pistacia vera* L. pollen in liquid medium. Sex. Plant Reprod. 4:182–87.
- Greissl, R. 1989. Viability analysis of monadic and polyadic pollen grains using optical contrast-fluorescence microscopy. Sci. Tecg. Inform. 15: 180-184.
- Gustafsson, Å. 1948. Polyploidy, life-form and vegetative reproduction. Hereditas 34:1-22.
- Gwata, E.T., Wofford, D.S., Pfahler, P.L. y Boote, K.J. 2003. Pollen morphology and *in vitro* germination characteristics of nodulating and nonnodulating soybean (*Glycine max*) genotypes. Theor. Appl. Genet. 106: 837–839.
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. y Shivanna K.R. 1984. The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. Theor. Appl. Genet. 67: 367–375.
- Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. y Crowe, J.H. 1989. Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant Cell Environ.* 12:83–91.
- Huang, T.S. 1972. Pollen flora of Taiwan. National Taiwan University Botany Department Press.
- Kannely, A. 2005. Preparation and quantification of entomophilous pollen using sonication and an area-counting technique. Madrono 52: 267–269.

- Kawaguchi, K., Shibuya, N. y Ishii, T. 1996. A novel tetrasaccharide, with a structure similar to the terminal sequence of an arabinogalactan-protein, accumulates in rice anthers in a stage-specific manner. *Plant J.* 9:777–85.
- Kearns, C. e Inouye, D. 1993. *Techniques for pollination biologist*. University Press. Of Colorado. (USA). 581 p.
- Kerhoas, C., Gay, G. y Dumas, C. 1987. A multidisciplinary approach to the study of the plasma membrane of *Zea mays* pollen during controlled dehydration. *Planta* 171:1–10
- Lansac, A.R., Sullivan, C.Y., Johnson, B.E. y Lee, K.W. 1994. Viability and germination of the pollen of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Ann. Bot. (London)* 74:27–33.
- Li, C., Yu, M., Chen, F. y Wang, S. 2010. *In vitro* maturation and germination of *Jatropha curcas* microspores. *Int. J. Agric. Biol.* 12:541–546.
- Lin, J.J. y Dickinson, D.B. 1984. Ability of pollen to germinate prior to anthesis and effect of desiccation on germination. *Plant Physiol.* 74:746–48.
- Mable, B.K. 2004. 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants': myths and mechanisms. *Biological Journal of the Linnean Society* 82:453-466.
- Martin, F. 1958. Staining and observing pollen tubes in the styles by means of fluorescence. *Stain Tech.* 34:125–128.
- Meerow, A.W. y Dehgan, B. 1988. Pollen morphology of the Eucharidae (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 75(12): 1857-1870.
- Osborn, M.M., Kevan, P.G. y Lane, M.A. 1988. Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in Southern Colorado. *Pl. Syst. Evol.* 159: 85-94.
- Pfahler, P.L., Pereira, M.J. y Barnett, R.D. 1997. Genetic variation for *in vitro* sesame pollen germination and tube growth. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1218–1222.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G. y Davis, R.W. 1993. A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7:974–85
- Rasband, W.S. 2015. ImageJ, EE.UU. Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland, EE.UU., <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Read, S. M., Clarke, A.E. y Bacic, A. 1993. Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W 38 pollen tubes by poly(ethylene glycol) and Cu_(II) salts. *Plant Cell Biology Research Centre, School of Botany, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia.* 177: 1-14.
- Ruiz, T.Z. y Arroyo, M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of secondary deciduous forest in Venezuela. *Biotropica* 19:221-230.
- Saavedra, F., Arroyo, M.T.K. y Hoffmann, A.J. 1996. The breeding system of *Hypochaeris advenum* (Ker-Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae), an endemic bulbous geophyte of the mediterranean-type climate region in central Chile. *Bot. Jahrb. Syst.* 118:1-8.
- Sage, T.L., Strumas, F., Cole, W.W. y Barrett, S.C.H. 1999. Differential ovule development following self- and cross-pollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 86:855-870.
- Sharma, M. 1967. Pollen morphology of Indian monocotyledons. *Journal of Palynology*, Special volume: 1-98.
- Shivanna KR, Sastri DC. 1981. Stigma surface esterase activity and stigma receptivity in some taxa. *Ann Bot* 47: 53–64
- Stanley, R.G. y Linskens, H.F. 1974. *Pollen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Stebbins, G.L. 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York, Estados Unidos.
- Stone, J.L., Thomson, J.D. y Dent-Acosta, S.J. 1995. Assessment of pollen viability in Hang-pollination experiments: A Review. *Am. Jour. of Botany.* 82(9): 1186-1197.
- Subbaiah, C.C. 1984. A polyethylene glycol based medium for *in vitro* germination of cashew pollen. *Can. J. Bot.* 62:2473–75.
- Sun, H., Treco, D. y Szostak, J.W. 1991. Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell* 64(6):1155-61.
- Taylor, L.P. y Hepler, P.K. 1997. Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 461-491.
- Theron, K.I. y De Hertogh, A.A. 2001. Amaryllidaceae: Geophytic growth, development, and flowering. *Hort. Rev.* 25:1–70.
- Tuinstra, M.R. y Wedel, J. 2000. Estimation of pollen viability in grain sorghum. *Crop Sci.* 40: 968-970.
- Van Bilsen, D., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. y Crowe, J.H. 1994. Altered phase behavior in membranes of aging dry pollen may cause imbibitional leakage. *Plant Physiol.* 104:1193-1199.

- Webb, C.J. y Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in Angiosperms. 2. Hecogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24:163-178
- Wiens, D., Calvin, C.L., Wilson, C.A., Davern, C.I., Frank, C. y Seavey, S.R. 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. *Oecologia* 71: 501-509.
- Yamburov, M.S., Astafurova, T.P. Zhuk, K.V., Romanova S.B. y Smolina V.M. 2014. The Effects of Drought and Flood Stress on Pollen Quality and Quantity in *Clivia miniata* (Lindl.) Bosse (Amaryllidaceae). *Biomed. & Pharmacol. J.*, Vol. 7(2), 575-580.
- Zapata, T.R. y Arroyo, M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221-230.
- Zhang, H.Q. y Croes, A.F. 1982. A new medium for pollen germination *in vitro*. *Acta Bot. Neerl.* 31:113-19

4. CAPITULO 4 – Evaluación del modo reproductivo de *Habranthus tubispathus*

4.1 INTRODUCCION

4.1.1. Evaluación fenotípica de la progenie de cruzamientos y autofecundaciones de individuos que varían en el color de flor

El color de flor es uno de los atributos más importantes a la hora de considerar el potencial ornamental de una planta. Para un plan de mejoramiento es necesario conocer las variantes naturales en este atributo, así como su modo de herencia. En la naturaleza, *Habranthus tubispathus* presenta flores amarillas, rosadas y blancas, con variaciones en las tonalidades. Con el objetivo de conocer la herencia del color de flor de *H. tubispathus*, se realizaron cruzamientos recíprocos de individuos previamente castrados y contrastantes para los colores amarillo, rosado y blanco; autofecundaciones y cruza entre individuos con mismo color de flor. Para cada combinación se usaron 10 individuos receptores y 10 dadores de polen. Fueron sembradas 120 semillas de cada cruzamiento y autofecundación en invernáculo (temperatura 20-28 °C), riego y fertilización controlados. Luego de 3 años de cultivo, la descendencia comenzó a florecer, y estas primeras evaluaciones evidenciaron en todos los casos el mismo color de corola que el progenitor femenino. Este comportamiento se podría explicar por dos vías, uno poco probable sería que el color de la flor tuviera herencia citoplásmica. Este tipo de herencia es el que gobierna la variegación de hojas de muchas plantas ornamentales y está relacionada con la herencia materna del ADN cloroplástico, pero no se da para color de flor (Hagemann, 2000). La otra alternativa es que no haya fertilización entre gametas de los parentales y la especie presente reproducción apomítica, con toda la descendencia genéticamente idéntica al progenitor materno. Si bien el objetivo inicial de este estudio fue evaluar el modo de herencia del color de flor en *H. tubispathus*, la obtención de este resultado fue un indicio de que el modo reproductivo no resultaba ser el esperado de acuerdo a los hallados en experiencias previas (Capítulo 3, inciso 3.3.3), i.e. reproducción sexual parcialmente auto-compatible; por lo que el rumbo de la investigación cambió hacia la confirmación de una nueva hipótesis: la presencia de reproducción apomítica en esta especie. Dos antecedentes dan evidencias citológicas que apoyan esta hipótesis. Una es la aportada por Pace en 1913 y la otra por Brown en 1951, quienes presentaron estudios a nivel de desarrollo embrionario donde prueban que en *Atamasco texana* para el primero y *Zephyranthes texana* para el segundo, dos sinonimias de la misma especie presente en los Estados Unidos y citada como sinónima a *Habranthus tubispathus*, tienen una reproducción apomítica. De todos modos se decidió proseguir con la investigación, debido a que en nuestra región no se presentaron estudios de la especie, y tampoco se encuentra

completamente dilucidada la equivalencia entre ambas especies. Sumado a esto, contábamos con la hipótesis de la presencia de varias ploidías, y esto no fue reportado para *Z. texana*.

La apomixis fue descrita en el 15 % de las familias de Angiospermas (Dall'agnol y Schifino-Wittmann, 2005). Una de las formas en las que suele presentarse la apomixis es la gametofítica, en la cual un saco embrionario maduro no reducido ($2n$) se forma a través de un proceso mitótico. El mismo puede generarse a partir de la propia célula madre de las megasporas después de una falla en la meiosis (diplosporía), o bien a partir de una célula somática de la nucela (aposporía). El desarrollo partenogenético del óvulo y la formación del endosperma de manera autónoma, o después de la fertilización de los núcleos polares (pseudogamia), completa la formación de la semilla (Savidan, 2000; Siena *et al.*, 2008). Esta fertilización de los núcleos polares para la formación del endosperma se produce en aproximadamente el 90% de las especies apomícticas (Mogie, 1992). La autopolinización es posible en las especies apomícticas pseudogamas, ya que usualmente son autofértiles (Hörandl, 2010).

En general, la apomeiosis (falta de meiosis) está dada por una desregulación temporal o espacial de los genes que controlan la vía de reproducción sexual (Sharbel *et al.*, 2009; Baubec *et al.*, 2010). Es muy probable que esta desregulación se deba a la poliploidía, ya que la gran mayoría de las plantas apomícticas naturales son poliploides. La apomixis gametofítica tiende a ocurrir en especies poliploides, y con mayor frecuencia en los niveles tetraploides o superiores (Asker y Jerling 1992). Sin embargo, las especies poliploides también presentan reproducción sexual, por lo tanto no se puede determinar la apomixis utilizando la poliploidía como único indicador.

Existen evidencias que sugieren consistentemente que la mayoría de los alelos que controlan la apomixis son dominantes, esto no es sorprendente, dada la asociación que existe entre apomixis y poliploidía. Esto es, de ser un carácter recesivo, un tetraploide requeriría que se expresen cuatro copias de alelos; algo muy poco probable que ocurra en la naturaleza (Whitton *et al.*, 2008). Se ha planteado además la hipótesis de que la apomixis deriva directamente de las vías sexuales normales. Esta omisión de la sexualidad normal puede deberse a cambios en la expresión genética durante la poliploidización y/o hibridación, ya que la mayoría de las especies apomícticas son aloploiploides (Carman, 1997).

Dada la complejidad presente en los sistemas reproductivos de algunas especies vegetales, y la dificultad en una correcta determinación, existen varios métodos que permiten realizar una caracterización adecuada. Entre los que posibilitan la clasificación precisa del modo de reproducción se encuentran los fenotípicos, la caracterización citoembriológica, el uso de marcadores genéticos y pruebas biológicas (Marmolejo Cortes, 2010).

La presente investigación tuvo por objeto caracterizar el modo reproductivo de *Habranthus tubispathus* mediante estudios citológicos, embriológicos, fenotípicos y moleculares.

4.1.2. Estudios citoembriológicos

La determinación del modo reproductivo puede realizarse observando la presencia o no de meiosis y la composición de las células del saco embrionario, ya que dependiendo de la forma reproductiva de la especie, puede haber una composición distinta de estas células. Por ejemplo el saco embrionario sexual típico, conocido como tipo *Polygonum*, está compuesto de siete células y ocho núcleos (una ovocélula, dos sinérgidas, dos antípodas y una célula central con dos núcleos polares); los sacos apospóricos tipo *Panicum*, por dos sinérgidas, una ovocélula y un núcleo polar; y los tipo *Paspalum* por dos sinérgidas, una ovocélula y dos núcleos polares (Savidan, 2000; Asker y Jerling, 1992). Esta determinación puede hacerse observando el desarrollo de la célula madre de las megasporas y el saco embrionario, y resulta ser una técnica muy útil para realizar una detección y clasificación de la forma de apomixis.

