

REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Anthurium andreanum* Lind MEDIANTE EL EMPLEO DEL CULTIVO *In Vitro*

Silvia Montes, C. Morales[✉] y Estervis Bell

ABSTRACT. The objective of this study was to establish a methodology for the micropropagation of *Anthurium andreanum* L. Young leaves from mother plants under greenhouse conditions were used as starting material. Different procedures were tested in order to determine the optimal disinfection method: double disinfection of leaves with sodium hypochlorite during 30 and 20 min enabled to 96 % healthy explants. MS medium supplemented by different concentrations of BAP and 2,4-D was used for callus induction and subculture. For sprout regeneration and rooting, two concentrations of BAP were tested, more than 10 adventitious sprouts per explant were obtained in all varieties with 1 mg.L⁻¹ de BAP. Finally complete plantlets were formed, which developed satisfactorily under greenhouse conditions.

Key words: *Anthurium andreanum*, tissue culture

RESUMEN. El objetivo de este estudio fue establecer una metodología para la micropropagación de *Anthurium andreanum* L. Como material de partida se escogieron hojas jóvenes de plantas madres ubicadas en el invernadero. Se llevaron a cabo diferentes tratamientos para la desinfección como fueron: la doble desinfección con hipoclorito de sodio durante 30 y 20 min respectivamente, permitió un 96 % de desinfección. El medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D fue utilizado para las fases de inducción y subcultivo de los callos. Para la regeneración de brotes y el enraizamiento, se emplearon dos concentraciones de BAP. En todas las variedades analizadas se logró una buena respuesta, obteniéndose más de 10 brotes adventicios. Finalmente, fue posible lograr un crecimiento y desarrollo uniformes y esas plantas se desarrollan en invernadero satisfactoriamente.

Palabras clave: *Anthurium andreanum*, organogénesis, cultivo *in vitro*

INTRODUCCIÓN

De las especies e híbridos pertenecientes a las monocotiledóneas, los Anturios son plantas altamente apreciadas como ornamentales, debido a la belleza de sus flores y a su exótico follaje. Mediante el empleo de los métodos de mejora de la especie *Anthurium andreanum* Linden ex *Andre*, se han obtenido un sinnúmero de cultivares que han sido empleados como flor de corte o para maceta, los que se comercializan a través del mundo. La demanda de este material propagado y de los nuevos cultivares es muy amplia, alcanzando altas cotizaciones en el mercado internacional (1).

La propagación tradicional de esta especie mediante hijuelos y segmentos nodales, suele ser lenta y poco rentable (2), por lo que las técnicas de reproducción *in vitro* han sido ampliamente utilizadas, con vistas a incrementar las tasas de multiplicación en menor tiempo.

Los protocolos de propagación *in vitro* de *A. andreanum* han sido descritos con el uso de diferentes explantes: segmentos de limbos y peciolos de hojas, espatas, espádices y raíces (3, 4).

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo de regeneración vía organogénesis de *Anthurium andreanum* L. en tres variedades de gran atractivo y demanda en el mercado nacional, para así ampliar la disponibilidad de contar con estos materiales para su comercialización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas donantes de *Anthurium* crecieron en un invernadero ubicado en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, donde recibieron las atenciones culturales recomendadas (5). Las variedades utilizadas en este trabajo fueron Sonate: Rosado, Tropical: Rojo y Merengue: Blanco, las que para su posterior identificación se denominaron V₁, V₂ y V₃ respectivamente. Estos ejemplares fueron aportados por la Empresa Tropiflora del MINAGRI.

Como fuentes de explantes para la siembra *in vitro* se seleccionaron hojas jóvenes, por ser consideradas como las adecuadas para iniciar el establecimiento y posterior fase de inducción de la callogénesis en medio sólido.

En la desinfección de las hojas y los peciolos, se ensayaron diferentes procedimientos; inicialmente las hojas se lavaron con agua y detergente, y se enjuagaron con agua normal; a partir de ese momento se sometieron a diferentes tratamientos de desinfección en la cámara de flujo laminar, los que se describen a continuación:

Dra.C. Silvia Montes, Investigador Titular y Ms.C. C. Morales, Investigador Agregado del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; Estervis Bell, Especialista de la Empresa Tropiflora, MINAGRI.

✉ cmorales@inca.edu.cu

Tratamiento 1 (T₁): inmersión en solución de CaOCl 2 % + Tween 20 durante 30 minutos + 3 enjuagues con agua destilada y estéril.

Tratamiento 2 (T₂): inmersión en solución de NaOCl 0.53 % + Tween 20 durante 30 minutos + 3 enjuagues con agua destilada y estéril + NaOCl 0.27 % + Tween 20 durante 20 minutos + 3 enjuagues con agua destilada y estéril.

