

USO DEL BIORREGULADOR PECTIMORF EN LA PROPAGACIÓN ACELERADA DEL *Anthurium cubense*

Silvia Montes, J. P. Aldaz, M. Cevallos, J. C. Cabrera y Mirtha López

ABSTRACT. The objective of this study was to analyze the answer of leaf explants from *A. cubense* vitroplants in presence of several doses of growth regulators with the purpose of favoring the indirect organogenesis as an alternative method of reproduction via *in vitro* cultivated seeds. The formation of a white callus mass was observed two months after sowing under darkness; after subculture to a medium containing 4.7 μM Pectimorf, a regeneration rate of up to 17 buds per explant was possible, it suggesting the power of this bioregulator. Likewise, a very favorable behavior of vitroplants was recorded during the phase of acclimatization, achieving more than 90 % vitroplants with a good vegetative vigor.

Key words: *Anthurium cubense*, *in vitro* culture, growth regulators, plant propagation

RESUMEN. El objetivo del presente estudio fue analizar la respuesta de explantes de hojas de vitroplantas de *A. cubense* ante diferentes dosis de reguladores del crecimiento con el fin de favorecer la organogénesis indirecta como alternativa al método de reproducción vía semillas cultivadas *in vitro*. Se observó la formación de una masa callogénica de color blanco transcurridos dos meses a partir de la siembra en condiciones de oscuridad, y después del subcultivo a un medio conteniendo 4,7 μM de Pectimorf, fue posible una tasa de regeneración de hasta 17 brotes por explante, lo que sugiere la potencia de este biorregulador. Así mismo, fue muy favorable el comportamiento de las vitroplantas durante la fase de aclimatización, lográndose más del 90 % de vitroplantas con buen vigor vegetativo.

Palabras clave: *Anthurium cubense*, cultivo *in vitro*, reguladores del crecimiento, propagación de plantas

INTRODUCCIÓN

La revolución tecnológica que se ha operado en la agricultura en los últimos años con la aparición de los plásticos, la química agrícola, la biotecnología y otros múltiples adelantos, han propiciado que el sector de las flores y plantas de ornato se haya favorecido experimentando un desarrollo extraordinario, por lo que se considera uno de los negocios más atractivos debido a las ilimitadas posibilidades que ofrece, permitiendo a los productores mejorar la calidad de las especies ornamentales, la apertura de la información referente al cultivo, propiciando la mejora de las tecnologías de producción (1).

Se ha informado la propagación acelerada del *Anthurium cubense* vía organogénesis (2); esta especie resulta de gran atractivo como planta de ornato por su exótico y bello follaje, constituyendo una opción para suplir la demanda actual de este tipo de planta en diversos sectores del país.

Uno de los elementos claves y más costosos utilizados en la propagación *in vitro* lo constituyen los reguladores del crecimiento, por lo que resulta ventajosa la optimización o sustitución de éstos por biorreguladores de mayor eficiencia y menor costo. Entre los biorreguladores de creciente descubrimiento se encuentran los oligopectatos y oligosacarinas, los cuales se consideran reguladores endógenos del crecimiento de las plantas (3), los que además de interferir en los mecanismos de defensa de la planta, controlan la morfogénesis *in vitro*.

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), se trabaja en la obtención de los oligopectatos a partir de la degradación enzimática de la corteza de los frutos de cítricos (4). No existen antecedentes del empleo de los oligopectatos en los medios de cultivo destinados a la propagación *in vitro* del *Anthurium cubense*, por lo que se diseñó este ensayo para conocer de forma preliminar el efecto del biorregulador en la organogénesis de esta planta así como valorar la posible sustitución de las citoquininas empleadas comúnmente en los medios de cultivo.

Dra.C. Silvia Montes, Investigador Titular (silvia@inca.edu.cu), Dr.C. M. Cevallos, Ingeniero Agrónomo y Mirtha López, Especialista del departamento de Genética y Mejoramiento; Dr.C. J. C. Cabrera, Investigador Agregado del Laboratorio de Oligosacarinas del departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba; J. P. Aldaz, Diplomante de la Universidad Agraria de La Habana (UNAH), Apartado Postal 18-19, San José de las Lajas, la Habana, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA); a tal efecto fueron desarrollados los siguientes experimentos:

Bioensayo I. Siembra de hojas con secciones de peciolo de vitroplantas en medios de cultivo con diferentes dosis de 2,4-D, Kin y BAP.

Se seleccionaron hojas con secciones de peciolo (1.0-1.50 cm) de vitroplantas de 60 días; éstas fueron colocadas con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo, los que se denominaron MA, MB, MC, MD, ME, y MF atendiendo a las diferentes dosis de reguladores del crecimiento utilizadas (Tabla I).

