

## PROLIFERACIÓN DE BROTES MÚLTIPLES Y ACLIMATACIÓN DE ANTURIO (*Anthurium andraeanum* L.) 'MIDORI' Y 'KALAPANA' CULTIVADOS *IN VITRO*

### MULTIPLE SHOOT PROLIFERATION AND ACCLIMATION OF 'MIDORI' AND 'KALAPANA' ANTHURIUM (*Anthurium andraeanum* L.) CULTURED *IN VITRO*

Hilda E. Lee-Espinosa<sup>1\*</sup>, Juan Guillermo Cruz-Castillo<sup>2</sup> y Benjamín García-Rosas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales, Facultad de Ciencias Biológicas-Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Carr. Peñuela-Amatlán Km. 1, Peñuela, Mpio. de Amatlán de los Reyes, Veracruz. Tel y Fax: 01 (271)716-6410 y 716-6129. Correo electrónico kalapana66@hotmail.com <sup>2</sup> Centro Regional Universitario Oriente, Universidad Autónoma Chapingo. Apdo. Postal 49, C.P. 94100. Huatusco, Veracruz.

\* Autor responsable

#### RESUMEN

Anturio (*Anthurium andraeanum* L.) es una especie ornamental altamente apreciada en el trópico mexicano y a nivel mundial, como flor de especialidad con rendimientos económicos bastante favorables, pero su propagación tradicional es lenta desde la germinación hasta la floración, influenciada por la variación genética y la baja tasa anual de obtención de hijuelos (3 a 4 por año). El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* constituye una alternativa para la producción masiva de plantas, aunada a la garantía de homogeneidad genética cuando se parte de explantes apropiados. En esta investigación, se establecieron las condiciones *in vitro* para la inducción de la proliferación de brotes múltiples en anturio, y se caracterizó la capacidad de respuesta de los cultivares 'Kalapana' y 'Midori'. La mejor brotación en la fase de establecimiento, se encontró al utilizar como explantes a yemas axilares de 2-3 mm de diámetro, que produjeron de cinco a ocho brotes por explante en medio líquido modificado de Murashige y Skoog a 37.5 % (p/v) suplementado con 0.8 mg L<sup>-1</sup> de BAP en agitación rotatoria. Los brotes desarrollaron plántulas, previa elongación del tallo con AG<sub>3</sub> 0.5 mg L<sup>-1</sup>, de donde se extrajeron miniestacas que contenían una yema axilar, que en posición horizontal sobre medio sólido modificado de MS 37.5 % y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, rindieron la mayor proliferación de brotes múltiples por organogénesis directa. La máxima regeneración de brotes en la fase de multiplicación, tanto para 'Midori' (10) como para 'Kalapana' (15), se obtuvo en el medio de cultivo que contenía 0.8 mg L<sup>-1</sup> de BAP solidificado con Phytigel® 2 g L<sup>-1</sup>, a los 75 y 90 días, respectivamente. Los brotes formaron raíces en medio sólido modificado de MS 50% adicionado con ANA 3.0 mg L<sup>-1</sup>. Las plantas transferidas a condiciones de invernadero presentaron 100 % de aclimatación al usar como sustrato al musgo turboso.

**Palabras clave:** *Anthurium andraeanum* L., micropropagación, yemas axilares, miniestacas, anturio.

#### SUMMARY

*Anthurium andraeanum* L. is a highly appreciated ornamental species in the Mexican tropics and in the world, considered as specialty flower with an important economic yield. However, its traditional propagation methods for this species are slow from germination to flowering, with genetic variation and low rates for offsprings production (3-4 per year). *In vitro* tissue culture offers alternative methods for multiple shoot production and for keeping genetic stability when adequate explants are used. In this study we established the best con-

ditions for the *in vitro* multiple shoot proliferation and for characterizing the regenerative capability of *Anthurium andraeanum* L. cvs. 'Kalapana' & 'Midori'. The highest induction of adventitious shoots was obtained by axillary buds of 2-3 mm diameter, which produced 5 to 8 shoots per explant when grown in a medium containing 37.5 % (p/v) of the Murashige and Skoog liquid medium, supplemented with 0.6 mg L<sup>-1</sup> BAP on a rotatory shaker. Shoots developed plantlets after stem elongation in a medium with 0.5 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. Fractions of these shoots containing one axillary bud were placed horizontally on a 37.5 % MS solid media, added with 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP. This treatment promoted a high regenerative capability by direct organogenesis. Maximum shoot regeneration in both cultivars, 'Midori' (10) and 'Kalapana' (15), was obtained on Phytigel® (0.2 %) solidified culture medium supplemented with 0.8 mg L<sup>-1</sup> BAP, 75 and 90 days after culture initiation, respectively. Shoots developed roots on 50 % MS modified solid medium supplemented with 3.0 mg L<sup>-1</sup> NAA. Plantlets transferred to greenhouse conditions produced a 100% acclimation rate, using peat moss as substrate.