A pesar que en el mundo existe un gran número de especies de Amarilidáceas, actualmente no se dispone de mucha información sobre el desarrollo del óvulo y saco embrionario en especies de esta familia. Los principales aportes fueron realizados por Pace (1913), quien realizó un estudio de *Atamosco texana*, también conocida en esa época como *Z. texana*, realizando la primera descripción de los sacos embrionarios para la especie. Por otra parte Brown (1951) para *Z. texana*, realizó una descripción de la presencia de un saco embrionario tipo *Adoxa*, pero los óvulos eran no reducidos, con 24 cromosomas, en lugar de reducidos; sugiriendo de esta forma la presencia de una reproducción apomíctica.

Como *A. texana* y *Z. texana* fueron finalmente clasificadas como *H. tubispathus*, y no existen reportes de la forma de desarrollo del óvulo ni del saco embrionario en material local de la especie, se buscó tipificar la composición y formación del saco embrionario en *H. tubispathus*, comparándolo con los patrones ya conocidos para otras especies similares y potencialmente equivalentes ya estudiadas, y establecer si existe alguna variación con respecto a los modelos conocidos para esta familia o para las angiospermas en general.

4.1.3. Caracterización cariotípica

En las Amarilidáceas, el estudio del cariotipo ha sido una herramienta muy útil al momento de resolver conflictos taxonómicos, ya que el número de cromosomas y el nivel de ploidía son datos necesarios en el estudio de una especie, en la caracterización del germoplasma y para establecer relaciones filogenéticas entre especies. En general ha sido reportado para esta familia un número básico ancestral de $x=11$, el cual se encuentra en los

géneros *Amaryllis* e *Hippeastrum* (Naranjo, 1969; Naranjo y Andrada, 1975; Naranjo y Poggio, 2000). De acuerdo con Meerow *et al.* (2000), los géneros *Zephyranthes* y *Habranthus* presentan series euploides y aneuploides. Según Daviña y Honfi (2011), autores que analizaron por primera vez el comportamiento meiótico en algunas especies de *Habranthus*, observaron 6 bivalentes en *H. chacoensis* y 12 bivalentes en *H. brachyandrus*, que confirman la existencia del número básico $x=6$ propuesto para el género.

Flory (1938) propone que dentro de la tribu *Zephyrantheae*, la evidencia cromosómica y el estudio de los sistemas reproductivos parecen indicar que algunas formas de apomixis tienen importancia en la fijación de heteroploidías dentro de la misma especie, y que este fenómeno es muy común en el grupo. Pace (1913) presentó una detallada evidencia citológica de este fenómeno en *A. texana*.

En los últimos años se han visto otros enfoques para la estimación del número de cromosomas, y consecuentemente del nivel de ploidía de una especie vegetal, y se han desarrollado distintos métodos para poder determinarlo. Sin embargo, el conteo de cromosomas en células meristemáticas sigue siendo el método inequívoco para la determinación del número de cromosomas y nivel de ploidía de una especie vegetal (Chong y Ozias-Akins, 1992).

La poliploidización se encuentra ampliamente difundida en el reino vegetal, y desempeña un papel importante en la evolución y la diversificación de angiospermas, de las cuales se estima que aproximadamente el 70 % de las especies son poliploides (Masterson, 1994). Este aumento en la ploidía que se produce de forma natural, puede ser debido a que confiere ventajas selectivas sobre el nivel diploide, entre las que podemos mencionar el aumento del vigor de los fenotipos poliploides, aumento de la resistencia a la sequía, resistencia a plagas y enfermedades, cambios en el tiempo de floración, en el tamaño de órganos y en la proporción de biomasa, entre otras (Osborn *et al.*, 2003; Adams y Wendel, 2005; Comai, 2005; Chen y Ni, 2006; Udall *et al.*, 2006).

Estudios con descripción de datos citogenéticos en el género *Habranthus* han revelado poliploidía, aneuploidía y euploidia (Flory, 1977), con un número básico de cromosomas inestable y, sumado a esto, inestabilidad cariotípica (Daviña, 2001). Esto podría ser explicado por rápidas translocaciones debidas a la presión del ambiente (Thoibi-Devi y Borua, 1997). En *Zephyranthes candida*, *Z. grandiflora* y *Z. flava*, también fueron reportadas anomalías meióticas (Thoibi-Devi y Borua, 1996). Estos son algunos de los factores que podrían llegar a tener influencia en el fenotipo de las especies en cuestión, pudiendo explicar la variación morfológica que presentan. Si bien el conteo cromosómico es una técnica bastante laboriosa, ésta es la única que con certeza nos provee del nivel de ploidía presente en el material de estudio (Muñoz *et al.*, 2006). Por lo tanto, en primera instancia en este

estudio, se realizó la caracterización cariotípica de *H. tubispathus* mediante el conteo cromosómico.

4.1.4. Test de progenie mediante Marcadores Moleculares

La aplicación de marcadores moleculares permite extender y complementar la caracterización basada en descripciones morfológicas y bioquímicas, brindando información más segura y detallada que aquella recolectada mediante caracteres fenotípicos (Karp *et al.*, 1997). Esto se debe principalmente a que posibilita estudiar de forma directa la variación del ADN que no es influida por el ambiente, reconociendo diferencias génicas entre individuos y obteniéndose un perfil molecular característico para cada variedad e independiente de las condiciones de crecimiento (Pagano *et al.*, 2007).

Se decidió realizar el test de progenie con un tipo de marcadores que posea buena reproducibilidad, sin dependencia de conocer secuencias y, dado que es el primer trabajo realizado para esta especie con esta técnica, proporcionar una herramienta fiable para nuevos estudios en un futuro. Se utilizaron marcadores del tipo ISSR (*Inter-SSR*), que utilizan para anclarse secuencias conservadas de microsatélites (SSR) y amplifican por fuera de ellos. Las principales ventajas que esta técnica ofrece son: la posibilidad de detección de una alta variación, su alta reproducibilidad debida a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR y que no son necesarias altas concentraciones de ADN. Por otro lado, para diseñar los cebadores o primers no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio, el cual resulta ser un punto importante en nuestro estudio, debido a que no existen evidencias de la aplicación de marcadores moleculares para evaluar la variabilidad genética nuclear en *H. tubispathus*. Finalmente, son sencillos de implementar, rápidos, eficientes y poco costosos (Gonzalez y Aguirre, 2007).

Los test de progenie, en las cuales se utilizan marcadores moleculares para evaluar parentales y descendencia, son métodos valiosos para estimar el nivel de agamospermia en apomícticos facultativos, que permiten evitar algunas de las deficiencias inherentes a los métodos citoembriológicos clásicos (Marshall y Brown, 1974).

4.1.5. Mediciones y análisis del contenido de ADN nuclear

El método de análisis de semillas por citometría de flujo (ASCF) introducido por Matzk *et al.* (2000), es una herramienta poderosa para distinguir entre diferentes modos de reproducción de plantas que involucran el desarrollo sexual y apomíctico. Este método se basa en estimaciones del contenido de ADN relativo del embrión y del endosperma de semillas individuales, y permite evidenciar las diferencias que existen en la relación de ploidía entre ambos al momento de evaluar el proceso que genero la semilla. Esta característica que proporciona este método es importante, debido a que a veces la relación genómica

materna:paterna del endospermo es distinta en las plantas sexuales y en las apomíticas. En las sexuales, hay una relación 2:1 materno/paterno (madre $n + n$; padre n), mientras que en las apomíticas esa relación puede variar, ej. 4:1 (madre $2n + 2n$; padre n) en algunas especies de *Paspalum* (Ortiz *et al.*, 2004).

Las especies como *H. tubispathus*, son particularmente adecuadas para estos estudios porque la pseudogamia en sacos embrionarios apóspóricos implica la fertilización de dos núcleos polares no reducidos, lo que daría una proporción de contenido de ADN entre el embrión y el endospermo de 2/5, que difiere de la proporción 2/3 de la relación regular de reproducción sexual (Quarin, 1999).

Para una comprensión adecuada de la dinámica y la estática de cualquier grupo de plantas, el conocimiento de su sistema de reproducción es esencial. Con mayor frecuencia, no solo aclara la naturaleza de la variación en el grupo, sino que también ayuda a determinar los procedimientos efectivos de mejoramiento de plantas (Raina y Khoshoo, 1972). Como esta especie está bajo una gran influencia antropogénica, este estudio pretende proporcionar datos que permitan dilucidar el modo reproductivo, con el objetivo de que estos datos puedan ser útiles en futuros trabajos de mejoramiento, ya que *H. tubispathus* posee un gran potencial como especie ornamental. Esto puede colaborar con la domesticación de la especie y finalmente conducirá a su conservación.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Estudios citoembriológicos

El siguiente estudio abarca fundamentalmente las etapas de prefertilización durante el desarrollo del óvulo, por lo tanto, el material vegetal consistió de flores de *H. tubispathus* recolectadas en diferentes estados de desarrollo, que variaban desde aquellas donde sólo comenzaban a diferenciarse las anteras y los óvulos aún estaban en una fase muy incipiente (de primordios), hasta yemas donde las flores estaban maduras y listas para la antesis o bien post antesis. Como en muchas bulbosas el desarrollo del saco embrionario ocurre antes del alargamiento del escapo floral, por lo que fue necesario abrir numerosos bulbos (más de 40) con sus botones florales en distintos estadios de desarrollo. Por lo tanto, las recolecciones se llevaron a cabo 3, 2, 1 día, y 12 hs antes de antesis (DAA), durante la antesis y 2 hs post antesis. Luego de remover el perianto, los primordios florales, se fijaron en FAA (etanol al 70 %, ácido acético glacial, formaldehído, 90: 5: 5) durante 24-48 hs. Posteriormente se procedió a la inclusión en parafina (Paraplast) y se realizó la sección con un micrótopo de rotación, de modo que los óvulos fueron procesados mediante la preparación de láminas seriadas de 8-10 μm de espesor, en cortes longitudinales y transversales. Una vez colocados en portaobjetos, fueron teñidos con safranina-fast green (Johansen, 1940).

El procedimiento descrito por Johansen (1940) es riguroso, en el sentido de que este autor considera imprescindible tomar consideraciones especiales que aseguren que los resultados sean confiables a la hora de interpretar el proceso embriológico en trabajos de este tipo. Para asegurar que se cumplieran las pautas sugeridas, se tomaron las siguientes consideraciones metodológicas:

- Se procesó un número aproximado de 450-500 óvulos de diferentes edades: desde primordios seminales hasta óvulos maduros en etapa post antesis.
- Los óvulos fueron seccionados en sentido longitudinal, es decir, en el plano paralelo al eje micropilar-calazal; ocasionalmente también se realizaron secciones transversales de los mismos, a fin de observar detalles en los estados más avanzados de desarrollo.

Los cortes producidos según el procedimiento anterior fueron evaluados sistemáticamente, para así tener una visión total y ordenada de las estructuras que forman parte del óvulo y de su interior a medida que avanza el proceso de megasporogénesis y megagametogénesis. Las muestras fueron montadas de forma permanente, utilizando bálsamo de Canadá sintético (Biopur) como medio de montaje (Raymúndez, 1997). Las observaciones y fotomicrografías fueron realizadas en un microscopio Nikon Eclipse 80I, con cámara automática y cámara de video incorporadas. La clasificación de los sacos embrionarios se realizó de acuerdo con Crane (2001).

4.2.2. Caracterización cariotípica

Los estudios citológicos fueron llevados a cabo a partir del material recolectado de la población presente en el invernáculo del CERZOS-CONICET, descrita anteriormente. Las plantas fueron retiradas de sus recipientes con sustrato, e incorporadas en nuevos recipientes con perlita, a fin de obtener un nuevo crecimiento de los ápices radiculares, y evitar la ruptura de los mismos al ser retirados de sus contenedores. Para determinar el número cromosómico de la especie en mitosis se utilizaron ápices radiculares de 1-2 cm de longitud, los cuales fueron pre-tratados con 8-hidroxiquinolina (0,002 M) durante 8 hs. Luego fueron fijados en una mezcla de etanol absoluto y ácido láctico, en una relación 5:1 (Fernández, 1973), durante 24 hs a 5-6 °C (en heladera) y conservados en alcohol 70 % a 5-6 °C, hasta su posterior análisis. La coloración fue realizada mediante la técnica de Feulgen, que consiste en una hidrólisis ácida de las raíces con ácido clorhídrico (HCl) 1 N durante 10 min a 60 °C. Posteriormente se realizó la tinción en oscuridad, con el reactivo de Schiff, durante aproximadamente 15 min. Las zonas meristemáticas fueron disgregadas en orceína acética al 1,8 % y posteriormente aplastadas con cubreobjetos sobre portaobjetos. Las metafases se registraron mediante un fotomicroscopio Nikon Eclipse 80 (Japón). Para contar e identificar

la morfología cromosómica, solo se consideraron las células cerradas y los cromosomas con centrómero claramente visible para calcular el tamaño medio.

