



CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES AISLADOS A PARTIR DE SEMILLAS DE FRUTOS INMADUROS DE IRUPÉ (*VICTORIA CRUZIANA*, NYMPHAEACEAE)

In vitro culture of embryos isolated from seeds of immature fruits of irupé (*Victoria cruziana*, Nymphaeaceae)

Graciela Terada¹, Eduardo A. Flachsland¹, Ricardo D. Medina^{1,2}, Francesco Mignolli^{1,2} & María L. Vidoz^{1,2}

Resumen: El irupé o maíz de agua (*Victoria cruziana* A. D. Orb.) pertenece a la familia Nymphaeaceae y despierta interés, principalmente, por la belleza de sus hojas y flores. La obtención de semillas de esta especie acuática es dificultosa en su ambiente natural y además es considerada recalcitrante para el cultivo *in vitro*. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue el establecimiento de una metodología para la conversión a plantas de embriones de irupé extraídos de semillas de frutos inmaduros y la obtención de material para ser empleado en la micropropagación o en programas de restauración ambiental. Se realizó el cultivo de embriones de frutos con seis estadios de crecimiento, hasta un máximo de cuatro semanas. Empleando el medio basal de Murashige & Skoog, se probaron doce medios de cultivo con y sin el agregado de reguladores de crecimiento (ácido giberélico, AG₃ y thidiazuron, TDZ). Los embriones se convirtieron en plantas en todos los medios diluidos al 50% (½ MS), manteniendo el 3% de sacarosa, mientras que en el medio adicionado con 10 mg/L de AG₃ se obtuvieron plantas con raíces desarrolladas. Si bien el cultivo de embriones derivados de las semillas en los estadios tempranos del fruto no permitió la regeneración de plantas, esta fue posible cuando los explantes derivaron de frutos en estadios tardíos.

Palabras clave: Nymphaeaceae, plantas acuáticas, recalcitrantes, regeneración de plantas, reguladores de crecimiento.

Summary: The irupé or water corn (*Victoria cruziana* A. D. Orb.) belongs to the Nymphaeaceae family and arouses interest mainly due to the beauty of its leaves and flowers. Obtaining seeds of this aquatic species in its natural environment is challenging, and it is also considered a recalcitrant species for *in vitro* culture. For this reason, the aim of this work was to establish a methodology for the conversion into plants of irupé embryos extracted from seeds of immature fruits and to obtain material to be used in micropropagation or in environmental restoration programs. Embryo culture of fruits in six growth stages was carried out up to a maximum of four weeks. Using Murashige & Skoog's basal medium, twelve culture media with and without the addition of growth regulators (gibberellic acid, AG₃ and thidiazuron, TDZ) were tested. Embryos converted into plants in all media diluted to 50% (½ MS) with 3% sucrose, while plants with developed roots were obtained in the medium with the addition of 10 mg/L of GA₃. Although the culture of embryos derived from seeds in early fruit stages did not allow plant regeneration, this was possible when explants derived from fruits in late developmental stages.

Key words: Aquatic plants, growth regulators, Nymphaeaceae, plant regeneration, recalcitrant.

¹ Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Nordeste).

² Instituto de Botánica del Nordeste (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad Nacional del Nordeste), Sargento Cabral 2131, CC. 209 (3400), Corrientes, Argentina. *E-mail: gratear@yahoo.com.ar

Introducción

En los años recientes, se ha incrementado la demanda por plantas acuáticas con flores (Jenks, 2000) como las pertenecientes a la familia Nymphaeaceae (Kane, 1992). Dentro de esta familia se incluye al género *Victoria*, cuyas especies son conocidas como platos gigantes de agua. Estas han despertado interés por cultivarlas no sólo por su aspecto decorativo y exótico (Valla & Martín, 1976), sino también por su valor científico y filogenético (Smith *et al.*, 2022). Esto último se debe a que, junto a otras especies de ninfeáceas, se las reconoce como probables descendientes de un tronco común con las angiospermas más primitivas (Arber, 1920; Takhtajan, 1958; Cronquist, 1968; Wheeler Haines & Lye, 1975; Khanna, 1967; Orban & Bouharmont, 1998; Les *et al.*, 1991; Friedman, 2001; Baskin *et al.*, 2007; Kubo *et al.*, 2009). Además, se debe destacar la importancia para el ecosistema que tienen las plantas acuáticas por su capacidad para adaptarse a condiciones particulares de recepción y captación de luz, escasa disponibilidad de dióxido de carbono, oxígeno y nutrientes (Arbo *et al.*, 2002).

En Corrientes, Argentina, crece la especie *Victoria cruziana* A. D. Orb. (D'Orbigny, 1840), conocida con el nombre de irupé o maíz de agua por sus semillas comestibles. Es nativa de zonas cálidas de Sudamérica y pertenece a la cuenca del río Paraguay desde los 15° a los 32° de latitud Sur y 55° a 64° de longitud oeste.

Cabrera (1964) la llamó la “reina de las plantas acuáticas”, destacándose por sus hojas redondas, muy grandes y flotantes (platos), plagadas de grandes espinas en sus partes sumergidas. Sus flores también son grandes y llamativas (Arbo *et al.*, 2002).

El ciclo de esta especie depende de las fluctuaciones del nivel del agua (Nohara & Tsuchiya, 1990; Murphy *et al.*, 2003; Nagasaki, 2007; Shibayama & Kadono, 2007), que afecta su aparición después del invierno, período en que desaparece (Neiff, 1978). Incluso en la Laguna del Iberá, reserva natural de agua dulce de la provincia de Corrientes, es una de las plantas hidrófilas que no tiene una distribución homogénea y solo fue hallada en el extremo sudoeste del sistema, casi en las nacientes del río Corriente (Arbo *et al.*, 2002).

La obtención de los frutos en su ambiente natural es complicada dado que, al tercer día de producida la fecundación, el pedicelo se incurva sumergiendo los frutos que continúan su desarrollo bajo el agua, dificultando su ubicación (Valla & Cirino, 1972). Además, debido a que la época de maduración de los frutos coincide con la bajante del río, muchos lugares donde crece el irupé se vuelven inaccesibles para las canoas (Valla & Martín, 1976). Tampoco la recolección de los frutos es sencilla, porque se necesita protección para las manos a causa de las espinas filosas que cubren el receptáculo y el pedúnculo (Arbo *et al.*, 2002).