**Index words:** *Anthurium andraeanum* L., micropropagation, axillary buds, minicuttings.

Abreviaturas: BAP=6-bencilaminopurina; ANA (NAA)=ácido naltalenacético; AIA (IAA)=ácido indol-3-acético; 2,4-D=ácido 2,4-diclorofenoxiacético; MS=Murashige y Skoog (1962); AG<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>)=ácido giberélico.

#### INTRODUCCIÓN

El anturio (*Anthurium andraeanum* L.) es una de las especies más populares y económicamente importantes de las Aráceas, por sus atractivas espatas a manera de inflorescencias de larga vida postcosecha. Considerada como flor de especialidad, forma parte de un grupo de plantas ornamentales tropicales con mucho potencial comercial en México. Se propaga tradicionalmente por semillas, las cuales no pueden ser almacenadas por periodos de más de 3 a 4 d, y requieren de aproximadamente 3 años desde su polinización hasta la producción comercial. Con este tipo de propagación aparecen individuos con alta variabilidad genética que afectan negativamente su comercialización

(Geier, 1990), pero también se puede propagar mediante vástagos con raíces aéreas provenientes del tallo principal. Sin embargo, la propagación vegetativa propicia la pérdida de individuos por infección de *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* spp. (Murguía, 1992)<sup>1</sup> desde su origen en vivero.

El cultivo *in vitro* de anturio fue desarrollado inicialmente por Pierik *et al.* (1974), y posteriormente ha sido abordado por otros investigadores (Kunisaki, 1977, 1980; Geier, 1982; Teng, 1997). En México, Escudero y Ramírez (1991)<sup>2</sup> estudiaron su micropropagación a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro*, a las que elongaron con ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) y seccionaron en pequeñas estacas que proliferaron en abundantes brotes; sin embargo, este método no garantizó uniformidad genética debido a que se utilizaron embriones sexuales como explantes.

En este trabajo se propone la micropropagación de ápices provenientes de yemas axilares inducidos, como un método alternativo para elevar la producción de material vegetal de calidad élite, ya que la propagación vegetativa *in vitro* tiende a reducir el porcentaje de variabilidad genética, lo cual hasta el momento no se ha logrado en México. Se impulsaría así la producción masiva de los cultivares 'Midori' y 'Kalapana', considerados novedosos para el mercado de anturios en el país. También se propone un sistema de aclimatación para las plántulas obtenidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de Córdoba, Ver., de la Universidad Veracruzana, ubicada en Peñuela, Municipio de Amatlán de los Reyes, Ver., localizado a 817 metros de altitud, 21°21'22" LN y 97°41'08" LW.

El material vegetal utilizado se obtuvo del Lyon *Arboretum* de la Universidad de Hawaii en Manoa, Honolulu, Hawaii, EEUU, como una donación del Dr. Yoneo Saga-wa (Departamento de Horticultura y Recursos Humanos), y consistió en dos cultivares: 'Midori', que presenta espas verde brillantes de 19 y 21 cm de largo y ancho, respectivamente, de espádice amarillo y con posición reclina-da, y 'Kalapana', cuya espata es roja con lóbulos verdes, de 19 cm de largo y ancho, con espádice amarillo-naranja de posición curvada hacia abajo. Se cortaron secciones

rectangulares con dimensiones de 2 cm de largo, 1 cm de ancho y 0.5 cm de grosor de nudos de plantas de ambos cultivares que crecían sobre agrolita en invernadero; éstas se lavaron con agua corriente y jabón líquido durante 35 min, para posteriormente extraer ápices de 0.2 mm de diámetro de cada yema axilar, que fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio 2 % (v/v) durante 35 min.