El conteo, la individualización y el ordenamiento de los cromosomas se realizaron mediante la herramienta de Adobe Photoshop. Para esto se recortaron digitalmente los cromosomas individuales, ordenando el brazo corto hacia arriba y emparejando cuando sea posible en función de la longitud y la posición del centrómero. Se dividieron en dos grupos según la ploidía que presentaban, tetraploide y hexaploide. Posteriormente se realizó el análisis y descripción del cariotipo, en el cual los cromosomas fueron agrupados de acuerdo al índice centromérico y la nomenclatura empleada fue la propuesta por Levan *et al.* (1964). Al menos 10 metafases óptimas fueron usadas para la confección del ideograma. Las longitudes totales de los brazos cortos, brazos largos y satélites se midieron con un sistema informático. Todos los datos de cada placa se calcularon con el software Karyo 95 (Dipartimento di Botanica, Università di Catania, Italia), diseñado específicamente para el análisis de cromosomas, con el fin de mejorar la precisión de los datos (Pavone *et al.*, 1995). La nomenclatura usada para la descripción de la morfología cromosómica, es la propuesta por Levan *et al.* (1964) basada en índices de brazos e índice centromérico; según la cual, los cromosomas de la especie estudiada se pueden dividir en tres grupos: (m) metacéntricos (Índice centromérico $I_c = \text{brazo corto} \times 100 / \text{longitud total del cromosoma} = 50-37,5$); (sm) submetacéntricos ($I_c = 37,5-25$); y (st) subtelocéntricos ($I_c = 25-12,5$). La asimetría cariotípica intracromosomal fue estimada mediante los siguientes índices:

- $A_1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n \frac{b_i}{B_i}}{n}$

Donde n corresponde al número de pares o grupo de cromosomas homólogos, b_i es el promedio de la longitud de los brazos cortos de cada par o grupo de cromosomas homólogos y B_i es el promedio de la longitud de los brazos largos de cada par o grupo de cromosomas homólogos. Este índice arroja valores que van de 0 a 1, y cuanto menores son los cromosomas tienden a ser metacéntricos.

- $A_2 = \frac{S}{x}$

Donde S es el desvío estándar y x la media del largo de cada cromosoma. Se utiliza el coeficiente de dispersión de Pearson para estimar esta asimetría cariotípica, que está dada por la relación entre el tamaño de los cromosomas. Proporciona una forma sencilla de estimar la variación en la longitud de los cromosomas, que no depende del número de cromosomas. Debido al uso de la desviación estándar en lugar de la varianza, el índice A_2 es independiente del tamaño del cromosoma y no tiene unidades.

4.2.3. Test de progenie mediante Marcadores Moleculares

Fueron efectuados 10 cruzamientos, entre plantas previamente individualizadas que se encontraban en la colección de estudio de CERZOS-CONICET, seleccionando 10 plantas al azar para ser utilizadas como dadoras de óvulos, y la misma cantidad de plantas como dadoras de polen. Luego de aproximadamente tres semanas las semillas maduras fueron recolectadas y sembradas en recipientes individuales, debidamente identificados. Una vez que se obtuvo tejido verde de la progenie, se procedió a realizar las extracciones de ADN de las mismas y de sus progenitores.

Para la extracción de ADN genómico se utilizó un protocolo rápido a partir de material fresco (Zappacosta *et al.*, 2011). El mismo fue realizado mediante la siguiente solución reguladora: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM ClNa, 10 % SDS y 10 mM β -mercaptoetanol. Se partió de material fresco de plantas adultas, aproximadamente 100 mg. Las hojas se cortaron en pequeñas porciones y colocaron en un mortero con nitrógeno líquido, de esta manera se logró triturar y se homogeneizar las muestras. El producto obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 700 μ l de solución tamponada de extracción, y se incubó durante 20 min a 65 °C con agitación lenta (estufa con agitador vertical). Posteriormente se agregaron 200 μ l de acetato de potasio (5 M) y se incubó en hielo durante 20 min. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las muestras durante 20 min, en una centrífuga Eppendorf (13.000 rpm) para eliminar restos de tejido. Este último paso fue repetido a fin de lograr un sobrenadante más limpio. El mismo se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 700 μ l de isopropanol para precipitar el ADN, luego se incubaron durante 10 min a -20 °C. El ADN se precipitó por centrifugación a 13.000 rpm durante 4 min. El precipitado se lavó con 600 μ l de alcohol 70 % y se centrifugó durante 4 min a 13.000 rpm. Este lavado se repitió una segunda vez con alcohol absoluto. Luego el pellet se secó a estufa a 37 °C o en flujo laminar durante aproximadamente 30 min y se resuspendió en 100 μ l de solución TE 1X (10 mM Tris + 1 mM EDTA).

La concentración y calidad de ADN se determinó en un espectrofotómetro Merk (Spectroquant Pharo 300, Alemania) con las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. Para determinar la calidad de ADN se utilizó la relación A260/A280 y se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. La concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] (\mu\text{g/ml}) = A \times D \times C$$

Donde A es la lectura de absorbancia obtenida a 260 nm, D es el factor de dilución (generalmente 1:100) y C es una constante, con un valor de 50 μ g/ml, igual a la concentración de ADN doble cadena que genera un valor de absorbancia de 1.

Fueron testeados dos series de siete cebadores cada una (Tabla 4.1), en principio en los parentales (5 maternos y 5 paternos), a fin de determinar bandas polimórficas que evidencien diferencias entre ellos; y luego en su descendencia, aproximadamente 25 individuos para cada cruzamiento.

Tabla 4.1: Cebadores ISSR utilizados para estimar la variabilidad genética en medios hermanos de *H. tubispathus*.

CEBADOR	SECUENCIA (5' a 3')
Pr 4	GAGAGAGAGAGAGAGAT
Pr 7	CTCTCTCTCTCTTTG
Pr 9	CAACAACAACAACA
Pr10	AGCAGCAGCAGCAGC
Pr14	CACCACCACCACGC
Pr16	GACAGACAGACAGACA
Pr19	GATAGATAGACAGACA
Pr20	ACTGACTGACCGACTG
IS-61	GAGAGAGAGAGAGAT
IS-62	GATAGATAGATAGATAGATA
IS-63	AGAGAGAGAGAGAGAGC
IS-64	TTTATTATTATTATT
IS-65	AGAGAGAGAGAGAGAGT
IS-9	TGTGTGTGTGTGTGTA
IS-11	CACACACACACACAG

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, conteniendo 10 ng de ADN, 100 ng de primer, 1,5 unidades de Taq polimerasa (Promega), 50 mM de Cl₂Mg, 2,5 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 0,25 µl de BSA 100X y 2,5 µl buffer 10X. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Biorad (MyCycler, Estados Unidos), utilizando un programa que consistió en 1,5 min desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 40 s a 94 °C, 45 s a 52 °C y 1,5 min a 72 °C; además de un paso final de extensión de 5 min a 72 °C. Si bien la temperatura inicial de annealing empleada fue de 52 °C, posteriormente fue modificada para los distintos cebadores utilizados. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2 %, los cuales fueron teñidos mediante el colorante SyberSafe. La longitud de los productos de amplificación fue estimada por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz azul y se registraron con cámara digital.

El modo reproductivo por el que fue generado cada individuo de la progenie (sexualidad o apomixis), fue determinado comparando los patrones de bandas amplificadas por los progenitores y cada una de sus progenies. Considerando como de origen sexual a los individuos que muestran bandas polimórficas (diferentes) con respecto a la madre, y apomíctico cuando la totalidad de las bandas amplificadas por la madre fueron compartidas por el hijo. Este esquema se utilizó para detectar loci heterocigotos en ambos genotipos, es decir, marcadores polimórficos que segregan en la progenie (Mather, 1951).

El análisis de los marcadores fue llevado a cabo mediante una puntuación visual desde los geles identificando (1) para presencia o (0) ausencia de bandas, y los datos se incluyeron en una matriz binaria utilizando el programa Microsoft Excel. Sólo fueron analizadas bandas de ADN claras y no ambiguas. Se usó un espacio en blanco para denotar los datos faltantes causados por una falla en la amplificación o la presencia de bandas poco claras o mal definidas. Una banda se consideró polimórfica solo si estaba presente en al menos un genotipo y ausente en los demás.

4.2.4. Mediciones y análisis del contenido de ADN nuclear

Los análisis de citometría de flujo se utilizaron para determinar el contenido de ADN y con ello el nivel de ploidía de las plantas experimentales, a fin de reconstruir las vías reproductivas de las semillas maduras. Previo a éste análisis se habían identificado diferencias morfológicas entre algunos individuos dentro de la población de estudio, que poseían hojas más anchas y flores más grandes, indicando que podrían llegar a presentar una diferencia en la ploidía. Por lo tanto, se evaluaron las semillas recolectadas de ambos grupos, y se obtuvo un valor medio del tamaño del genoma ($2C$) a partir de mediciones de al menos tres individuos.

Cuando se mide el contenido de ADN nuclear mediante citometría de flujo, es necesario cortar el tejido de la planta de interés junto con un estándar interno: este estándar debe estar lo más cerca posible de las plantas de interés. De esta manera, la variación en las intensidades de señal debidas a la cinética de la tinción, a la absorción de la luz y al enfriamiento por los componentes de la muestra, así como a los instrumentos y otras variables, se reduce al mínimo. *Allium cepa* L ($2C = 34.98$ pg, Doležel *et al.*, 1998) fue elegida como estándar interno para *H. tubispathus*, debido a que las especies pertenecen a familias emparentadas.

Las semillas individuales derivadas de autofecundaciones de los dos grupos de individuos identificados se cortaron finamente luego de agregar 0,5 ml tampón de extracción (Kit Partec P CySatin UV Precise P 05-5002). Se incorporó el tejido de cada individuo para cada muestra más el patrón interno, y fueron cortados con una cuchilla de afeitar en una placa de Petri. Tras 2 min de incubación, las muestras se filtraron a través de una malla de nylon

de 50 µm directamente en el tubo de muestra donde se añadieron 1,5 ml de solución de colorante DAPI (0,6-diamidino-2-fenilindol) (kit Partec P CySatin UV Precise P 05-5002). La mezcla se incubó durante 2 min más a temperatura ambiente, para luego proceder al análisis. La intensidad de fluorescencia de los núcleos teñidos con DAPI se realizó mediante citómetro de flujo Partec PA II (Partec GmbH, Münster, Alemania), ubicado en el Instituto de Floricultura (INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina), con el detector funcionando a 355 nm.

Para cada muestra, se analizaron los histogramas con una intensidad de fluorescencia relativa de alrededor de 3000 núcleos, se aceptó un valor de CV del 8 % para cada pico de muestra (G0/G1 pico). El análisis de los datos se realizó utilizando el software Partec FloMax de PA II. Los niveles de ploidía se estimaron comparando el pico de ADN de las muestras con el patrón interno. Para reconstruir las vías reproductivas de las semillas maduras fue utilizado el método FCSS descrito por Matzk *et al.* (2000).

Todos los parámetros citométricos (picos del cromatograma, valores medios y coeficiente de variación) se calcularon utilizando el software FloMax® (Sysmex Partec GmbH, Münster, Alemania). El tamaño del genoma nuclear de cada muestra se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Contenido ADN 2C muestra} = \left[\frac{\text{Media muestra pico G1}}{\text{Media estándar pico G1}} \right] \times \text{Contenido estándar ADN 2C (pg ADN)}$$

4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

4.3.1. Estudios citoembriológicos

Las observaciones de los sacos embrionarios maduros fueron realizadas en aquellas muestras recolectadas 2 hs después de producida la antesis. Al igual que todas las especies de la familia Amaryllidaceae y la mayor parte de las Monocotiledóneas, las flores de *H. tubispathus* presentan ovario ínfero, tricarpelar, trilobular. Tal y como fue determinado para el cálculo de eficiencia reproductiva (ER) previamente en el Capítulo 3, en cada lóculo se forman en promedio 42 óvulos, que se presentan insertos en el eje de la inflorescencia de manera intercalada. Como se observa en las Figuras 4.1 y 4.2, los óvulos son ortótropos (el funículo, la chalaza y el micrópilo se hallan en la misma línea), monotégmicos (un solo tegumento) y pseudocrasinucelados (tejido nucelar que rodea a la célula madre de las megasporas). A pesar de que la mayoría de las dicotiledóneas y monocotiledóneas tienen óvulos bitégmicos, muchas dicotiledóneas gamopétalas tienen óvulos unitégmicos. Éstos se encuentran en representantes de tres familias de monocotiledóneas: Orchidaceae, Poaceae y Amaryllidaceae (Takhtajan, 1991).