Seguidamente se procedió al corte de las hojas a un tamaño aproximado de 1 cm² y se colocaron de forma que las tres cuartas partes quedaran sumergidas en el medio de cultivo. Los peciolo se cortaron a un tamaño de 1 cm y se ubicaron en posición vertical similar a los explantes de hojas.

Al medio de cultivo base (6) se le adicionó glucosa (30 g.L⁻¹) y sacarosa (20 g.L⁻¹) y se denominó medio de inducción de callo (MIC) 1 y 2. En el medio de formación y desarrollo de brotes (MIB), las concentraciones de reguladores del crecimiento que se estudiaron fueron la Bencilaminopurina (BAP) 1 mg.L⁻¹ (MB-1) y 2 mg.L⁻¹ (MB-2). El ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) se empleó en la dosis de 0.08 mg.L⁻¹ para la fase de callogénesis. Los medios se ajustaron a un pH de 6 y fueron solidificados con gelrite 0.2 % en tubos de 2.5 x 10 cm y sellados con tapones de goma.

Los explantes se subcultivaron mensualmente y se transfirieron al MIB en el momento de aparición de los primordios foliares.

Durante el período de cultivo inicial hasta la aparición de los brotes, los cultivos se incubaron a 27°C en la oscuridad, momento a partir del cual se colocaron a la luz con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una intensidad de 2000-2500 lux. Se sembraron 40 explantes por tratamiento y se empleó un diseño completamente aleatorizado para el análisis estadístico de los resultados.

Las variables analizadas fueron: porcentaje de explantes libres de contaminantes, IFC=inicio de la formación del callo (días) y descripción de sus características (consistencia, apariencia y color), IFPF=inicio de formación de primordios foliares en días, IFB= inicio de la formación de brotes y NB=número de brotes, así como la presencia o no de raíces adventicias.

Para el procesamiento de los datos en las variables seleccionadas (IFC, IFPF, IFB y NB), se utilizó un análisis bifactorial, tomándose como factores las variedades y los medios de cultivo ensayados. En la variable porcentaje de desinfección de los explantes se realizó la Prueba de Proporciones (7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observa que los dos tipos de explantes evaluados (limbos y peciolo) lograron los mejores resultados, cuando se empleó el tratamiento T₂ consistente en la doble desinfección de estos con el hipoclorito de sodio; la ventaja estuvo dada en que además de los

altos porcentajes de explantes sanos obtenidos, 96 y 94 %, para los explantes de hojas y peciolo respectivamente (promedio de las tres variedades), este producto no provocó su muerte y su costo es mínimo si se compara con otros agentes desinfectantes. Este resultado propició contar con abundante material vegetal en las subsiguientes fases de estudio.

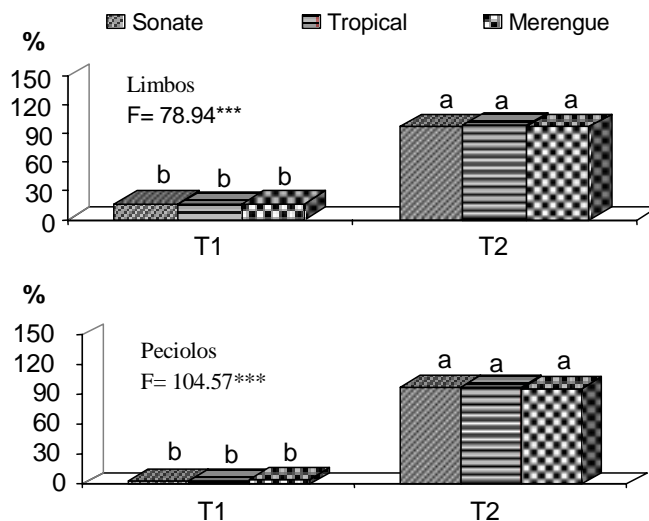


Figura 1. Respuesta de los explantes de limbos y peciolo a los diferentes tratamientos de desinfección

La Tabla I refleja los resultados de las diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento, la respuesta morfológica de las variedades estudiadas y las fases de inducción de la callogénesis, así como el desarrollo de primordios foliares y brotes.

Tabla I. Influencia del BAP y 2,4-D en la respuesta morfológica de las variedades Sonate, Merengue y Tropical

V X M	IFC	IFPF	IFB	NB
V ₃ T ₂	83.10 a	61.10 bc	61.35 a	6.20 e
V ₂ T ₂	68.00 b	63.00 b	35.15 c	3.95 f
V ₃ T ₁	60.00 c	42.10 e	45.00 b	18.00 a
V ₁ T ₂	57.15 d	79.90 a	25.60 e	8.95 d
V ₂ T ₁	49.80 e	48.30 d	30.25 d	10.65 c
V ₁ T ₁	41.05 f	59.90 c	14.10 f	20.00 a
CV	2.28***	6.63***	3.87***	9.35***

V₁=Sonate V₂= Merengue V₃=Tropical

IFC =Índice de formación de callos

IFPF = Índice de formación de primordios foliares

IFB = Índice de formación de brotes

NB = Número de brotes

El análisis realizado evidenció un comportamiento distintivo entre las diferentes variedades y en los dos medios ensayados, encontrándose interacciones altamente significativas en todas las variables evaluadas.