Victoria cruziana, por ser más tolerante al frío que *V. amazonica* (Poepp.) J. C. Sowerby, rápidamente reemplazó su cultivo en regiones templadas. Es de destacar que uno de los híbridos más famosos, *Victoria* “Longwood Hybrid”, se obtuvo por cruzamiento entre *V. cruziana* como madre y *V. amazonica* como padre (Mazzini, 2003).

La familia Nymphaeaceae, presenta embriones subdesarrollados (Baskin & Baskin, 2007) mientras que la familia Nelumbonaceae, se caracteriza por tener la dormancia física debido a la presencia de una capa impermeable en las semillas o frutos (Baskin *et al.*, 2000). Diversos autores señalan que la germinación de semillas de plantas acuáticas es lenta y desuniforme a bajas tensiones de oxígeno (Arber, 1920; Carr, 1961; Forsberg, 1966; Sculthorpe, 1967; Shipley & Parent, 1991; Baskin & Baskin, 2001).

La mención de problemas asociados con la germinación de *Victoria* data desde hace mucho tiempo (Bailey, 1927; Pring, 1953; Valla, 1976). Las primeras semillas de *V. cruziana* que prosperaron en Europa llegaron desde la provincia de Corrientes y fueron sometidas a temperaturas entre 18 a 22 °C, elevándose luego a 24-27 °C para estimular la germinación (Tricker, 1896). Este mismo autor observó una germinación errática de la especie, y la necesidad de un período de frío para la post-maduración, lo que hace que las semillas de 2 a 3 años tengan un mejor poder germinativo con respecto a las recién cosechadas. Resultados similares fueron

reportados por Sokolowa (1959), aunque también tuvo éxito a partir de semillas frescas.

El único antecedente del cultivo de *V. cruziana* en nuestro país fue hallado en el herbario del Jardín Botánico “Carlos Thays” (Parodi, 1934). Si bien Valla (1976) realizó diversos ensayos para promover la germinación de sus semillas, solamente logró entre un 8 y 12% de germinación, no pudiendo romper por completo la dormancia por escarificación mecánica del tegumento, ni por medio de la aplicación de ácido giberélico o luz.

La preservación de la riqueza florística tomó relevancia sobre todo a principios del 2022, cuando los Esteros del Iberá fueron afectados por incendios viéndose dañada el 57% de la cobertura vegetal del Parque Nacional Iberá (Saucedo *et al.*, 2023), razón por la cual el gobierno de la provincia de Corrientes, formuló el programa “Renacer Iberá”, para la recuperación de fauna, flora e infraestructura. El irupé se destaca como una especie emblemática de la flora de la provincia de Corrientes, por lo tanto, debiera contemplarse su preservación en los ambientes naturales.

El cultivo *in vitro* de tejidos ha sido reconocido como una técnica efectiva de propagación de plantas, siendo aplicable también para las angiospermas acuáticas (Mohan Ram & Kakkar, 1983; Jenks *et al.*, 2000). Sin embargo, las plantas acuáticas son consideradas especies recalcitrantes por ser difíciles de propagar en condiciones de cultivo de tejidos debido a las altas tasas de contaminación encontradas durante el establecimiento inicial (Swindells, 1990; Koch & Durako, 1991). Muchas de ellas no responden bien a los medios de cultivo, especialmente las especies del género *Nymphaea* (Swindells, 1990; Lakshmanan, 1994; Aruyanart *et al.*, 2008; Bodhipadma *et al.*, 2011) y también la adaptación a condiciones *ex vitro* puede representar un desafío, por lo que requiere más conocimiento (Nguyen, 2016).

Pese a estas dificultades, muchas especies se han micropropagado con éxito utilizando plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explante en la mayoría de los casos. El ejemplo incluye *Nymphaea alba* L. (Sumlu *et al.*, 2010), *N. tetragona* Georgi (Tandon *et*

al., 2010), *N. nouchali* Burm. f. (Pip *et al.*, 2021), *Nymphoides coreana* (H. Lév.) H. Hara (Oh *et al.*, 2010), *Ceratophyllum demersum* L. (Wyman & Francko, 1986), *Utricularia inflexa* Forssk. (Ram & Swamy, 1966), *Nelumbo lutea* Willd. (Francko, 1986; Kane *et al.*, 1988), *N. nucifera* Gaertn. (Yamamoto & Matsumoto, 1992; Aruyanart & Chaitrayagun, 2005) y *Polypleurum stylosum* (Wight) J. B. Hall (Sehgal *et al.*, 1993).

El objetivo de este trabajo fue lograr la conversión a plantas, en condiciones *in vitro*, de embriones de *Victoria cruziana* extraídos de semillas de frutos inmaduros (hasta un mes desde la polinización), recolectados en su ambiente natural cuando todavía los frutos estaban visibles por la cercanía a la superficie del agua facilitando su recolección.

Materiales y Métodos

Selección de flores y colecta de frutos

El material usado para esta experiencia fue recolectado en las márgenes del río Paraná, en cercanías del Puente Interprovincial Chaco-Corrientes, Argentina (27°44'72”S, 58° 88'55”W).

Se marcaron 12 flores a partir de su antesis (flores color blancas) (Fig. 1A, B) el 22 de marzo de 2007, sujetando un flotador de isopreno a cada flor seleccionada e indicando la fecha de la antesis, para facilitar la recolección de los frutos. Los frutos fueron recolectados según los estadios con 24, 48 y 72 horas de post-polinización, y luego por semana, hasta un máximo de un mes. Por cada estadio se recolectaron 2 frutos (Fig. 1C). En el laboratorio se procedió a eliminar todas las espinas con cuchillo, pinzas y guantes de cuero (Fig. 1D), a fin de facilitar el manipuleo. Luego se procedió a la limpieza de los frutos con agua, jabón y cepillo, antes de abrirlos y extraer las semillas. Dado que el contenido de semillas de cada fruto fue suficiente para esta experiencia, se cultivaron las semillas de un solo fruto por estadio. Se cultivaron 10 semillas por estadio con tres repeticiones y se establecieron seis estadios de desarrollo de frutos, cuyas características se describen en la Tabla 1 y se ilustran en la Fig. 1E.