Tabla I. Medios de cultivo empleados en las diferentes etapas del protocolo para organogénesis indirecta en *A. cubense*

Componentes	Unidad medida	MA	MB	MC	MD	ME	MF	MO
M.S.	m.L.L ⁻¹	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Inositol	Mg.L ⁻¹	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
BAP	m.µ.L ⁻¹	0.10	0.40	0.88	0.44	0.30	0.22	-
KIN	m.µ.L ⁻¹	2.32	2.32	2.32	4.64	4.64	4.64	-
2,4-D	m.µ.L ⁻¹	2.27	4.54	9.08	2.27	4.54	9.08	-
Pectimorf	m.µ.L ⁻¹	-	-	-	-	-	-	4.7
Glicina	mg.L ⁻¹	2.00	2.00	-	-	-	-	-
Piridoxina	mg.L ⁻¹	0.50	0.50	-	-	-	-	-
Tiamina	mg.L ⁻¹	0.40	0.40	-	-	-	-	-
Ácido Nicotínico	mg.L ⁻¹	0.50	0.50	-	-	-	-	-
Sacarosa	g.L ⁻¹	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Gelrite	g.L ⁻¹	2.00	2.0	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00

Se emplearon 20 explantes por tratamiento; la incubación se llevó a cabo en la oscuridad y a una temperatura de 27± 1°C hasta el momento en que fue observada alguna respuesta morfogénica. A partir de esta fase se colocó el material bajo un fotoperíodo de 16 h luz y una intensidad luminosa de 1500-2000 lux.

Bioensayo II. Respuesta al subcultivo de callos y brotes adventicios en medio de cultivo con Pectimorf.

Para este bioensayo se emplearon callos de 90 días con pequeños brotes provenientes de los tratamientos MC, MD y ME, los que se escogieron por presentar mejor respuesta a la organogénesis y se subcultivaron en el medio MO, para conocer de forma preliminar su comportamiento ante la dosis de 4.7 µM de Pectimorf. Esta dosis fue escogida en función de los resultados obtenidos en el cultivo de callos embriogénicos de café (5).

Fueron empleados 20 explantes por tratamiento y la fase de incubación se realizó a la luz durante todo el período.

Las evaluaciones realizadas en ambos ensayos fueron: momento a partir del cual se inició la formación de callos, brotes obtenidos en un período de 60 días, presencia de raíces y en el segundo bioensayo se evaluó además la coloración de los brotes y el momento adecuado para el subcultivo de éstos en función del crecimiento y desarrollo obtenidos.

En el montaje de los experimentos se empleó un diseño completamente aleatorizado, las variables expresadas en por ciento se analizaron mediante la prueba de proporciones, el número de brotes y hojas fue transformado a $x+1/2$, se efectuó el Anova y se compararon las medias mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla II se reflejan los resultados obtenidos en relación con la respuesta morfogénica de la fuente de explantes empleada y las dosis de reguladores del crecimiento.

Tabla II. Efecto de los reguladores del crecimiento sobre la organogénesis en hojas de vitroplantas de *A. cubense*

Tratamientos	Número de explantes sembrados	Formación de callos (%)	Número de brotes	Presencia de raíces
MA	20	0.00	-	-
MB	20	0.00	-	-
MC	20	100.00	4.41 b	Si
MD	20	100.00	19.16 a	No
ME	20	0.00	-	-
MF	20	100.00	2.20 b	Si
ES			0.198**	

Letras comunes no difieren significativamente según prueba de Duncan ($\alpha=0.001$).

La formación de callos se inició a los dos meses de establecidos los explantes en el medio y se observó una pérdida gradual del color de las hojas hasta llegar a traslúcidos. El callo comenzó a formarse en la zona comprendida entre la base de la hoja y el peciolo, siendo su color amarillo cremoso y de consistencia friable.

Al tercer mes se evidenció la presencia de brotes adventicios y el tratamiento MD fue el que mejor respondió, por cuanto se obtuvo un promedio de 19,16 brotes por explante con diferencias altamente significativas con los tratamientos MC y MF. Así mismo se pudo constatar

que no se formaron raíces durante el crecimiento en el medio tratamiento MD, todo lo cual sugiere que el balance de los reguladores del crecimiento estudiados favoreció la información de brotes en detrimento de las raíces.