La variedad Sonate fue la de mayor precocidad para el inicio de formación de callos y brotes, cuando se empleó MC-1 y MFB-1, iniciándose la formación del callo a los 41 días; de igual forma, esta variedad obtuvo los mayores rendimientos en cuanto al número de brotes adven

ticios (20 brotes x explante). Las restantes variedades, Tropical y Merengue, también expresaron sus mayores rendimientos en los medios antes descritos, tanto para la fase de calogénesis como para la formación de brotes adventicios donde se lograron 18 y 10 respectivamente. Otros autores se han pronunciado al respecto, señalando que la precocidad en el inicio de la formación del callo, así como el volumen de su masa están muy relacionados con el genotipo (8).

El callo formado en los explantes analizados creció alrededor de todo el corte del explante ubicado en contacto con el medio de cultivo; este callo tuvo una apariencia nodular y compacta, de color crema y con gran capacidad de regeneración.

Los primordios foliares mostraron un color blanco con puntos rojizos en la zona basal, debido a la presencia de antocianina. A partir del subcultivo realizado al MIB, tuvo lugar el desarrollo y crecimiento de brotes múltiples y la elongación de estos cuando se colocaron en condiciones de fotoperíodo, lo que además favoreció la síntesis de clorofila, así como el crecimiento y desarrollo de las hojas. De igual forma, se produjo la emisión de raíces adventicias bien desarrolladas características de la especie; estas raíces tuvieron un tamaño entre 1-2 cm en todas las variedades. Al respecto, diversos protocolos establecidos para la propagación de la especie sugieren el empleo de diferentes auxinas para inducir el desarrollo radical de las vitroplantas; sin embargo, en este trabajo las combinaciones de reguladores del crecimiento propiciaron el desarrollo completo de ellas.

En la variedad Merengue, los brotes alcanzaron un tamaño promedio mayor de 4-5 cm, mientras que en las restantes variedades la talla promedio fue de 2-2.5 cm. Estos resultados superan a algunos informados por otros autores, quienes lograron un promedio de 4.1 brotes por explante en un medio de multiplicación conteniendo BAP 2 mg.L⁻¹ y ANA 0.2 mg.L⁻¹, transferidos después a un medio de elongación con Kinetina 20 mg.L⁻¹ (9).

En este estudio, el tiempo necesario para la obtención de las vitroplantas de Anturio a partir de la siembra de los explantes fue de 3,8 meses para la variedad Sonate,

4.23 y 4.9 meses para las variedades Merengue y Tropical respectivamente. Resulta evidente que los genotipos tuvieron un efecto directo en relación con la respuesta morfogénica lograda, así como también el balance de los reguladores del crecimiento. El efecto combinado del BAP y el 2,4-D ha tenido respuestas contradictorias; sin embargo, en este estudio se logró un buen número de brotes, así como la presencia de raíces y una coloración verde intenso de las hojas, lo cual permitió continuar la etapa siguiente de adaptación a invernadero.

REFERENCIAS

1. Kuenhnlle, A. R. y Sugii, N. Callus induction and plantlet regeneration in tissue culture of Hawaiian Anthuriums. *Hort Science*, 1991, vol. 26, p. 919-921.
2. Montes, S.; Hernández, M. M. y Varela, M. Organogénesis en *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 51-54.
3. Lee, H. Establecimiento de una metodología para la micropropagación de Anthurio (*Anthurium andreaum*), cultivares Midori y Kalapana. [Tesis de Maestría]; Universidad Veracruzana, 1999. 77 p.
4. Montes, S. y López, M. Pectic oligosaccharide: A low cost substitute for plant hormones. *Plant Cell Report*, 2001, vol. 36, no. 2, p. 1-2.
5. Murguía, G. J. El cultivo de los Anturios (*Anthurium andreaum Linden*). Córdoba : Universidad Veracruzana, 1996. 28 p.
6. Montes, S. /et al./ Uso del biorregulador Pectimorf en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 27, no. 3, p. 29-31.
7. Sigarroa, A. Biometría y diseño experimental. La Habana : Edición Pueblo y Educación, 1985. 734 p.
8. Feliza, R. Propagación *in vitro* de *Anthurium Schelechtendalii Kung* (Araceae) especie silvestre del Estado de Veracruz. [Tesis de Maestría]; Universidad Veracruzana, 2000. 90 p.
9. Atta-Alla, H.; McAlister, B. y van Staden, G. *In vitro* culture and establishment of *Anthurium parsivatum*. *S. Afr. J. Bot.*, 1998, vol. 64, no. 5, p. 296-298.

Recibido: 6 de noviembre de 2002

Aceptado: 16 de diciembre de 2003