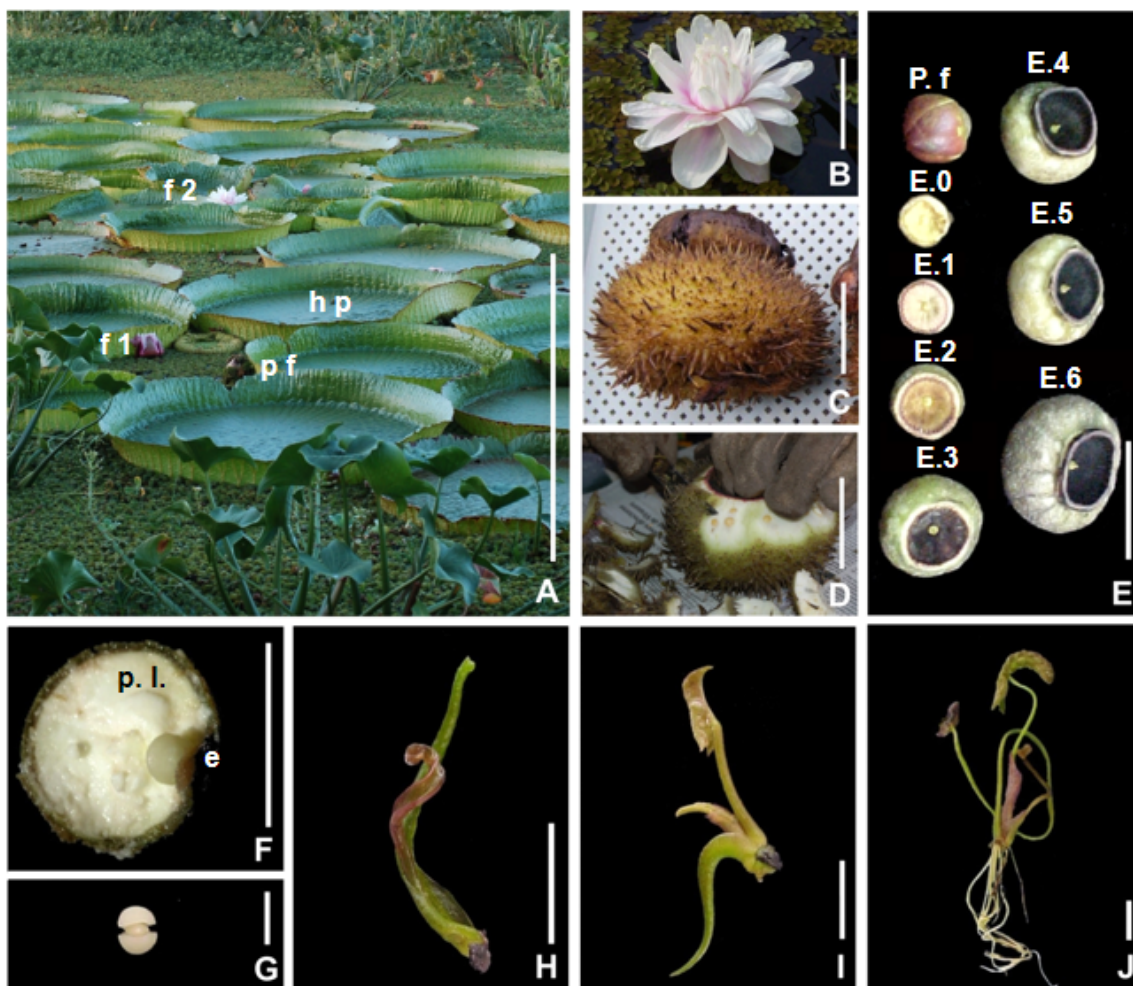


Fig. 1. Plantas de *Victoria cruziana* en su hábitat y características de sus órganos reproductivos (flores, frutos en distintos estadios, semillas y embriones), obtención de embriones para su cultivo y plántula regenerada *in vitro*. A: Hoja peltada (hp); pimpollo floral (pf); flor comenzando la apertura, momento de marcado de flores (f1); flor abierta con 2 días de post-polinización (f2). B: Flor con 3 días de post-polinización (base de los pétalos rosada). C: Fruto con espinas persistentes. D: Disección y limpieza del fruto para extraer semillas. E: Pimpollo floral (Pf); ovario de una flor sin polinizar (EO); diferentes estadios de frutos con 2 días de post-polinización (E.1); 3 días (E.2); 7 días (E.3); 14 días (E.4); 21 días (E.5) y 30 días (E.6). F: Semilla con perisperma líquido (pl) y embrión (e). G: Embrión aislado. H: Embrión con hojas cotiledonares anormales y vitrificados provenientes de 1 semilla de fruto en estadio 4 luego de 30 días de cultivo. I: Planta regenerada con hoja filiforme y primera hoja verdadera en 1/2 MS + 0,1 mg/L de TDZ con raíz rudimentaria. J: Planta mostrando su primera hoja peltada y abundantes raíces regeneradas en 1/2 MS + 10 mg/L de AG₃ a los 30 días de cultivo. Escalas: A: 1,2 m; B: 13 cm; C-D: 10 cm; E: 13 cm; F: 12 mm; G: 2 mm; H: 2 cm; I: 3,5 cm; J: 2,5 cm.

Fig. 1. *Victoria cruziana* plants in their habitat and characteristics of their reproductive organs (flowers, fruits in different stages, seeds and embryos), obtaining embryos for cultivation and regenerated seedling *in vitro*. A: Pelted leaf blade (hp); flower bud (pf); flower beginning to open, flower marking time (f1); open flower 2 days post-pollination (f2). B: Flower 3 days after pollination (pink petal base). C: Fruit with persistent spines. D: Dissection and cleaning of the fruit to extract seeds. E: Flower bud (Pf); ovary of an unpollinated flower (EO); different stages of fruits with 2 days of post-pollination (E.1); 3 days (E.2); 7 days (E.3); 14 days (E.4); 21 days (E.5) and 30 days (E.6). F: Seed with liquid perisperm (pl) and embryo (e). G: Isolated embryo. H: Embryo with abnormal and vitrified cotyledons from seed of fruit at Stage 4 after 30 days of culture. I: Regenerated plant with filiform leaf and first true leaf in 1/2 DM + 0.1 mg/L of TDZ with rudimentary root. J: Plant showing its first pelted leaf and abundant roots regenerated in 1/2 DM + 10 mg/L of GA₃ after 30 days of culture. Bars: A: 1.2 m; B: 13 cm; C-D: 10 cm; E: 13 cm; F: 12 mm; G: 2 mm; H: 2 cm; I: 3.5 cm; J: 2.5 cm.

Tabla 1. Características de los estadios de frutos del irupé usados en el cultivo de embriones *in vitro*.**Table 1.** Characteristics of irupé fruit developmental stages used in *in vitro* embryo culture.