### Reguladores de crecimiento, concentración de sales y brotación múltiple en ápices

Apices desinfectados de los cultivares 'Kalapana' y 'Midori' fueron establecidos individualmente en tubos de vidrio de 120 x 15 mm, que contenían 4 mL del medio líquido modificado de Murashige y Skoog (1962) complementado con 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, solución de vitaminas (5 ml L<sup>-1</sup>), y sacarosa 2 % (p/v). Los tratamientos evaluados fueron tres concentraciones de sales MS, 37.5, 50 y 100 %; más dos niveles hormonales (0.2 y 0.8 mg L<sup>-1</sup> de BAP) y endospermo de coco 15 % (v/v), aplicados antes de la esterilización de los medios. Esta suplementación nutrimental también fue utilizada en todas las transferencias de tejido vegetal, y hasta la fase de enraizamiento. Los ápices se incubaron en agitación rotatoria (Roto-Torque®) a una velocidad de 2/5 revoluciones cada 5 min. La temperatura en el cuarto de incubación fue de 25 ± 1 °C durante el día, y de 18 °C por la noche, condiciones que fueron mantenidas hasta antes de la aclimatación de los anturios. Se proporcionó luz durante 16 h con una intensidad de 222 μmol de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> mediante lámparas de luz fluorescente tipo blanco-frío de 175 W, hasta antes del enraizamiento. La humedad relativa se redujo a 55 % con un equipo deshumificador.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial y se repitió el experimento tres veces, con un explante por cada tratamiento. Se evaluó el número de brotes obtenidos *in vitro* y se llevó a cabo el análisis de varianza y la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1980) para comparar las medias. Los datos fueron procesados con el paquete de cómputo SAS (SAS, 1982).

### Transferencia de explantes

Los explantes fueron transferidos cinco veces a 4 mL de medio fresco de idéntica composición a la inicial, como sigue: las dos primeras veces, a intervalos de 60 d, y posteriormente tres veces a intervalos de 30 d, para un total de siete meses de cultivo. Los brotes obtenidos de ambos cultivares, cuya longitud oscilaba entre 1 y 3 cm, se transfirieron a medio de cultivo para propiciar el alargamiento de entrenudos. El medio consistió en las sales de MS 37.5 % con tres concentraciones de ácido giberélico: 0.2, 0.5 y

<sup>1</sup> Joaquín Murguía González. Facultad de Ciencias Biológicas Agropecuarias (FCBA) de Córdoba, Ver.

<sup>2</sup> Felipe Escudero Ganem. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

1 mg L<sup>-1</sup>, adicionado en todos los casos con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. El agente gelificante fue Phytigel® (SIGMA®) 2 g L<sup>-1</sup>. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial y se repitió el experimento cuatro veces, con un explante por tratamiento evaluado, donde los cultivares de anturio y las concentraciones de ácido giberélico fueron los efectos principales. La longitud internodal (mm) se sometió a análisis de varianza y a la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1980) para comparar las medias con el paquete SAS (SAS, 1989).

#### Posición de las miniestacas y agentes gelificantes

Después de 60 d en presencia de ácido giberélico los brotes elongados se seccionaron en miniestacas con una yema axilar cada una. Tales miniestacas fueron colocadas en posiciones horizontal y vertical sobre 20 mL de medio MS gelificado con agar-agar (SIGMA®) 7 g L<sup>-1</sup>, o Phytigel® (SIGMA®) 2 g L<sup>-1</sup>. El experimento se repitió 10 veces, con un explante por cada tratamiento. El número de brotes por miniestaca fue evaluado en un diseño completamente al azar con arreglo factorial y se realizó la prueba de medias de Tukey (Steel y Torrie, 1980; SAS, 1982).

#### Enraizamiento

Los brotes que medían 2 cm de longitud fueron transferidos a frascos de vidrio de 5.7 x 7.0 cm que contenían 20 mL del medio de cultivo gelificado con Phytigel® 2 g L<sup>-1</sup>. En esta etapa se estableció el experimento con un diseño completamente al azar en arreglo factorial con ambos cultivares, y con los tratamientos descritos en el Cuadro 1; éstos consistieron en dos concentraciones de sales MS, 50 y 100 %, y dos tipos de auxinas, AIA 0.5 mg L<sup>-1</sup> y ANA 3.0 mg L<sup>-1</sup>. El experimento se repitió cinco veces, con un brote por cada tratamiento.

Cuadro 1. Tipo y nivel de auxina (ANA y AIA, 0.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>) y concentración de sales MS, utilizados para la inducción de crecimiento radical en los cultivares 'Midori' y 'Kalapana'.