El tegumento se encuentra conformado por células de núcleo prominente, poco diferenciadas aún hasta el momento de la madurez del saco embrionario, principalmente de forma isodiamétricas al comienzo de la megasporogénesis, tornándose algo más alargadas en el sentido del eje longitudinal del óvulo cuando madura el saco embrionario (Figura 4.1). A medida que avanza el desarrollo del saco embrionario, se van formando células con vacuolas muy grandes, que ocupan casi la totalidad del mismo, de forma ovoidal, de paredes delgadas y núcleo reducido (Figura 4.1).

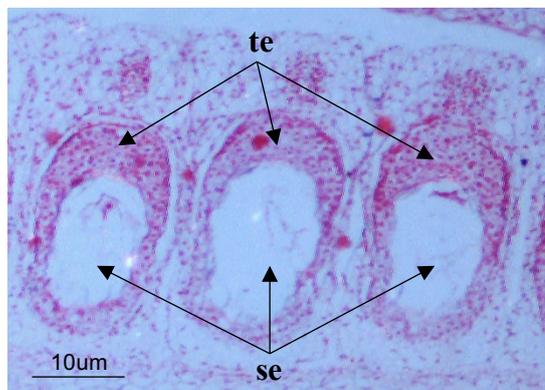


Figura 4.1: *H. tubispathus*. Corte longitudinal de un óvulo maduro mostrando el único tegumento que se desarrolla en esta especie (te) y la cavidad del saco embrionario (se).

Tal y como fue reportado por Pace (1913) para *A. texana*, la célula arquiesporial funciona directamente como la célula madre de las megasporas. Previo a la división nuclear (mitosis) en la célula madre de las megasporas, hay un gran aumento en el volumen del citoplasma y del núcleo (Figura 4.2), y usualmente una pequeña vacuola que está presente en la célula madre se agranda antes de la división.

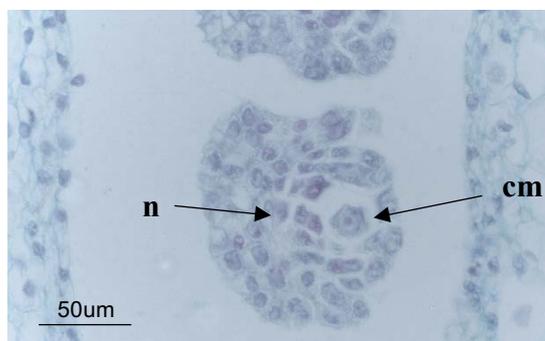


Figura 4.2: *H. tubispathus*. Corte longitudinal del óvulo mostrando la nucela pseudocrasinucelada (n) y la célula madre de las megasporas (cm) en el centro.

Por medio de ésta técnica, se logró identificar al megasporocito para la especie en estudio (Figura 4.3), el cual funciona directamente como célula madre de las megasporas. El megasporocito, se encuentra embebido en el centro de la nucela; presenta un tamaño muy

grande con respecto al resto de las células de ésta (7-10 veces el tamaño de una célula regular de la nucela), un citoplasma denso y un núcleo prominente, con un solo nucléolo (Figura 4.3). Además, previo a la división celular se produce un gran aumento del volumen del citoplasma y el núcleo, y la célula presenta una pequeña vacuola.

Dado que el objetivo del presente estudio fue caracterizar el saco embrionario en *H. tubispathus*, no se enfatizó en la identificación de las etapas de división que preceden hasta la formación del mismo. De todos modos, es bien conocido desde 1951 por Brown, para *Z. texana*, que la metafase produce células no reducidas (con 24 cromosomas) por divisiones mitóticas. Posteriormente se producen dos divisiones nucleares más (Pace, 1913) para dar un saco embrionario maduro octonucleado. Existe una organización determinada de los ocho núcleos: dos sinérgidas y una ovocélula hacia el micrópilo, tres antípodas en la zona chalazal y dos núcleos polares en la región media pero cerca de las antípodas.



Figura 4.3: *H. tubispathus*. Megasporocito (me) en profase I inmerso en la nucela indiferenciada (nu), orientado en sentido polar en el eje calazal-micropilar. Presenta un solo núcleo y citoplasma prominente.

Una característica común dentro de estas especies, que también fue observada en este estudio, es la formación de una estructura que interviene de forma activa en el posterior desarrollo del embrión: la hipóstasis. La misma está compuesta por un conjunto de células modificadas que suelen presentar las paredes celulares lignificadas y que se disponen por lo general en la región chalazal del saco embrionario (Tilton, 1980) (Figura 4.4). Se le ha asignado una función de transporte de nutrientes desde los tejidos maternos hasta el saco embrionario y el embrión, debido principalmente a que se encuentra ubicada entre los haces vasculares y el saco embrionario, y a que está rodeada de células nucelares de reserva (Titlon, 1980; Hita *et al.*, 1996).

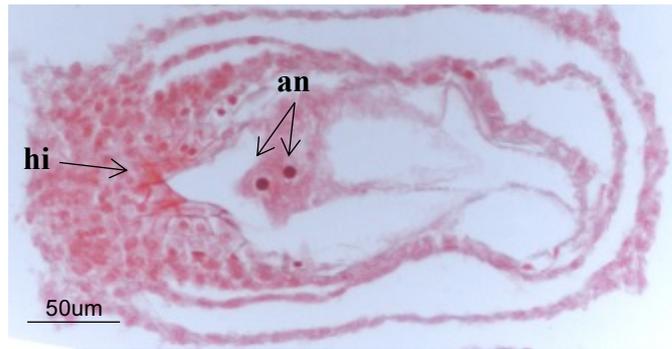


Figura 4.4: *H. tubispathus*. Saco embrionario con desarrollo de hipóstasis (hi), y dos núcleos antípodos (an).

Tal y como fue descrito por Raymúndez *et al.* (2008) para la especie *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb., especie que también pertenece a la familia de las Amaryllidaceae; la megagametogénesis tiene una primera división mitótica que origina dos núcleos (Figura 4.5). Posteriormente se sitúan en los extremos opuestos del saco embrionario, dispuestos de forma polar, y vuelven a sufrir otra división mitótica que da origen a cuatro núcleos, situados dos a dos en los polos del saco embrionario (Figura 4.6). Nuevamente, se produce un tercer y último evento mitótico, que origina cuatro núcleos en cada extremo del saco embrionario. De éstos, tres se mantienen allí en forma de células individuales, y uno (de cada extremo) migra hacia la gran vacuola central. Estos dos núcleos centrales, los llamados núcleos polares, y se sitúan cercanos uno a otro en la zona central del saco embrionario, desplazados levemente hacia la hipóstasis (Figura 4.7). Si bien se encuentran muy cercanos entre sí, momentáneamente no entran en contacto, y permanecen como núcleos separados por una pared hasta el momento previo a la antesis de la flor, cuando se disuelve la pared que los separa y se mantienen embebidos en una misma unidad citoplasmática (Figura 4.8). No fue posible verificar si en ellos se producía en realidad una fusión nuclear previa a la fertilización.

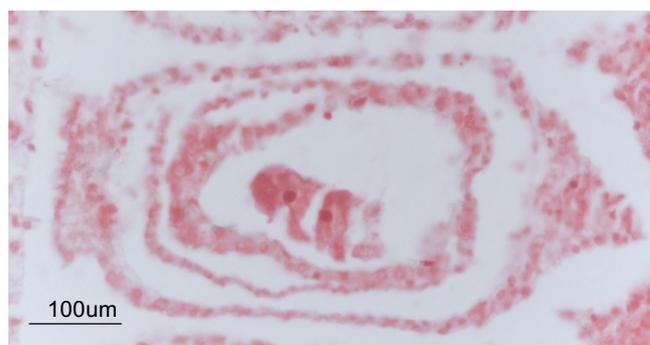


Figura 4.5: *H. tubispathus*. Saco embrionario binucleado producto de la primera división de la célula madre de las megasporas.

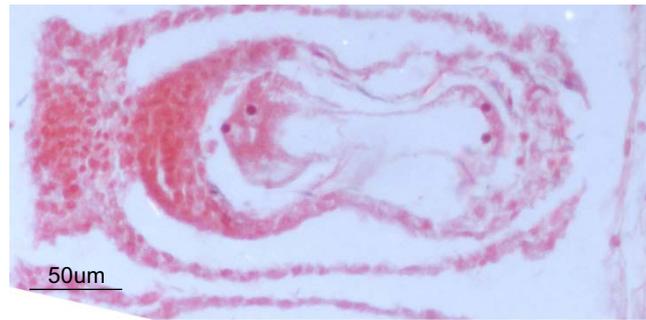


Figura 4.6: *H. tubispathus*. Núcleos situados de forma polar tras sufrir la segunda división mitótica.

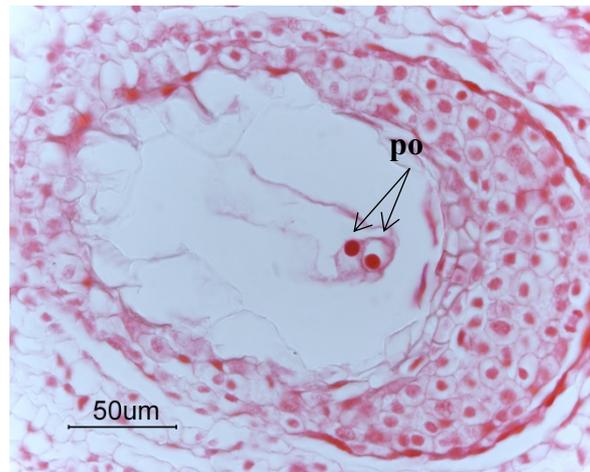


Figura 4.7: *H. tubispathus*. Saco embrionario con dos núcleos polares (po) cercanos a la hipóstasis.

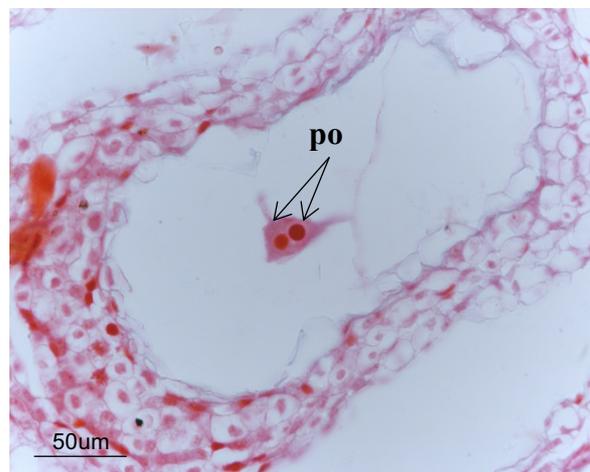


Figura 4.8: *H. tubispathus*. Núcleos polares (po) en una misma unidad de protoplasto, en un saco embrionario maduro en etapa prefertilización.

Por otra parte, en el polo chalazal se encuentran tres células que constituyen las antípodas. Las mismas tienen una forma semiesférica, un citoplasma denso y un núcleo

prominente, los cuales quedan evidenciados por la mayor tinción que se produjo en el preparado. Éstas se encuentran siempre situadas en el fondo del saco embrionario, alineadas con el extremo chalazal del óvulo (Figura 4.9). En las Amarilidáceas, las tres células antípodas a menudo persisten en la embriogénesis temprana (Davis, 1966), y esto puede deberse a su rol como haustorial (para transferir nutrientes del núcleo / perisperma) o para segregar sustancias de crecimiento que regulan el desarrollo del endospermo (Willemse y van Went, 1984). Si bien hasta el momento esta es una hipótesis, la posición chalazal de las células antípodas las coloca directamente entre el endospermo y el flujo de nutrientes del esporofito materno al embrión y, a menudo, muestran una morfología indicativa de la función nutritiva, secretora y/o de transferencia (Williams y Friedman, 2004).

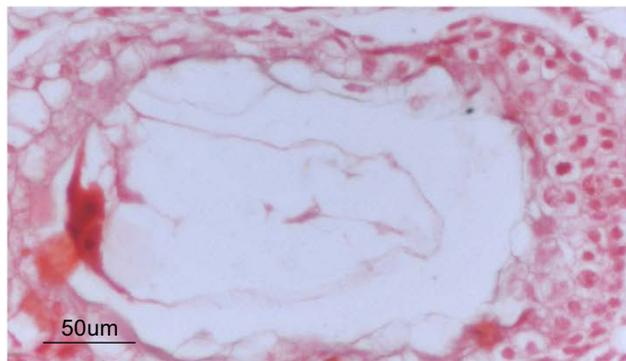


Figura 4.9: *H. tubispathus*. Antípodas (2 de 3) situadas hacia el polo chalazal en el fondo del saco embrionario maduro.