Estadio	Características de pétalos		Color de la cavidad estigmática	Nº Color según atlas	Diámetro de frutos (cm)	Tiempo de post-antesis (días)
0	blanco	turgente	amarillo	*1,5:4:1	5	1 (Sin polinizar)
1	rosado	turgente	halo rosado tenue	9:7:3	6	2
			centro amarillo	1,5:4:1		
2	rosado	marchito	anillo rosado oscuro	9:4:4,5	8	3
			centro rosado	9:7:3		
3	marrón	muerto	rosado oscuro	9:4:4,5	11	7
4	marrón	muerto	rojo oscuro	9:4:6	12	14
5	sin pétalos	sin pétalos	rojo oscuro	9:4:6	13	21
6	sin pétalos	sin pétalos	violeta oscuro	9:1:7	16	30

* Biesalki (1957)

Desinfección de semillas, extracción de embriones y establecimiento en el medio de cultivo

La desinfección de semillas fue relativamente fuerte, porque los frutos de los cuales se extrajeron poseían partículas de suelo y restos de materiales vegetales en descomposición adheridos. Los frutos se sumergieron en etanol 70% durante 5 minutos y seguidamente en una solución de NaOCl al 50% más 3 gotas/L de Tritón 100 durante 20 minutos. Finalmente, se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril. Es de destacar que, a pesar de esta concentración elevada de NaOCl, no se observaron daños en los embriones.

Para la extracción del embrión, se cortaron las semillas longitudinalmente con bisturí bajo lupa estereoscópica y en cabina de flujo laminar de aire estéril (Fig. 1F). La extracción de los embriones se vio favorecida porque las semillas utilizadas presentaban tegumento blando y perisperma lechoso, lo que permitió la apertura de las mismas y la salida del embrión con leve presión. Se inoculó un embrión (Fig. 1G) por tubo de ensayo conteniendo 5 mL de medio de

cultivo. Se cultivaron 10 tubos por tratamiento con 3 repeticiones cada uno. Las características de los frutos colectados en diferentes tiempos de post-polinización se detallan en la Tabla 1. Para la determinación de los colores de la cavidad estigmática se empleó la tabla de colores propuesta por Biesalki (1957).

Los tubos fueron incubados en una sala de crecimiento a una temperatura de 27 ± 2 °C y un fotoperíodo de 14 h con una irradiación de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes de color blanco frío Philips TLD 36W/840 (Holland).

Reguladores de crecimiento y conversión a plantas

Los medios de cultivo ensayados contenían, como medio basal, las sales minerales y vitaminas de Murashige & Skoog (1962) completas o diluidas a la mitad (1/2 MS) adicionadas con 3% de sacarosa, con o sin varias concentraciones de ácido giberélico (AG_3) y thidiazuron (TDZ). Se evaluaron doce medios de cultivo, diez de ellos con el agregado de reguladores de crecimiento cuya composición se detalla en la Tabla 2. El pH

de los medios fue ajustado a 5,8 con KOH y/o HCl antes del agregado de agar. Se utilizó agar Sigma A-1296 a razón de 0,65%. Los medios fueron esterilizados en autoclave a 1,46 kg cm⁻² durante 20 minutos.

Análisis estadístico

Las respuestas de los embriones aislados en lo referente a la conversión a plantas, la proporción de plantas anormales y normales fueron registradas al cabo de 30 días de cultivo. Posteriormente, los datos fueron tabulados y se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), y las medias se compararon mediante el Test de comparaciones múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$) utilizando el software InfoStat, versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017). En las tablas se reportan las medias aritméticas con su desvío estándar (\pm DE).

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo empleados.

Table 2. Composition of culture media.

Número	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento vegetal	(mg/L)
1	½ MS		1
2	½ MS	AG ₃	5
3	½ MS		10
4	½ MS	TDZ	0,1
5	½ MS		1
6	½ MS	sin RCV	
7	MS		1
8	MS	AG ₃	5
9	MS		10
10	MS	TDZ	0,1
11	MS		1
12	MS	sin RCV	

Referencias: AG₃: ácido giberélico. TDZ: thidiazuron. RCV: reguladores de crecimiento vegetal.

References: AG₃: gibberellic acid. TDZ: thidiazuron. RCV: plant growth regulators.

Resultados y Discusión

Al cabo de 30 días se contaron los embriones convertidos en plantas y las plantas normales y anormales regeneradas. Empleando el medio basal MS en su composición original, con o sin reguladores de crecimiento, no se logró conversión a plantas en ninguno de los estadios cultivados. Sin embargo, fue posible regenerar plantas en los medios con ½ MS, manteniéndose 3% de sacarosa. Evidentemente, la alta concentración de sales fue perjudicial para esta especie que crece naturalmente en agua dulce, cuyo análisis determinó que se trataría de agua de lluvia casi pura, con poca cantidad de elementos del medio en solución (Valla & Cirino, 1972). A diferencia de lo obtenido con *Victoria cruziana*, en *Nymphaea nouchali*, otra especie acuática, se ha logrado 65% de germinación y conversión a plantas a partir del cultivo *in vitro* de semillas extraídas de frutos maduros en el medio basal MS suplementado con 2% de sacarosa y desprovisto de reguladores de crecimiento (Pip *et al.*, 2021).

En los estadios 0, 1 y 2 ningún embrión se convirtió en planta en los medios probados con o sin el agregado de reguladores de crecimiento, pero lograron su conversión a plantas los embriones aislados de los estadios 4, 5 y 6 (Tabla 3). Al agregar AG₃ o TDZ, se obtuvieron porcentajes altos de conversión a plantas en los tres estadios, con respecto al medio de cultivo carente de reguladores de crecimiento. En los estadios 5 y 6 tanto el agregado de AG₃ como de TDZ incrementó el porcentaje de conversión a plantas. En ambos estadios, la adición de 10 mg/L de AG₃ permitió alcanzar porcentajes de conversión a plantas de los embriones del 97%. En cuanto a la concentración de TDZ, la obtención de plantas dependió del estadio. Mientras que para el estadio 4 y 6 fue mayor en ½ MS suplementado con 0,1 mg/L de TDZ (83% y 90%), para el estadio 5 fue más eficiente el tratamiento que consistió en ½ MS suplementado con 1 mg/L de TDZ (97%).