Al analizarse la composición de los reguladores del crecimiento en el medio MD, se observó que el 2,4-D y el BAP estuvieron presentes en concentraciones bajas e intermedias respectivamente (2.27 y 0.44 μM). Por otra parte, otros autores emplearon rangos de 0.886–4.43 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP (6), con el objetivo de obtener brotes múltiples e informaron un promedio de 3:1 brotes por explante; además, señalaron que la dosis que favoreció este proceso fue de 0.886-4.43 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP. En otro estudio se refiere que la dosis de 4.43 μM del propio regulador del crecimiento promovía la formación de brotes adventicios (7).

La respuesta obtenida cuando se efectuó el subcultivo a un medio conteniendo 4.7 $\mu\text{M.L}^{-1}$ del Pectimorf (Tabla III) ubica al tratamiento MD en similar posición a la descrita anteriormente con 19.17 brotes por explante; los restantes tratamientos no difirieron significativamente entre sí, siendo bajo el número de brotes logrados.

Tabla III. Respuesta de los explantes, callos y brotes a la acción del Pectimorf

Tratamientos	Número de brotes	\bar{X} hojas/brote	Altura brotes (cm)	Color verde hojas	Presencia de raíces
MC-O	4.78 b	1.05 a	3.21 a	claro	no
MD-O	19.17 a	1.42 a	1.47 b	oscuro	no
MF-O	2.55 b	0.23 b	3.87 a	oscuro	no
ES	2.31	0.25	0.22	-	-

Letras comunes no difieren significativamente según prueba de Duncan ($\alpha=0.001$)

La altura de los brotes se expresó contrariamente a lo antes señalando, es decir, a mayor altura de los brotes menor número de éstos. En cuanto al número de hojas por brote, se pudo apreciar una tendencia similar, pues las respuestas encontradas en el presente trabajo concuerdan con el estudio efectuado con el *A. schlechtendalii*, especie silvestre del estado de Veracruz de porte similar al *A. cubense* (8).

Estos resultados demuestran el efecto favorable cuando se le adicionó Pectimorf al medio, puesto que transcurridos 45 días fue factible realizar el siguiente subcultivo, debido al crecimiento y desarrollo alcanzado en los tratamientos en estudio; así mismo se evidenció el efecto similar a la citoquinina, por cuanto no se detectó la presencia de raíces.

Se ha definido a los oligopectatos como reguladores endógenos que intervienen en el desarrollo de las plantas, regulan la síntesis y acción de las hormonas y diferentes procesos de organogénesis y crecimiento (3). Se ha señalado que el oligopectato puede funcionar también en las plantas como señales moleculares que regulan el crecimiento, la diferenciación y la adaptación al ambiente (9).

Finalmente en la fase de endurecimiento y aclimatización se pudo observar que en la transferencia de las plantas con tres o cuatro pares de hojas logradas en 60 días, se alcanzó un porcentaje de supervivencia superior al 90 %, además de que las características morfológicas de las plantas regeneradas fueron superiores a las de las plantas donantes y el vigor se expresó en un rápido crecimiento de éstas.

REFERENCIAS

1. Arriaga, N. y Guerrero, J. Efecto de diferentes soluciones preservativas en la vida del florero de tallos de crisantemo bajo dos condiciones ambientales. *Rev. Chapingo*, 1995, vol. 1, p.103.
2. Montes, S., Hernández, M. M. y Varela, M. Organogénesis en *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 51-54.
3. Aldington, S., He Dougall, G. J. y Fry, C. Structure creativity relationship of biologically active oligosaccharides. *Plant Cell and Environment*, 1991, vol.14. p. 625-636.
4. Cabrera, J. C., et al. Highly pure pectic acid and biosensitive oligogalacturonics. En Cell wall meeting. Abstracts and Programme. España: Santiago de Compostela, 1999, 72 p.
5. Santos, J. Efecto de la actividad de un oligopectato en el proceso de callogénesis *in vitro* de *Coffea canephora* var. Robusta. Trabajo de diploma. 1998, 57 p.
6. Pierik, R. L. M. *Anturium andreanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. *Physiol. Plant*, 1976, vol. 37.p. 80-82.
7. Kuchnle, T. Chy. y Chen Sugii Nellic. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andreanum*. University of Hawaii, 1992.
8. Ramón, F. Avances sobre el trabajo de propagación acelerada del *A. schlechtendalii* Kunt. II Taller sobre avances en biotecnología. México.Universidad de Córdoba, Veracruz, 1997, p. 23.
9. Cote, F. y Hahn, M. G. Oligosaccharin structure and signal traduction. *Plant Molecular Biology*, 1984, vol. 26,p. 137-144.

Recibido: 29 de octubre de 1999

Aceptado: 10 de febrero del 2000