Por último, en el polo micropilar se encuentran los tres núcleos que completan el saco embrionario octonucleado. Los mismos se diferencian en dos sinérgidas y la ovocélula propiamente dicha, y constituyen el llamado aparato ovular. Las dos sinérgidas presentan una forma flabelada, y sus extremos más estrechos están insertos en el vértice del saco embrionario, donde comienza el canal micropilar formado por el tegumento interno (Figura 4.10b). Presentan además, un citoplasma denso y un núcleo central prominente (Figura 4.10a), y están situadas en posición central con respecto al micrópilo. Por otra parte, la ovocélula se encuentra situada cercana a las sinérgidas, y desplazada en forma distal respecto del micrópilo, orientada hacia el interior del saco embrionario. Presenta una forma que va desde semicircular a semielíptica, con un citoplasma de densidad intermedia y un núcleo prominente (Figura 4.10b).

Así como fue descripto para *Z. candida* (Amarilidácea), en *H. tubispathus* también se observaron ambas sinérgidas en el saco embrionario maduro, posiblemente debido al hecho de que ambas especies, además de estar emparentadas, poseen fecundación principalmente alógama. En contraste, las plantas autógamias donde la flor se poliniza poco después de la

apertura, una de las sinérgidas se degenera inmediatamente después de la apertura de la flor, por ejemplo, escasos momentos antes de que ocurra la polinización (Souza *et al.*, 2002).

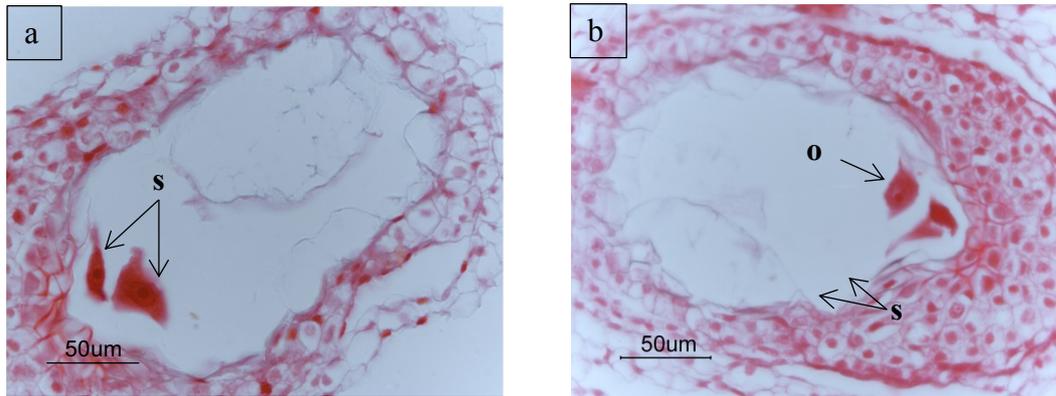


Figura 4.10: *H. tubispathus*. Aparato ovular en el extremo micropilar del saco embrionario. Sinérgidas (s) con protoplasto denso y ovocélula (o) vacuolada.

Para las especies que presentan apomixis del tipo diplospórica o bien diplosporía, como es el caso de *Z. texana* (Brown, 1951), hay una modificación o eliminación de la división meiótica de la célula madre de la megáspora, tal que se produce un gametofito no reducido. Ésta división meiótica es reemplazada por una división mitótica llamada apomeiosis (Gustafsson, 1947). En *Z. texana* la célula madre de las megasporas pasa directamente a ser una espora sin la formación de una pared celular, llamada tipo *Antennaria*. En ambas, *Antennaria* y *Z. texana* la meiosis fue reemplazada por una división puramente mitótica de la célula madre de las megasporas y el resultado de esta división es un saco embrionario binucleado (Figura 4.5). En cuanto a la clasificación del saco embrionario, fue evidenciado el desarrollo de un saco embrionario tipo *Adoxa* (Brown, 1951), con la única diferencia que la primera división del núcleo es meiótica en *Adoxa*, pero mitótica en *Z. texana*.

Según las observaciones realizadas en este estudio, y basándonos en la clasificación propuesta por Crane (2001), *H. tubispathus* presenta un desarrollo del saco embrionario apomítico diplospórico, ya que se forma un saco embrionario no reducido a partir de una célula madre de las megásporas. Éste corresponde con el tipo *Antennaria* octonucleado, dado que no existe meiosis, la célula madre de la megáspora se divide por mitosis en dos, luego en cuatro y posteriormente en ocho para formar el saco octonucleado.

4.3.2. Caracterización cariotípica

En principio se dividieron los individuos presentes en la población de estudio en dos grupos, mediante diferenciación de características morfológicas. Luego se realizó el recuento de cromosomas para cada planta individual, a fin de comprobar la presencia de una ploidía diferente en cada uno de estos dos grupos. Los resultados obtenidos para aquellos individuos

que presentaban hojas más angostas y flores más pequeñas, que además son los más abundantes en las poblaciones estudiadas, fue: $2n=4x=24$ cromosomas, representando al genotipo tetraploide. Por otra parte, en los individuos que presentaban hojas y flores de mayor tamaño se evidenció un número somático de cromosomas de $2n=2x=36$ (hexaploide), siendo el primer caso de hexaploidía registrado para esta especie en la región de estudio. En la Figura 4.11 se muestra una ilustración de las preparaciones de conteo de cromosomas, para ambos cariotipos estudiados. Únicamente fue posible identificar la presencia de un satélite en los cariotipos tetraploides analizados, sin lograr realizar una identificación precisa del par cromosómico al cual se encuentra asociado. Los parámetros analizados a partir de este estudio, se resumen en las Tabla 4.3 para el cariotipo tetraploide y Tabla 4.4 para el hexaploide. Las metafases mitóticas y los cariotipos de la especie se muestran en las Figuras 4.11 y 4.12, respectivamente.

Los ápices de raíces analizados para ambos tipos de ploidías, mostraron un cariotipo común constituido por doce pares de cromosomas para el tetraploide y dieciocho pares de cromosomas para el hexaploide, siendo en ambos el número básico de $x=6$, confirmando de esta forma el poseer el mismo número básico que el propuesto para este género (Daviña, 2001). Por el análisis del cariotipo, ambos citotipos serían alotetraploide y alohexaploide, respectivamente, pues no es posible formar grupos morfológicos de seis cromosomas en ningún caso (Tabla 4.2).

Por otra parte, se pudo observar que en ambos casos los cromosomas son de diferentes tamaños, y considerando la LC (longitud cromosómica) de cada par cromosómico, todos fueron diferentes para ambos citotipos (Tabla 4.3 y 4.4). Las fórmulas de los cariotipos hallados también fueron distintas (Tabla 4.2), siendo $4m + 20sm$ para el genotipo tetraploide, y $8m + 26sm + 2st$ para el hexaploide. Estos cariotipos pueden ser observados también en los ideogramas haploides construidos a partir de las mismas evaluaciones de ambos citotipos (Figura 4.13 y 4.14). Además de poseer distinta morfología y fórmula, el tamaño relativo de los cromosomas también es distinto entre ambos cariotipos, siendo los de mayor longitud, aquellos correspondientes a los individuos hexaploides. Coe (1954), propone que estas diferencias son más comunes en las especies apomícticas que en las que poseen reproducción sexual.

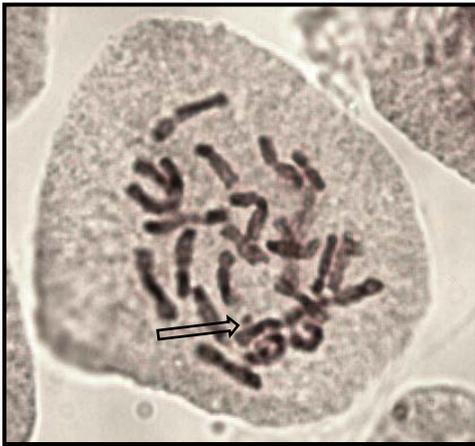
La relación existente entre la longitud de ambos brazos cromosómicos, representada en las Tablas 4.3 y 4.4 por medio del valor $r\text{-Val}$, evidencia para ambos citotipos valores mayores a 0,7 para aquellos cromosomas de morfología metacéntrica (m), entre 0,57 y 0,34 para los submetacéntricos (sm), y menores a 0,26 para los subtlocéntricos (st). Estos valores se condicen con aquellos correspondientes a los índice centroméricos (IC), siendo éstos mayores a 0,41 para los cromosomas m, entre 0,36 y 0,26 para sm, y menores a 0,21 para st. Por otra parte, el índice correspondiente a la relación del brazo corto (RB), posee un

comportamiento inverso a los dos índices descritos anteriormente, siendo éste menor para los cromosomas m (entre 1,08 y 1,46), intermedio en los sm (entre 1,76 y 2,90), y arrojando los mayores valores en los st (mayores a 3,88), dada la mayor asimetría que poseen este tipo de cromosomas.

Tabla 4.2: Clasificación cromosómica según el genotipo analizado para *H. tubispathus*, donde m: metacéntrico, sm: submetacéntrico y st: subtlocéntrico, según Levan *et al.* (1964).

Genotipo	N° cromosomas	m	sm	st
Tetraploide	24	4	20	0
Hexaploide	36	8	26	2

2n=24



2n=36

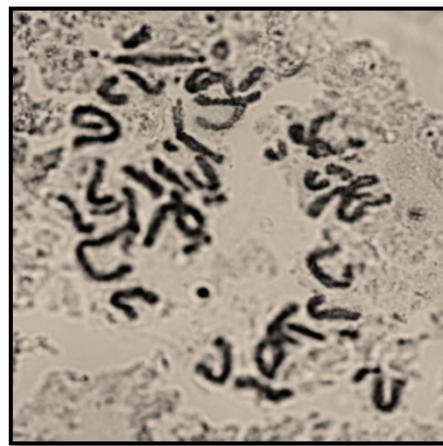
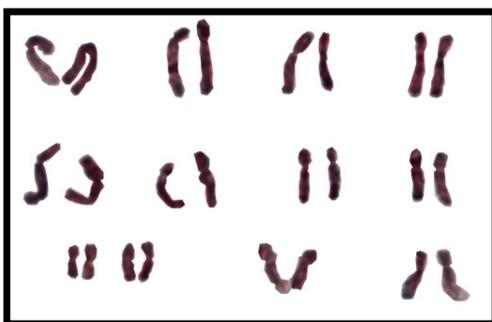


Figura 4.11: Metafases mitóticas para *H. tubispathus* en sus dos citotipos encontrados, la flecha señala el satélite encontrado para el tetraploide.

2n=24



2n=36

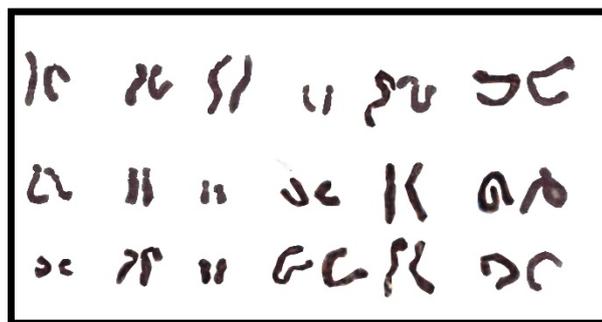


Figura 4.12: Cromosomas individualizados y agrupados de a pares para tetraploides y hexaploides de *H. tubispathus*.

Tabla 4.3: Datos morfométricos de los cromosomas de *H. tubispathus* para el genotipo tetraploide ($2n=24$). Donde L: brazo largo, C: brazo corto, LC: longitud total del cromosoma=L+C, r-Val: C/L, RB: relación brazo=L/C e IC: Índice centromérico=C/LC.