Los embriones provenientes de semillas derivadas de frutos en estadio 4 brindaron un porcentaje elevado de plantas anormales. El embrión, si bien desarrolla los cotiledones, no progresa y manifiesta albinismo o crece con

Tabla 3. Regeneración de plantas *in vitro* de irupé (*Victoria cruziana*) por cultivo de embriones en diferentes estadios de maduración de frutos, después de 45 días de cultivo. Efecto de los medios de cultivo sobre el porcentaje de embriones que se convirtieron en plantas (%CP), el porcentaje de embriones que crecieron con anomalías como albinismo o con raíces atrofiadas que terminaron muriendo (%EA), y el porcentaje de plantas regeneradas normales, con color verde, con ápice caulinar y radicular desarrollados (%NP).

Table 3. *In vitro* plant regeneration of irupé (*Victoria cruziana*) by embryo culture at different stages of fruit maturation, after 45 days of culture. Effect of culture media on the percentage of embryos that converted into plants (%CP), percentage of embryos that grew with abnormalities such as albinism or with stunted roots that ended up dying (%EA), and the percentage of normal regenerated plants, with green color, with developed stem and root apices (%NP).

Medio de cultivo (mg/L)	Estadios del fruto	%CP	%EA	%NP
1= 1/2MS + AG ₃ 1		20±10* a**	100 a	0
2= 1/2MS + AG ₃ 5		50±10 cd	100 a	0
3= 1/2MS + AG ₃ 10	4	40±10 bc	93±11,6 ab	5±9,2 ab
4= 1/2MS + TDZ 0,1		83±5,8 ghi	96±7,5 ab	4±7,5 ab
5= 1/2MS + TDZ 1		50±10 cd	100 a	0
6= 1/2MS sin RCV		60±10 de	100 a	0
1= 1/2MS + AG ₃ 1	5	63±5,8 de	95±9,2 ab	5±9,2 ab
2= 1/2MS + AG ₃ 5		63±5,8 de	89±9,8 ab	11±9,8 abc
3= 1/2MS + AG ₃ 10		97±5,8 i	10±10 de	90±10 ef
4= 1/2MS + TDZ 0,1		67±5,8 ef	20±7,4 cd	80±7,3 de
5= 1/2MS + TDZ 1		97±5,8 i	28±6,8 c	72±6,8 d
6= 1/2MS sin RCV		73±5,8 efg	86±0,6 ab	14±0,6 bc
1= 1/2MS + AG ₃ 1	6	30±10 ab	93±11,6 ab	7±11,6 ab
2= 1/2MS + AG ₃ 5		80±10 fgh	83±7,0 b	20±5,7 c
3= 1/2MS + AG ₃ 10		90±10 hi	4±6,4 e	96±6,3 f
4= 1/2MS + TDZ 0,1		90±10 hi	11±1,5 de	89±1,5 ef
5= 1/2MS + TDZ 1		70±10 efg	20±11,3 cd	80±11,3 de
6= 1/2MS sin RCV		37±5,8 bc	100 a	0

Referencias: * Números indican valores medios ± desviación estándar. **Diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas según el Test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$). AG₃: ácido giberélico. TDZ: thidiazuron. RCV: reguladores de crecimiento vegetal.

References: * Numbers indicate mean values ± standard deviation. **Different letters between columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Comparison Test ($P \leq 0.05$). AG₃: gibberellic acid. TDZ: thidiazuron. RCV: plant growth regulators.

deformaciones y vitrificación (Fig. 1H). En los restantes estadios se evidenció un porcentaje menor de respuestas con anomalías, dependiendo del medio de cultivo. La mayor

cantidad de plantas normales se obtuvo de los embriones provenientes de frutos con mayor tiempo de maduración (estadio 6) con la adición de reguladores de crecimiento.

Los resultados obtenidos indican que los embriones deben tener un cierto estado de desarrollo para germinar. En otra especie, *Nelumbo nucifera*, cultivando embriones inmaduros de 5 a 30 días de post-polinización, se concluyó que cuanto más joven es el embrión, más complejo es el requerimiento de hormonas, y se estableció la importancia del estado de autonomía del embrión para que el mismo tenga la habilidad de completar su normal embriogénesis y producir una planta con independencia de reguladores de crecimiento (Batygina & Vasileyeva, 2003). Este período varía según las especies y en *N. nucifera* se encuentra a partir de los 10 días después de la polinización (Batygina & Vasileyeva, 2003). En *Victoria cruziana*, en cambio, se evidencia que requiere mayor tiempo, porque solo a partir de los 21 días puede germinar con el agregado de reguladores de crecimiento.

En otros trabajos realizados en Royal Botanic Gardens (Kew, Inglaterra) con *V. cruziana*, se menciona que el período de maduración de frutos, desde post-polinización hasta la apertura del fruto puede ser de 33 a 90 días (Mazzini, 2003). Este rango de días hasta la apertura depende de la temperatura del agua, lo que no fue considerado en esta experiencia dado que las plantas crecían en un clima subtropical y el desarrollo de la especie es desde principios de primavera a verano (Fig. 1A), desapareciendo la parte aérea con los primeros fríos o heladas.

El AG₃, en este experimento ha contribuido de dos maneras: por un lado, favoreciendo la conversión en plantas del embrión inmaduro y, por otro lado, la formación de raíces (efecto de reversión del crecimiento vegetativo promoviendo el enraizamiento) (Fig. 1J), ya comprobado en *Prunus avium* (L.) L. (Ford *et al.*, 2002) o el crecimiento de las raíces a través de la modulación de factores de transcripción relacionados con el proceso de enraizamiento como en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Hardtke, 2003). También se lo ha empleado para estimular el crecimiento de rizomas en *Nelumbo nucifera* (Kane *et al.*, 1988).

El agregado de AG₃ y agar solamente han sido empleados con éxito en la obtención de plantas a partir de semillas de frutos

maduros de *Victoria amazonica* (Mazzini, 2003). También se menciona que, si bien es una hormona que rompe la dormancia de las semillas causando una germinación abundante y uniforme, una alta concentración puede causar una inhibición en el crecimiento y puede tener efectos posteriores en las plantas, impidiendo el crecimiento de la primera hoja filiforme (Mazzini, 2003).

En esta experiencia debemos mencionar que, aunque el porcentaje de conversión a plantas fue elevado en los medios conteniendo TDZ, las plantas obtenidas al cabo del mes desarrollan una raíz incipiente (Fig. 1I). La radícula no diferenciada en el embrión es frecuente en muchas hidrófilas y aparece después de producida la germinación (Sculthorpe, 1967). En esta especie, Valla (1976) afirma que recién con la segunda hoja comienzan a insinuarse los ápices de las primeras raíces adventicias. En *Nymphaea* "Daubeniana", Jenks *et al.* (1990) usaron el TDZ, con éxito para estimular el crecimiento y desarrollo de yemas epifilas en nenúfares, reemplazando al 2-isopentenil adenina luego de que el plantel presentara problemas de vitrificación.

La extracción de los embriones permitió su conversión a plantas, superando la barrera ya reconocida de la dormancia impuesta por la presencia de una capa impermeable (Crocker, 1907) o embriones subdesarrollados, características de las familias más primitivas de las angiospermas existentes, como Nymphaeales, llamadas colectivamente grupo ANITA (Baskin & Baskin, 2007), a la que pertenece esta especie.

Nguyen (2016), empleando el cultivo de embriones aislados de *Victoria*, también logró obtener plantas, pero tuvo el inconveniente de no contar con mucho material y el recibido fue donado por el Kanapaha Botanical Garden. En ese caso, las semillas fueron guardadas en agua a 8 °C en oscuridad por 7 meses después de la apertura de las cápsulas o frutos, destacándose las semillas por ser redondas con tegumento liso, complicando la disección. Además, el autor tuvo que realizar dos desinfecciones, incluso sobre el embrión. Es de destacar que la epidermis externa del tegumento seminal contiene células con paredes lignificadas gruesas, onduladas y con

cutícula gruesa, la que será más dura con el transcurrir del tiempo porque el tegumento externo es protector (Valla & Cirino, 1972). Al trabajar con estadios tempranos, el proceso de extracción del embrión fue simple y con menor riesgo de dañarlo, facilitando la apertura del tegumento seminal no endurecido y con perisperma lechoso (Fig. 1F). Esto permite el deslizamiento por presión del instrumental y demora la deshidratación del embrión durante su manipuleo.

El desarrollo de un protocolo eficiente de obtención de plantas de *V. cruziana* permitiría su uso como ornamental de jardines acuáticos (Ferro *et al.*, 1995). Otros países han incluido al irupé en estudios de aplicaciones farmacéuticas, ya realizados en otras especies de la familia Nymphaeaceae como *V. amazonica* a partir de extractos vegetales (Goleniewska-Furmanova, 1970) y de la familia Nelumbonaceae (La *et al.*, 1995; Gupta, 1996; Mukherjee & Giri, 1996; Mukherjee *et al.*, 1996, 1997; Barthlott *et al.*, 1997; Rai *et al.*, 2006). Además, se la ha empleado para realizar estudios termométricos (Lamprecht *et al.*, 2002).

Conclusiones

En este trabajo se presenta un procedimiento exitoso para la regeneración de plantas aptas para programas de restauración ambiental. Se demostró que es posible obtener plantas de irupé por cultivo *in vitro* de embriones extraídos de semillas de frutos inmaduros, dependiendo del estadio en que se encuentre. El empleo de frutos en estadios más avanzados permitió la obtención de un elevado porcentaje de conversión de embriones en plantas, mayor cantidad de plantas normales y menos anomalías morfológicas, a la vez que se evitó la dormancia impuesta por la presencia de una capa impermeable, inhibidores químicos o embriones subdesarrollados. El medio de cultivo más efectivo resultó ser $\frac{1}{2}$ MS + 10 mg/L de AG₃, el cual brindó un alto porcentaje de plantas normales con buen desarrollo radicular y foliar (hojas filiformes, hastadas y peltadas), presentando mejores condiciones para su aclimatización *ex vitro*. En futuras

investigaciones será necesaria la evaluación de otros reguladores de crecimiento y la adaptación a condiciones *ex vitro*.

Agradecimientos

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (PI 20A009, PI 20A012 y PI 20A013) por el apoyo económico y financiero. Asimismo, los autores desean expresar su agradecimiento especialmente a los Sres. Emilio Ortiz, quien fue responsable de la colecta de los frutos y a Javier Tarillo Engler, propietario del Vivero Acuático Naturalia, por su guía sobre el cultivo.

Bibliografía

- ARBER, A. (1920). Chapter III: The life-history of the Nymphaeaceae and of *Limnanthemum*. En CLAY, C. F. (ed.), Water plants: a study of aquatic angiosperms, pp. 24-41. Cambridge University Press, London.
- ARBO, M. M., LÓPEZ, M. G., SCHININI, A. & PIESZKO, G. (2002). Capítulo 1: Las plantas hidrófilas. En ARBO, M. M. & S. G. TRESSENS (eds.), Flora del Iberá, pp. 9-110. EUDENE, Corrientes.
- ARUNYANART, S. & CHAITRAYAGUN, M. (2005). Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Scientia Horticulturae* 105: 411-420. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.034>
- ARUNYANART, S., SAETIEW, K. & KLAIPUK, V. (2008). Effect of plant growth regulators on multiplication of *Nymphaea* spp. cv. 'Joey Tomocik' through tissue culture. *Agricultural Science Journal* 39: 207-210.
- BAILEY, L. H. (1927). *The Standard Cyclopaedia of Horticulture*. The Macmillan Co., London.
- BARTHLOTT, W. & NEINHUIS, C. (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202: 1-8. <https://doi.org/10.1007/s004250050096>
- BASKIN, C. C. & BASKIN, J. M. (2001). *Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego, California. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2000.tb01610.x>
- BASKIN, C. C. & BASKIN, J. M. (2007). Nymphaeaceae: a basal angiosperm family (ANITA grade) with a fully developed embryo. *Seed Science Research* 17: 293-296. <https://doi.org/10.1017/S0960258507834994>