Par cromosómico	Tipo	L	C	LC	r-Val	RB	IC
1	m	4,98	3,75	8,72	0,75	1,33	0,43
2	m	3,60	2,51	6,12	0,70	1,46	0,41
3	sm	5,34	2,75	8,09	0,57	1,76	0,36
4	sm	5,55	1,94	7,49	0,35	2,90	0,26
5	sm	4,54	2,23	6,76	0,49	1,78	0,36
6	sm	4,31	1,86	6,18	0,43	2,81	0,27
7	sm	3,84	1,85	5,69	0,53	1,89	0,35
8	sm	3,41	1,90	5,31	0,56	1,80	0,36
9	sm	3,60	1,37	4,98	0,38	2,71	0,28
10	sm	3,41	1,52	4,93	0,44	2,25	0,31
11	sm	3,27	1,56	4,83	0,36	2,77	0,26
12	sm	2,89	1,33	4,22	0,47	2,14	0,31

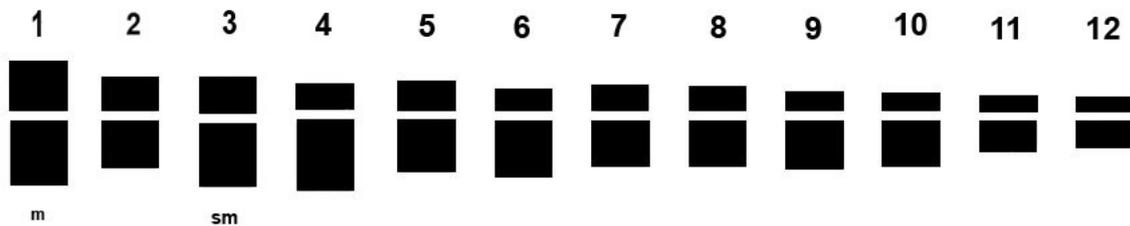


Figura 4.13: Ideograma haploide para *H. tubispathus* tetraploide, $4x=2n=24$.

El índice de asimetría intracromosomal A_1 , posee valores que van desde 0 a 1, obteniendo los menores valores aquellos cromosomas que tienden a ser metacéntricos. Por otro lado, el índice de asimetría intercromosomal A_2 , provee una forma sencilla de estimar la variación en la longitud de los cromosomas. Ambos índices son independientes del tamaño y del número cromosómico (Romero Zarco, 1986).

Por lo tanto, y a fin de ampliar la información cariotípica para esta especie, se determinaron ambos índices. Para el cariotipo tetraploide $A_1=0,44$, destacando un cariotipo levemente asimétrico, y $A_2=0,28$ evidenciando una cierta uniformidad con respecto al tamaño cromosómico. Además, la categoría de asimetría del cariotipo asignada según Stebbins (1971) es 3A. Para el citotipo hexaploide los índices intra e intercromosómicos fueron $A_1=0,39$ y $A_2=0,45$, respectivamente; destacando de esta forma la mayor simetría del citotipo que va acompañada de una mayor desuniformidad con respecto al tamaño cromosómico. Según la clasificación de Stebbins (1971), la categoría asignada es 2B. La información del citotipo tetraploide, si bien varía levemente en cuanto a la longitud de algunos cromosomas, coincide

en su totalidad con la publicada por Daviña (2001) para esta especie, respecto a los índices, los ideogramas haploides, fórmula cariotípica y clasificación según Stebbins. Para el cariotipo hexaploide el autor no evidencia la presencia de los dos pares de cromosomas subtlocéntricos, tal y como fueron reportados en este estudio, pero sí coincide en los índices de asimetría y en la clasificación según Stebbins. Por lo tanto, se debería estudiar con mayor profundidad a este tipo de ploidía para *H. tubispathus*, ampliando los estudios cariotípicos con individuos pertenecientes a distintas regiones, ya que esta puede ser la principal diferencia en las distintas fórmulas cariotípicas halladas.

En cuanto al origen de las especies tetraploides, Raina y Khoshoo (1972) sugieren que en los taxones de este nivel de ploidía la meiosis es a menudo regular con 12 bivalentes, como ha sido informado por Sharma y Ghosh (1954) en *Z. rosea* y Tandom y Mathur (1965) en *Z. tubispatha*. Estos datos, sumados a la gran diversidad morfológica encontrada en estas especies bajo este nivel de ploidía, hacen suponer que el origen de estos tetraploides sería alotetraploide, es decir a partir de la producción de híbridos (Greizerstein y Naranjo, 1987). De lo expuesto surge que el origen del segundo citotipo podría deberse también a la generación espontánea de un híbrido alohexaploide antes que un autohexaploide, ya que la fórmula cariotípica no representa una duplicación en el número cromosómico, y que además, las plantas hexaploides evidenciaron la presencia de dos pares de cromosomas subtlocéntricos, ausentes en la tetraploides. Es evidente que estamos ante la presencia de distintos citotipos exomorfológicamente afines, lo que sugiere la necesidad de una cuidadosa revisión morfológica y taxonómica de este complejo. Este número cromosómico se corresponde con un nivel hexaploide (6x) con un número básico de $x=6$. En las especies apomícticas es frecuente encontrar conviviendo individuos morfológicamente similares y con distintas ploidías. La combinación de la apomixis con una sexualidad residual (incluso de muy bajo porcentaje) puede generar aumento de ploidías (híbridos BIII fecundación de ovocélula no reducida).

Tabla 4.4: Datos morfométricos de los cromosomas de *H. tubispathus* para el genotipo hexaploide ($2n=36$). Donde L: brazo largo, C: brazo corto, LC: longitud total del cromosoma=L+C, r-Val=C/L, RB: relación brazo=L/C e IC: Índice centromérico=C/LC.

Par cromosómico	Tipo	L	C	LC	r-Val	RB	IC
1	m	7,55	6,98	14,53	0,77	1,29	0,44
2	m	7,58	6,53	14,10	0,86	1,16	0,46
3	m	6,54	6,07	12,61	0,93	1,08	0,48
4	m	4,72	4,11	8,83	0,87	1,15	0,47
5	m	3,63	3,39	7,02	0,93	1,07	0,48
6	m	2,11	1,94	4,05	0,93	1,08	0,48
7	m	1,90	1,67	3,57	0,87	1,15	0,47
8	m	1,75	1,30	3,05	0,75	1,34	0,43

9	sm	8,20	3,58	11,77	0,44	2,29	0,30
10	sm	6,26	2,85	9,11	0,46	2,19	0,31
11	sm	5,66	3,05	8,70	0,54	1,86	0,35
12	sm	5,18	2,77	7,95	0,53	1,87	0,35
13	sm	5,01	2,10	7,11	0,42	2,39	0,30
14	sm	5,01	1,96	6,97	0,39	2,58	0,28
15	sm	3,92	1,36	5,28	0,34	2,90	0,26
16	sm	2,87	1,29	4,16	0,45	2,24	0,31
17	st	8,06	2,09	10,15	0,26	3,88	0,21
18	st	5,36	1,25	6,61	0,23	4,32	0,19

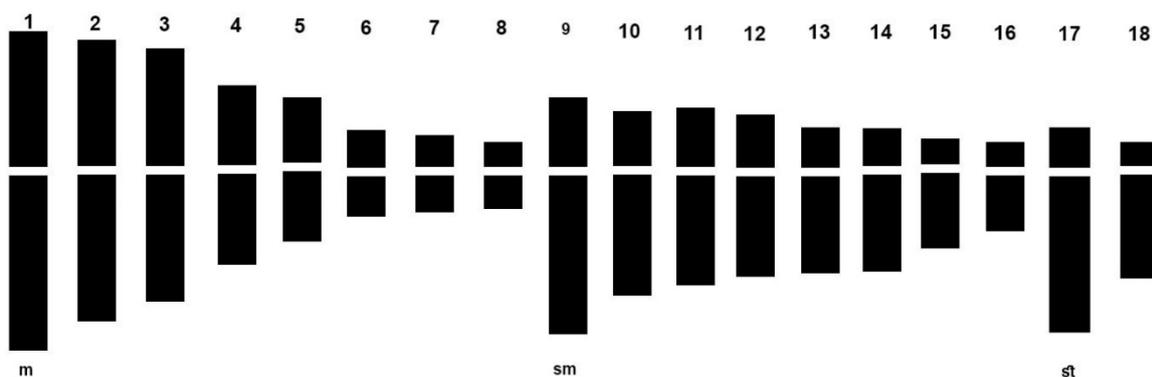


Figura 4.14: Ideograma haploide para *H. tubispathus* hexaploide, $6x=2n=36$.

Si bien no se ha reportado el genotipo hexaploide para *H. texanus* en las poblaciones presentes en Estados Unidos, dicha especie posee gran similitud con nuestra especie sudamericana en estudio; de hecho muchos autores las presentan como la misma especie, entre ellos Holmes y Wells (1980), quienes plantean en su estudio los posibles orígenes de esta especie en el país del norte. Por lo tanto sería importante ampliar el estudio citogenético de éstos géneros y de aquellas Amaryllidaceae presentes en nuestra región, con el fin de analizar sus cromosomas y entregar antecedentes que permitan esclarecer relaciones citogenéticas que faciliten el tratamiento taxonómico y el origen de los representantes de esta familia en Argentina. Éstos junto con estudios moleculares complementarios permitirían establecer relaciones filogenéticas y parámetros de variabilidad entre poblaciones.

4.3.3. Test de progeñie mediante Marcadores Moleculares

La selección de oligonucleótidos informativos se realizó en los dos individuos progenitores y en su descendencia para cada uno de los cruzamientos. Del total de 15 oligonucleótidos del tipo ISSR analizados, 10 generaron patrones de amplificación no ambiguos, tres no mostraron amplificación en absoluto y dos presentaron bandas débiles o difusas. El número total de bandas consideradas y el porcentaje de bandas polimórficas para

cada cebador dentro de cada población se indican en la Tabla 4.5. Los ejemplos de geles de agarosa que muestran los patrones de amplificación característicos obtenidos se muestran en la Figura 4.15.

Tabla 4.5: Resultados obtenidos de los marcadores ISSR analizados en las progenies de *Habranthus tubispathus* evaluadas. TB, BP y %BP indican el número de bandas consideradas, el número de bandas polimórficas y el porcentaje de bandas polimórficas, respectivamente.

Primer	Gel	TB	BP	% BP
Pr 4	Ag.	15	12	80
Pr 7	Ag.	18	16	89
Pr 9	Ag.	4	2	50
Pr10	Ag.	7	1	14
Pr16	Ag.	2	0	0
Pr19	Ag.	7	1	14
Pr20	Ag.	12	4	33
IS-61	Ag.	7	5	71
IS-62	Ag.	1	0	0
IS-63	Ag.	10	1	10
Total		83	42	51

Utilizando estos 10 cebadores ISSR se pudo estimar la variabilidad genética en ocho progenitores y 97 progenies resultantes de sus cruzamientos. En principio se buscó que el cebador utilizado proporcionara diferencias entre progenitores, es decir variabilidad genética que evidenciara plantas con un patrón de bandas diferencial (distinto genotipo). La mayor cantidad de bandas polimórficas fue observada en los cebadores Pr 4, Pr 7, Pr 20 e IS-63, los cuales fueron utilizados para analizar a los progenitores junto con su descendencia, y de esta forma realizar el test de progenie.

El número total de bandas generadas fue de 83, de las cuales 35 resultaron ser polimórficas para los genotipos analizados. Fueron seleccionados los cuatro cebadores que mayor polimorfismo presentaron, y los mismos generaron 18 bandas específicas para el progenitor femenino, 10 para el masculino y 7 para ambos. También se consideraron bandas no polimórficas adicionales presentes en ambos genotipos parentales, ya que la falta de tales bandas en la progenie también puede indicar la ocurrencia de recombinación.

Como se observa en la Figura 4.15, todos los individuos en las tres progenies evaluadas presentaron un patrón genético idéntico al de la planta madre, que confirmó que se habían generado a partir de eventos apomícticos. Estos mismos resultados fueron observados para las 35 bandas polimórficas evaluadas, en las cuales en todos los casos y sin excepción la progenie presentó el mismo patrón de bandas que el progenitor femenino, difiriendo del masculino. Con base en estos resultados, la tasa de sexualidad residual podría considerarse insignificante en estos genotipos representativos de la población presente en

CERZOS. Sin embargo, la diferencia encontrada entre los progenitores, evidencia la existencia de una sexualidad residual, pudiendo considerar a esta especie como apomítica facultativa. Para poder avanzar con un proceso de mejoramiento, una alternativa sería lograr incrementar la frecuencia de sexualidad. En éste sentido, fue evidenciado para *Eragrostis curvula* que diferentes situaciones de estrés, tanto exógenas como endógenas, incluida la sequía, el cultivo de tejidos y la hibridación, aumentaron la proporción de individuos sexuales (Rodrigo *et al.*, 2017).