- BASKIN, J. M., BASKIN, C. C. & XIAOJIE, L. (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* 15: 139-152. <https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x>
- BATYGINA, T. B. & VASILYEVA, V. (2003). Periodization in the development of flowering plant reproductive structures: Critical periods. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botánica* 451: 27-36.
- BIESALKI, E. (1957). *Rflanzfarbenatlas: für Gartenbau, Landwirtschaft und Forstwesen mit Farbzeichen nach DIN 6164*.
- BODHIPADMA, K., NOICHINDA, S., WACHIRABONGKOTH, P., PUKPOOMIN, E., PUNNAKANTA, L. & NATHALANG, K. (2011). *In vitro* propagation of *Nymphaea nouchali* var. *versicolor* 'Bua Phuean'. *The Journal of Applied Science* 10: 7-11.
- CABRERA, A. L. (1964). *Las plantas acuáticas*. Eudeba, Buenos Aires.
- CARR, D. J. (1961). Chemical influence of the environment. En RUHLAND, W. (ed.), *Encyclopedia of plant physiology*, pp. 737-794. Springer-Verlag, Berlin.
- CROCKER, W. (1907). Germination of seeds of water plants. *Botanical Gazette (Chicago)* 44: 1-224.
- CRONQUIST, A. (1968). *The evolution and classification of flowering plants*. Nelson, London.
- DI RIENZO, J. A., CASANOVES, F., BALZARINI, M. G., GONZÁLEZ L., TABLADA, M. & ROBLEDO, C. W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- D'ORBIGNY, A. (1840). Note sur les espèces du genre *Victoria*. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Série II* 13: 56-57.
- FERRO, E. A., FIGUEREDO, A., DE RAINIOLO, O. S., VELÁSQUEZ, C. & ALVARENGA, N. (1995). Actividad biológica de plantas usadas en medicina popular en Paraguay. *Revista de la Universidad Nacional de Asunción* N° 5-6.
- FORD, Y. Y., TAYLOR, J. M., BLAKE, P. S. & MARKS, T. R. (2002). Gibberellin A3 stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry (*Prunus avium*). *Plant Growth Regulation* 37: 127-133. <https://doi.org/10.1023/A:1020584627919>
- FORSBERG, C. (1966). Sterile germination requirements of seeds of some water plants. *Physiologia Plantarum* 19: 1105-1109. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1966.tb07103.x>
- FRANCKO, D. A. (1986). Studies on *Nelumbo lutea* (Willd.) Pers. I. Techniques for axenic liquid seed culture. *Aquatic Botany* 26: 113-117. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(86\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0304-3770(86)90009-4)
- FRIEDMAN, W. E. (2001). Comparative embryology of basal angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 14-20. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00129-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00129-1)
- GOLENIEWSKA-FURMANOVA, M. (1970). Comparative leaf anatomy and alkaloid content in the Nymphaeaceae Betham and Hookec. *Monographiae Botanicae* 31: 1-56. <https://doi.org/10.5586/mb.1970.001>
- GUPTA, M., MAZUMER, U. K., MUKHOPADDHYAY, R. K. & SARKAR, S. (1996). Antisteroidogenic effect of the seed extract of *Nelumbo nucifera* in the testis and the ovary of the rat. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 58: 236-242.
- HARDTKE, C. S. (2003). Gibberellin Signaling: GRASS Growing Roots Dispatch. *Current Biology* 13: 366-367. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00279-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00279-3)
- JENKS, M., KANE, M., MAROUSKY, F., MCCONNELL, D. & SHEEHAN, T. (1990). *In vitro* establishment and epiphyllous plantlet regeneration of *Nymphaea* "Daubeniana". *HortScience* 25: 1664.
- JENKS, M. A., KANE, M. E. & MCCONNELL, D. B. (2000). Shoot organogenesis from petiole explants in the aquatic plant *Nymphoides indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63:1-8. <https://doi.org/10.1023/A:1006471027372>
- KANE, M. E., SHEEHAN, T. J. & FERWERDA, F. H. (1988). *In vitro* growth of American *Lotus* embryos. *HortScience* 23: 611-613.
- KANE, M. E. (1992). Tissue culture propagation of ornamental water lilies. En *Aquaculture Market Development Aid Program, Volume III*. Department of Agriculture & Consumer Services, pp. 557-604. Tallahassee, Florida, USA.
- KHANNA, P. (1967). Morphological and embryological studies in Nymphaeaceae III. *Victoria cruziana* D'Orb. and *Nymphaea stellata* Wild. *Botanical Magazine* 80: 305-312.
- KOCH, E. W. & DURAKO, M. J. (1991). *In vitro* studies of the submerged angiosperm *Ruppia maritima*: Auxin and cytokinin effects on plant growth and development. *Marine Biology* 110: 1-6. <https://doi.org/10.1007/BF01313085>
- KUBO, N., HIRAI, M., KANEKO, A., TANAKA, D. & KASUMI, K. (2009). Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*). *Aquatic Botany* 90: 191-194. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.06.006>
- LA, C. B. & MOLGAARD, P. (1995). Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *Journal*

- of Ethnopharmacology 46:125-129. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01234-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01234-5)
- LAKSHMANAN, P. (1994). In vitro establishment and multiplication of *Nymphaea* hybrid 'James Brydon'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 145-148. <https://doi.org/10.1007/BF00048326>
- LAMPRECHT, I., SCHMOLZ, E., HILSBURG, S. & SCHELDEL, S. (2002). A tropical water lily with strong thermogenic behaviour-thermometric and thermographic investigations on *Victoria cruziana*. Thermochemica Acta 382: 199-210. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00734-1](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00734-1)
- LES, D. H., GARVIN, D. K. & WIMPEE, C. F. (1991). Molecular evolutionary history of ancient aquatic angiosperms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 10119-10123. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10119>
- MAZZINI, R. (2003). Germination *in vitro*: future for the *Victoria amazonica* seeds? Royal Botanic Gardens, Kew, UK, http://www.victoria-adventure.org/victoria_images/renata/project1.html ; http://www.victoria-adventure.org/victoria_images/renata/project2.html
- MOHAN RAM, H. Y. & KAKKAR, M. (1983). Role of tissue culture in the study of aquatic plants. Bulletin of the Botanical Survey of India 25: 26-34.
- MUKHERJEE, P. K., SAHA, K., BALASUBRAMANIAN, R., PAL, M. & SAHA, B. P. (1996). Studies on psychopharmacological effects of *Nelumbo nucifera* Gaertn. rhizome extract. Journal of Ethnopharmacology 54: 63-67. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(96\)01455-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(96)01455-9)
- MUKHERJEE, P. K. & GIRI, S. N. (1996). Pharmaceutical application of starch isolated from *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Fam. Nymphaeaceae). Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 58: 59-66.
- MUKHERJEE, P. K., SAHA, K., DAS, J., PAL, M. & SAHA, B. P. (1997). Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Planta Medica 63: 367-369. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957705>
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- MURPHY, K. J., DICKINSON, G., THOMAS, S. M., BINI, L. M., DICK, K., GREAVES, K., KENNEDY, M. P., LIVINGSTONE, S., MCFERRAN, H., MILNE, J. M., OLDROYD, J. & WINGFIELD, R. A. (2003). Aquatic plant communities and predictors of diversity in a sub-tropical river floodplain: the upper Rio Paraná, Brazil. Aquatic Botany 77: 257-276. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(03\)00108-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(03)00108-6)
- NAGASAKI, O. (2007). Impact of the flower stalk-boring moth *Noeschoenobia testacealis* (Lepidoptera: Crambidae) and water-level fluctuations on the flower and fruit production of the yellow water lily *Nuphar subintegerrima* (Nymphaeaceae) in irrigation ponds of western Japan. Aquatic Botany 88: 27-31. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.08.004>
- NEIFF, J. J. (1978). Fluctuaciones de la vegetación acuática en ambientes del valle de inundación del Paraná medio. Physis 38: 41-53.
- NGUYEN, H. (2016). *In vitro* physiology of recalcitrant tissue culture plants in the Nymphaeaceae, Alismataceae and Orchidaceae. Doctoral Dissertation. University of Florida. ProQuest Number: 10299029. 233 pp.
- NOHARA, S. & TSUCHIYA, T. (1990). Effects of water level fluctuation on the growth of *Nelumbo nucifera* Gaertn. in Lake Kasumigaura, Japan. Ecological Research 5: 237-252. <https://doi.org/10.1007/BF02346994>
- OH, M. J., NA, H. R., CHOI, H. K., LIU, J. R. & KIM, S. W. (2010). High frequency plant regeneration system for *Nymphoides coreana* via somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived embryogenic cell suspension cultures. Plant Biotechnology Reports 4: 125-128. <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0126-3>
- ORBAN, I. & BOUHARMONT, J. (1998). Megagametophyte development of *Nymphaea nouchali* Burm. F. (Nymphaeaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 126: 339-348. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1998.tb01386.x>
- PARODI, L. R. (1934). Las plantas indígenas no alimenticias cultivadas en la Argentina. Revista Argentina de Agronomía 1: 165-212.
- PIP, P., DPSTG, A., K, Y., DMD, Y., CN, F., UPE, A., WPDS, G. & WDCD, W. (2021). *In vitro* culture of *Nymphaea nouchali* seeds; a conservation approach for a vulnerable species. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka 49: 393 - 402. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v49i3.10305>
- PRING, G. H. (1953). Growing *Victoria cruziana* from seeds. Missouri Botanical Garden Bulletin 41: 85-89.
- RAI, S., WAHILE, A., MUKHERJEE, K., SAHA, B. P. & MUKHERJEE, P. K. (2006). Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. Journal of Ethnopharmacology 104: 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.025>