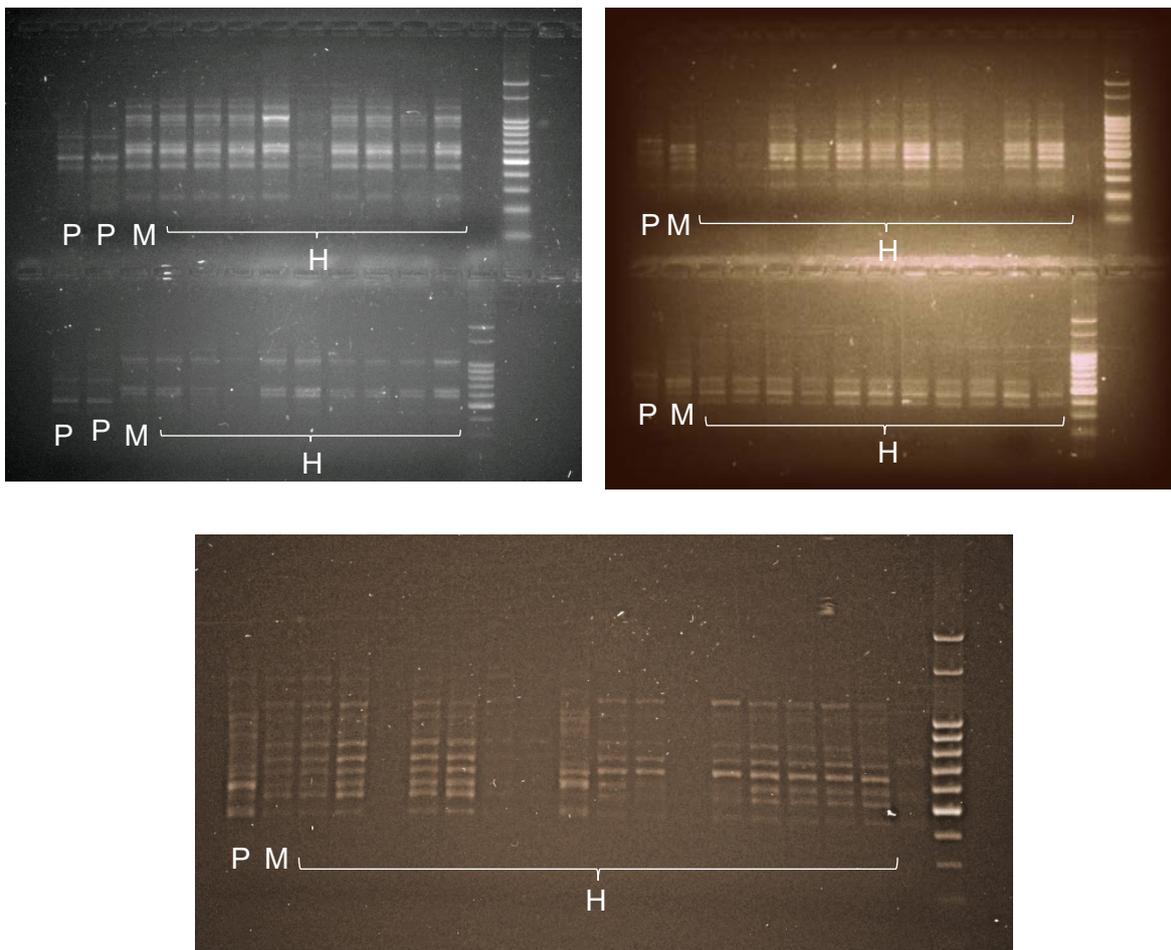


Figura 4.15: Patrones de bandas obtenidos para el cebador Pr7 en los parentales y descendencia de los cruzamientos 1, 4 y 5, donde P, M e H hacen referencia a los individuos progenitores masculinos, femeninos y descendencia, respectivamente.

La evaluación por medio de marcadores ISSR es una herramienta de detección eficiente para la identificación de progenies fuera de tipo y la evaluación del modo de reproducción en especies apomíticas, principalmente debido a su capacidad discriminadora confiable entre plantas maternas y no maternas en las pruebas de progenie. Además, el uso de marcadores moleculares permite evaluar la proporción real de la sexualidad en una

población determinada (Sarwat, 2012). Este es el primer estudio realizado para *H. tubispathus* con marcadores moleculares, y brinda información que confirma el modo reproductivo sin meiosis ni combinación de gametos.

4.3.4. Mediciones y análisis del contenido de ADN nuclear

Los eventos reproductivos, es decir los sucesos que ocurren durante la reproducción, se pueden reconstruir a partir de la interrelación entre los contenidos de ADN de los núcleos de las células embrionarias y endospermáticas. Las plantas sexuales diploides forman un embrión diploide y un endospermo triploide. Los embriones triploides son el resultado de la unión de gametos reducidos y no reducidos (masculinos o femeninos) junto con endosperma tetraploides o pentaploides, respectivamente (Matzk *et. al.*, 2000). Por lo tanto, basándonos en los resultados obtenidos mediante las mediciones del contenido de ADN en las células del embrión y del endosperma, se pudo observar que para *H. tubispathus* existe una relación 2:5. Ya sea en los individuos tetraploides (4x), los cuales poseen una ploidía del embrión de 4x, y del endosperma de 10x; como así también en aquellos individuos que resultaron ser hexaploides (6x), en los que la ploidía del embrión es de 6x y la del endosperma de 15x.

Esta diferenciación evidenciada en la Figura 4.16, es posible de realizar debido a que la cantidad de núcleos es mucho menor en el endospermo que en el embrión. Por lo tanto, es posible diferenciar entre picos de ADN de embrión y endospermo por su altura y posición dentro de los histogramas.

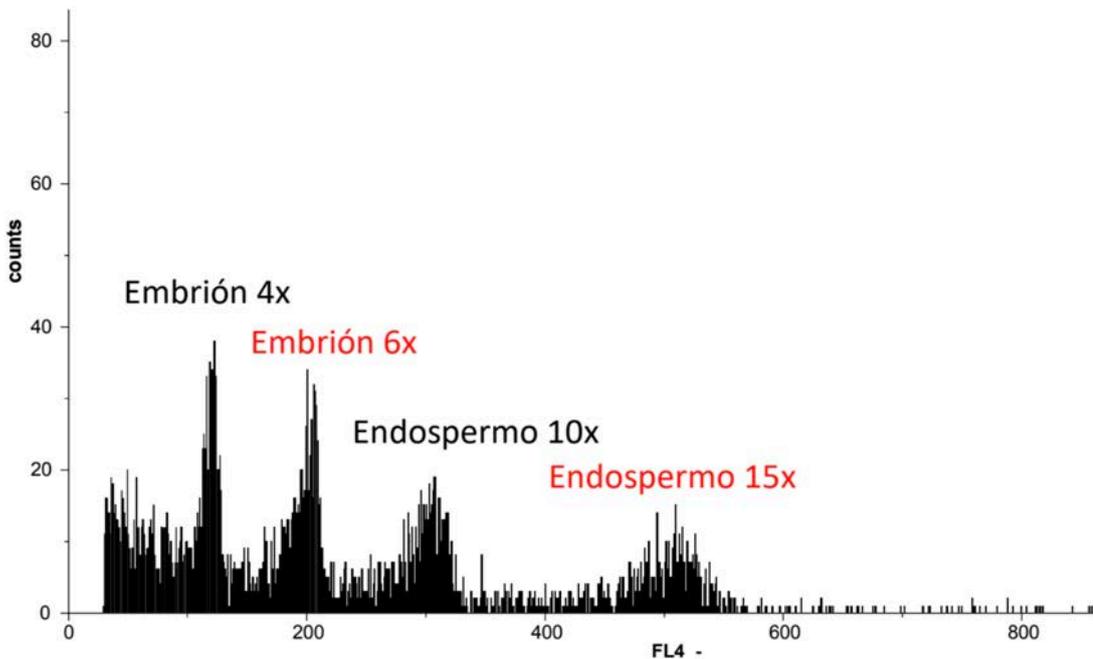


Figura 4.16: Histograma de citometría de flujo que muestra la fluorescencia relativa de núcleos teñidos con DAPI aislados de semillas de *Habranthus tubispathus*.

La cantidad de ADN, medida mediante citometría de flujo, se correlaciona con parámetros morfológicos, como son ancho de la hoja y el tamaño de la corola (Tabla 4.6). Las plantas con hojas más estrechas (0,4 - 0,6 cm) y escapos florales más pequeños (2,5 cm altura – 1,3 cm diámetro) tuvieron valores de 2C de 36-39 pg, y aquellas plantas con hoja ancha (0,8 – 1 cm) y escapos más grandes (3 cm de altura – 2.3 cm diámetro) valores más altos de 2C que varían entre 56-58 pg. Este mismo patrón fue observado para *Nerine*, otra especie perteneciente a la familia de las Amarilidáceas (Zonneveld y Duncan, 2006). Este fenómeno puede ser explicado mediante la teoría propuesta por Kalender *et al.* (2000), quienes sugirieron que en situaciones de sequía, en las que el crecimiento es limitado, las especies se adaptan durante el tiempo evolutivo con un aumento en el contenido de ADN, y se produce una disminución en aquellas situaciones permanentemente húmedas.

Tabla 4.6: Evaluación de corolas para *H. tubispathus*, donde AC se refiere a altura de corola (cm), DC a diámetro de corola (cm) y AO altura del ovario (cm).

Genotipo	AC	DC	AO
Tetraploide	2,5	1,3	1,0
Hexaploide	3,0	2,3	1,1

En ambos casos, el endospermo 5C surge luego de que se produzca una fusión de los dos núcleos polares del saco embrionario no reducidos, combinados con un gameto masculino reducido (pseudogamia). El pico bajo de 5C es evidencia de sacos de embriones no reducidos. Si se combina con un pico alto 2C, este último resulta del desarrollo autónomo de la célula de huevo no reducida (formación de semillas apomícticas). Indicando de esta forma que fue necesaria una fecundación de las células del endospermo, tal y cómo fue observado morfológicamente, para que se produzca la formación de las semillas, y que el gameto femenino no se obtuvo de una reducción, es decir mediante una división meiótica, sino que fue resultado de una mitosis. Estos resultados indican que el modo reproductivo para *H. tubispathus* solo pudo seguir una vía apomíctica.

Entre las principales ventajas que ofrece la apomixis podemos mencionar la estabilización de genotipos superiores, fijación de combinaciones híbridas, clonación de genotipos superiores híbridos y reducción del aislamiento físico requerido para preservar líneas genéticas homocigotas. La principal dificultad del mejoramiento genético de plantas apomícticas es la heredabilidad del carácter, debido a que su control genético aún no ha sido completamente esclarecido. Los estudios de herencia sólo son posibles si pueden cruzarse progenitores completamente sexuales y apomícticos, y la progenie F1 segregante puede ser examinada por métodos citoembriológicos o marcadores moleculares (Marmolejo Cortes, 2010). Por lo tanto realizar un pre-mejoramiento en *H. tubispathus* resultó ser una tarea mucho más compleja que lo que se había planteado en un primer momento, y en

consecuencia va a ser necesario realizar estudios complementarios o bien utilizar el polen para hibridar otras especies.

4.4. CONCLUSIONES

Como primer evidencia en el estudio del modo reproductivo de *Habranthus tubispathus*, todos los individuos resultantes de las autofecundaciones y de los cruzamientos de progenitores con diferentes colores de escapos florales, fueron iguales morfológicamente a la planta materna que les dio origen.

En el estudio del tipo y desarrollo del saco embrionario para la especie, se concluye que la misma presenta un desarrollo del saco embrionario apomítico diplospórico, ya que se forma un saco embrionario no reducido a partir de la célula madre de las megasporas. Éste corresponde con el tipo *Antennaria* octonucleado, dado que no existe meiosis, la célula madre de la megáspora se divide por mitosis en dos, luego en cuatro y posteriormente en ocho para formar el saco octonucleado, compuesto de dos sinérgidas, una ovocélula, tres antípodas y una célula central con dos núcleos polares.

Por otra parte, se han encontrado dos tipos de ploidía dentro de la población presente en el SO de la Provincia de Buenos Aires, pudiendo diferenciar ambos citotipos (tetra y hexaploides) no solo de manera morfológica, sino también citológicamente. Además se logró realizar la caracterización citológica de ambos tipos de ploidía, hallando por primera vez dos pares de cromosomas del tipo subtelocéntricos para esta especie.

La uniformidad genética de los individuos maternos y toda su progenie, detectada mediante microsatélites (ISSR), mostró la naturaleza apomítica de la planta materna. Es decir que los marcadores moleculares mostraron ser una importante herramienta para distinguir el modo reproductivo de la especie.

La citometría de flujo utilizada en semillas de *H. tubispathus*, junto con la evaluación de la progenie mediante marcadores moleculares, fueron las herramientas más útiles y fiables para asegurar que esta especie posee una reproducción apomítica.

Dado que en este estudio se da una base detallada del modo reproductivos de *Habranthus tubispathus*, esto permitiría desarrollar un programa de mejoramiento de la misma. Una propuesta para estudios futuros sería evaluar la posibilidad de romper la barrera de la apomixis, y realizar cruzamientos utilizando el polen de esta especie.

4.5 BIBLIOGRAFIA

- Adams, K.L. y Wendel, J.F. 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8:135–141
- Asker, S.E. y Jerling L. 1992. *Apomixis in plants*. CRC, Boca Raton. Florida, USA.