- RAM, H. M. & SWAMY, R. D. (1966). Growth and flowering of *Utricularia inflexa* Forsk. var. *inflexa* Taylor in axenic culture. *Naturwissenschaften* 53: 387-388.
- SAUCEDO, G. I., PERUCCA, R. & KURTZ, D. (2023). Las causas de los incendios de principios del año 2022 en la provincia de Corrientes. *Ecología austral* 33: 273-284. <https://doi.org/10.25260/EA.23.33.1.0.2020>
- SCULTHORPE, C. D. (1967). The biology of aquatic vascular plants. Edward Arnold Ltda., London.
- SEHGAL, A., RAM, H. Y. M. & BHATT, J. R. (1993). *In vitro* germination, growth, morphogenesis and flowering of an aquatic angiosperm, *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* 45: 269-283.
- SHIBAYAMA, Y. & KADONO, Y. (2007). The effect of water-level fluctuations on seedling recruitment in an aquatic macrophyte *Nymphoides indica* (L.) Kuntze (Menyanthaceae). *Aquatic Botany* 87: 320-324. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.07.004>
- SHIPLEY, B. & PARENT, M. (1991). Germination responses of 64 wetland species in relation to seed size, minimum time to reproduction and seedling relative growth rate. *Functional Ecology* 5: 111-118.
- SMITH, L. T., MAGDALENA, C., PRZELOMSKA, N. A. S., PÉREZ-ESCOBAR, O. A., MELGAR-GÓMEZ D. G., BECK, S., NEGRÃO, R., MIAN, S., LEITCH, I. J., DODSWORTH, S., MAURIN, O., RIBERO-GUARDIA, G., SALAZAR, C. D., GUTIERREZ-SIBAUTY, G., ANTONELLI, A. & MONRO, A. K. (2022). Revised species delimitation in the giant water lily genus *Victoria* (Nymphaeaceae) confirms a new species and has implications for its conservation. *Frontiers in Plant Science* 13: 883151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.883151>
- SOKOLOWA, R. S. (1959). Nueva información sobre el cultivo de *Victoria*. *Priroda* 48: 116-117.
- SUMLU, S., ATAR, H. H. & KHAWAR, K. M. (2010). Breaking seed dormancy of water lily (*Nymphaea alba* L.) under *in vitro* conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 24: 1582-1586. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0009-3>
- SWINDELLS, P. (1990). *In vitro* reproduction of *Nymphaea*. En HARTMANN, H.T. (ed.), *International Plant Propagators' Society Combined Proceeding*. International Society for Horticultural Science: Asilomar, CA, USA.
- TAKHTAJAN, A. (1958). *Origins of angiospermous plants*. American Institute of Biological Sciences. Washington, D.C.
- TANDON, P., DANG, J. C. & KUMARIA, S. (2010). *Nymphaea tetragona*, a rare and endangered plant of Meghalaya, India. The Eden Project. Centre for Advanced Studies in Botany, North-Eastern Hill University, Shillong, India. www.plant-talk.org. <https://www.plant-talk.org/nymphaea-tetragona-india.htm>
- TRICKER, W. (1896). Water Lilies from seed. *The Garden and Forest Magazine*. Arlington, New Jersey.
- VALLA, J. J. & CIRINO, D. R. (1972). Biología floral del irupé (*Victoria cruziana* D'Orb.) (Nymphaeaceae). *Darwiniana* 17: 477-497.
- VALLA, J. J. (1976). El cultivo y los usos del irupé (*Victoria cruziana* D'Orb.) (Nymphaeaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 17: 315-322.
- VALLA, J. J. & MARTÍN, M. E. (1976). La semilla y la plántula del irupé (*Victoria cruziana* D'Orb.) (Nymphaeaceae). *Darwiniana* 20: 3-4.
- WHEELER HAINES, R. & LYE, K. A. (1975). Seedlings of Nymphaeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 70: 255-265. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1975.tb01649.x>
- WYMAN, C. & FRANCKO, D. A. (1986). Germination of *Ceratophyllum demersum* seeds in aseptic liquid culture. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 66: 27-29.
- YAMAMOTO, Y. & MATSUMOTO, O. (1992). Immature embryo culture of East Indian lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Bulletin of the Yamaguchi-ken Agricultural Experiment Station* 44: 11-16.