- Baubec, T., Dinh, H.Q., Pecinka, A., Rakic, B., Rozhon, W., Wohlrab, B. y Scheid, O.M. 2010. Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22(1): 34-47.
- Brown, W.V. 1951. Apomixis in *Zephyranthes texana* Herb. *American Journal of Botany*, 38(9): 697-702.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61(1), 51-94.
- Chen, Z.J. y Ni, Z. 2006. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays*, 28(3): 240-252.
- Chong, S y Ozias-Akins, P. 1992. Rapid estimation of ploidy levels in vitro regenerated interespecific *Arachis* hybrids and fertile triploids. *Euphytica* 64: 183-188.
- Coe, G.E. 1954. Chromosome Numbers and Morphology in *Habranthus* and *Zephyranthes*. *Bull. Torrey Bot. Club* 81 (2): 141-148.
- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6:836-46.
- Crane, C. F. 2001. Classification of apomictic mechanisms.
- Dall'agnol, M. y Schifino-Wittmann, M. 2005. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. *Current Agricultural Science and Technology*, 11(2): 127-133.
- Daviña, J.R. 2001. Estudios Citogenéticos en algunos géneros Argentinos de Amaryllidaceae. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Daviña, J.R. y Honfi, A.I. 2011. La citogenética vegetal en Misiones. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 22(1): 1-5.
- Davis, G.L. 1966. *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley, New York, USA.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M.A., Nardi, L. y Obermayer, R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann. Bot.*, 82 (Suppl A):17-26
- Fernández, A. 1973. El ácido láctico como fijador cromosómico. *Bol. Soc. Arg. de Bot.* 15(2-3): 287-290.
- Flory, W.S. 1938. Cytotaxonomic notes on the genus *Habranthus*. *Herbertia* 5: 151-153.
- Flory, W.S. 1977. Overview of chromosome evolution in the Amaryllidaceae. *Nucleus* 20: 70-88.
- Gonzalez, A. y Aguirre X. 2007. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). *Ecología molecular*. Capítulo 19. Instituto Nacional de Ecología.
- Greizerstein, E.J. y Naranjo, C.A. 1987. Estudios cromosómicos en especies de *Zephyranthes* (Amaryllidaceae). *Darwiniana*, 169-186.
- Gustafsson, A. 1947. Apomixis in higher plants. Parts II, III, and I. *Lunds Universitets Arsk.* N.F. 42, 43.
- Hagemann, R. 2000. Erwin Baur or Carl Correns: Who really created the theory of plastid inheritance? (Erwin Baur o Carl Correns, ¿realmente quién creó la herencia plastidial?). *The Journal of Heredity*, 91(6), 435-440.
- Hita, O., Lafarga, C. y Guerra, H., 1996. Estudio histológico del desarrollo embrionario de *Cicerarietinum* L. (Leguminosae). *Lazaroa*, 17, pp.85-95.
- Holmes, W.C. y Wells, C. J. 1980. The distribution of *Habranthus tubispathus* (L'Her.) Traub in South America and North America—Texas and Louisiana. *SIDA, Contributions to Botany*, 328-333.
- Hörandl, E. 2010. The evolution of self-fertility in apomictic plants. *Sexual plant reproduction*, 23(1), 73-86.
- Johansen, D. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Co. Inc. New York.
- Kalender, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo E. y Schulman A.H. 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by Bare-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc. Natl. Acad. USA* 97: 6603-6607.
- Karp A, Kresovich S, Bhat KV, Ayad WG and Hodgkin T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Levan, A., Fredga, K.L. y Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Marmolejo Cortés, D.F. 2010. Evaluación de apomixis en germoplasma seleccionado de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira).
- Marshall, D.R. y Brown, A.H.D. 1974. Estimation of the level of apomixis in plant populations. *Heredity* 32:321-333.

- Masterson, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264:421–424
- Mather, K. 1951. The measurement of linkage in heredity, 2° Ed. Methuen and Co., London.
- Matzk, F., Meister, A. y Schubert, I. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant J* 21: 97–108.
- Meerow, A.W., Guy, C.L., Li, Q.B. y Yang, S.L. 2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Syst. Bot.* 25 (4): 708-726.
- Mogje, M. 1992. The evolution of asexual reproduction in plants.
- Muñoz, M., Riegel, R. y Seemann, P., 2006. Use of image cytometry for the early screening of induced autopolyploids. *Plant breeding*, 125(4): 414-416.
- Naranjo, C.A. 1969. Cariotipo de nueve especies argentinas de *Rhodophiala*, *Hippeastrum*, *Zephyranthes* y *Habranthus* (Amaryllidaceae). *Kurtziana* 5: 67-87.
- Naranjo, C.A. y Andrada, A.B. 1975. El cariotipo fundamental del género *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae). *Darwiniana* 19: 556-582.
- Naranjo, C.A. y Poggio, L. 2000. Karyotypes of five *Rhodophiala* species (Amaryllidaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 35(3-4), pp.335-343.
- Ortiz, J., Pessino, S.C. y Quarín, C. 2004. Manipulación de la Apomixis y su Aplicación en la Agricultura. En: *Biología y Mejoramiento Vegetal*, Cap. 3, pag. 141–147. Ediciones INTA.
- Pace, L. 1913. Apogamy in *Atamosco*. *Botanical Gazette*. 56(5): 376-394.
- Pagano, E.M., Rosso, B., Rimieri, P. y Ríos, R.D. 2007. Aplicación de marcadores moleculares al estudio de la variabilidad genética en el género *Bromus*. *Avances de investigación en recursos genético en el Cono Sur II, PROCISUR, IICA*, pag. 61-67.
- Pavone, P., Salmeri, C. y Scammacca, B. 1995. "Karyo 95" nuovo programa di gestione dei dati cariologici. *G Bot Ital* 129: 2
- Quarín, C.L. 1999. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 11:331–33.5
- Raina, N.S. y Khoshoo, T.N. 1972. Cytogenetics of tropical bulbous ornamentals. IX. Breeding systems in *Zephyranthes*. *Euphytica*, 21(2), pp.317-323.
- Raymúndez, M.B. 1997. Estudios citogenéticos, embriológicos y morfoanatómicos en especies venezolanas del género *Hymenocallis Salisb.* (Amaryllidaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Raymúndez, M.B., Escala, J. y Xena de Enrech, N. 2008. Microsporogénesis en *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb. (Amaryllidaceae). *Acta Bot. Venez.* 31(2): 409-424.
- Rodrigo, J.M., Zappacosta, D.C., Selva, J.P., Garbus, I., Albertini, E. y Echenique, V. 2017. Apomixis frequency under stress conditions in weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *PLoS One*, 12(4), e0175852.
- Romero Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 3: 531-536.
- Sarwat, M. 2012. ISSR: a reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. In *Plant DNA fingerprinting and barcoding* (pp. 103-121). Humana Press.
- Savidan, Y. 2000. Apomixis: genetics and breeding. In: Janick J (ed) *Plant breeding reviews*, 18: 13–86.
- Sharbel, T.F., Voigt, M.L., Corral, J.M., Thiel, T., Varshney, A., Kumlehn, J. y Rotter, B. 2009. Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *The Plant Journal*, 58(5), 870-882.
- Sharma, A.K. y Ghosh, C. 1954. Further investigation on the cytology of the family Amaryllidaceae and its bearing on the interpretation of its phylogeny. *Genet. Iber.* 6: 71-100.
- Siena, L.A., Sartor, M.E., Espinoza, F., Quarín, C.L. y Ortiz, J.P.A., 2008. Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent autopolyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction*, 21(3): 205-215.
- Souza, M.M., Pereira, T.N.S., Hoffmann, M., Melo, E. y Louro, R.P. 2002. Embryo sac development in yellow passion fruit *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Passifloraceae). *Genetics and molecular Biology* 25: 471–475.
- Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. New York: Addison-Wesley Co.
- Takhtajan, A. 1991. *Evolutionary Trends in Flowering Plants*. Columbia University Press.
- Tandon, S.L. y Mathur, M. 1965. Cytotaxonomic studies on some *Zephyranthes* species. *Indian J. Hort.* 22: 190-200.
- Thoibi Devi, T. y Borua, P.K. 1996. Karyotype analysis of three species of *Zephyranthes* (Amaryllidaceae). *J. Cytol. Genet.* 31: 15-22.
- Thoibi Devi, T. y Borua, P.K. 1997. Meiotic Behavior and Pollen Fertility in Three Species of *Zephyranthes* (Amaryllidaceae). *Biol. Pl.* 30: 355-360.

- Tilton, V.R., 1980. Hypostase development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and notes on other types of modifications in the chalaza of angiosperm ovules. *Canadian Journal of Botany*, 58(19), pp.2059-2066.
- Udall, J.A., Swanson, J.M., Nettleton, D., Percifield, R.J. y Wendel, J.F. 2006. A novel approach for characterizing expression levels of genes duplicated by polyploidy. *Genetics*, 173, 1823–1827.
- Willemse, M.T.M. y van Went, J.L. 1984. The female gametophyte. In Johri B. M. (ed.), *Embryology of angiosperms*, pag. 159-196. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J., y Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, 169(1), 169-182.
- Williams J.H. y Friedman W.E. 2004. The four-celled female gametophyte of *Illicium* (Illiciaceae; Austrobaileyales): Implications for understanding the origin and early evolution of monocots, eumagnoliids, and eudicots. *American Journal of Botany* 91: 332–351.
- Zappacosta, D., Meier, M., Carrera, A., Pacheco, G., Cardone, S., Selva, J.P. y Echenique, V. 2011. Molecular markers to study the variability within the *Eragrostis curvula* complex. *Phyton* 80:211-220.
- Zonneveld, B.J.M. y Duncan, G.D., 2006. Genome size for the species of *Nerine* Herb. (Amaryllidaceae) and its evident correlation with growth cycle, leaf width and other morphological characters. *Plant Systematics and Evolution*, 257(3-4), pp.251-260.

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El aprovechamiento económico con fines ornamentales de muchas especies nativas ha sido limitado, entre otros factores, por la falta de información sobre los requerimientos y la adaptación al cultivo de las mismas. En Argentina, la información sobre el cultivo de *Habranthus tubispathus* previa a este trabajo, se limitaba al conocimiento informal de los floricultores aficionados regionales. En este sentido, los resultados que se obtienen en el presente trabajo son relevantes más allá de proporcionar soporte científico al conocimiento informal existente. En efecto, los hallazgos abren nuevas perspectivas en la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación de la especie, brindan información respecto al cultivo *in situ* y bajo condiciones controladas de invernáculo, y aporta herramientas útiles para el fitomejoramiento como la determinación de la viabilidad y conservación del polen, e información detallada acerca del modo reproductivo de la especie. Todos estos datos aportados permitirán gestionar un programa de mejoramiento para *Habranthus tubispathus* a futuro, ya sea mediante cruzamientos con otras especies o intentando romper la barrera de la apomixis. En este sentido, las alternativas que se proponen son: a) búsqueda de individuos sexuales en las poblaciones naturales, b) hibridación utilizando el polen de *H. tubispathus* en especies emparentadas, c) obtención de variantes somaclonales a partir del cultivo *in vitro* de tejidos, que luego permitan seleccionar individuos con características destacables, y d) obtención de individuos diploides mediante el rescate de embriones en laboratorio, ésta técnica permitiría realizar la producción de individuos sexuales para luego poliploidizarlos mediante un agente inhibidor de la formación del uso acromático en la mitosis.

Dada la gran variabilidad de colores de flor que encontramos en las poblaciones naturales de *Habranthus tubispathus*, es altamente probable que algún mecanismo sea el propulsor de la reproducción sexual, generando la variabilidad observada. Por lo tanto sería importante evaluar a futuro diversos métodos, a fin de generar las condiciones adecuadas para que este tipo de reproducción se desencadene y se aproveche.

Por otro lado, la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* para la micropropagación de la especie, fue eficiente al aumentar el número de propágulos por individuo, superando ampliamente los valores obtenidos con la multiplicación vegetativa natural. Esto permitiría obtener un elevado número de propágulos luego de lograr un mejoramiento, y brinda la posibilidad de multiplicación masiva de los genotipos selectos para su producción a gran escala.

En el presente trabajo también fue identificada la forma reproductiva de esta especie. El adecuado conocimiento de la biología floral, citogenética y modo de reproducción de los materiales disponibles es un requisito fundamental para cualquier estrategia de mejoramiento. La información generada, junto con los marcadores moleculares validados y

con la caracterización citológica, podrían extenderse a otras especies regionales de interés ornamental, como son *Rodophiala bífida*, *Habranthus gracilifolius* y *Zephyranthes filifolia*.