Tipo de auxina	Concentración de auxina (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración de sales MS* (%)
ANA	3.0	50
	3.0	100
	0.5	50
	0.5	100
AIA	3.0	50
	3.0	100
	0.5	50
	0.5	100

\*MS = Murashige y Skoog (1962)

Al cabo de dos meses en cultivo se evaluó la longitud de las raíces formadas (mm) con un vernier. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y posterior comparación de medias con la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1980; SAS, 1982).

#### Aclimatación

Las plantas obtenidas se sumergieron durante 5 min en una solución de Benlate® (Metil 1-butilcarbamol-2-bencimidazol carbamato) 0.1 %, y después se impregnaron sus raíces con Radix 5000® (AIB 5000 Mg g<sup>-1</sup>, ANA 200 Mg g<sup>-1</sup>, N-Triclorometilmercapto-4-ciclohexan-1,2 dicarboximida 40 000 Mg g<sup>-1</sup>; vehículo cbp 100 g). Las plantas se colocaron en charolas que contenían sustratos esterilizados con una corriente de vapor de agua durante 10 min. Posteriormente, se llevaron a invernadero con sistema de nebulización donde se aplicó humedad relativa a casi 100 % en las primeras seis semanas, con nebulización de 8 s/10 min durante 6 h diarias. En las dos semanas siguientes se ajustó la humedad relativa a 75 % con humedecimiento de 3 s/10 min durante 4 h diarias; y en las dos siguientes semanas se aplicó 65 % de humedad relativa, con los mismos tiempos que en el periodo anterior, por 2 h diarias; al final de la sexta semana, se suspendió el humedecimiento artificial, y el material vegetal quedó expuesto a la humedad relativa ambiental. Se controló la intensidad lumínica (IL) a 716 μmol de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> dentro del invernadero, mediante una malla sombra de 65 %, y se ajustó el fotoperiodo a 16 h de luz por 8 h de oscuridad, con lámparas de luz fluorescente idénticas a las utilizadas en la incubación. La temperatura ambiental fue de 22 a 27 °C durante el día y de 17 a 20 °C durante la noche.

Para cada uno de los cultivares estudiados se diseñó un experimento completamente al azar que fue repetido cinco veces, con una plántula por tratamiento, en arreglo factorial 3 x 4, donde se evaluó la altura de planta (mm) a los 30, 60 y 90 d, a partir de la fecha de inicio de la aclimatación. Se compararon cuatro tipos de sustrato: musgo turboso (peat moss), agrolita:musgo turboso, tepezil:tierra y agrolita, con todas las mezclas en proporción 1:1.

Se analizaron los datos obtenidos de cada cultivar mediante análisis de varianza y se realizó prueba de comparación de medias de Tukey (Steel y Torrie, 1980; SAS, 1982) para analizar las diferencias en altura de las plantas frente a los sustratos y tiempos estudiados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Efecto de fitohormonas y concentración de sales en la proliferación de brotes

Los ápices de 0.2 mm cultivados en los medios de establecimiento (sales MS a 37.5, 50 y 100 %), dos niveles de BAP (0.2 y 0.8 mg L<sup>-1</sup>), más un tercer tratamiento con endospermo de coco 15 %, con adición en todos los casos de mioinositol 100 mg L<sup>-1</sup>, de solución de vitaminas 5 mL L<sup>-1</sup> y de sacarosa 2 %, iniciaron su crecimiento desde el

primer mes en cultivo y alcanzaron el máximo (7.6 mm) a los seis meses. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre factores principales y en la interacción entre cultivares, sales y fitohormonas. Los mejores tratamientos produjeron 5.3 y 7.6 brotes/explante en los cvs. ‘Kalapana’ y ‘Midori’, respectivamente, con 0.8 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 37.5 % de sales (Cuadro 2)

Kunisaki (1980) logró la inducción de 3.1 brotes por explante con el medio MS a 37.5 % adicionado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP en el cv. ‘Marian Seefurth’; al incrementar la concentración de BAP a 1.0 mg L<sup>-1</sup> se disminuyó a 2.3 el número de brotes. En el presente estudio, la media de proliferación se incrementó en ambos cultivares cuando se aumentó la concentración de BAP. Las medias de brotación más bajas por explante fueron de 0.33 a 1.0, al adicionar agua de coco 15 % y las sales MS 100 % en ‘Midori’, y MS 50 % en ‘Kalapana’.

En todos los casos el medio suplementado con 15 % de agua de coco mostró la brotación más baja. Dix y Van Staden (1982) indican que las citocininas del agua de coco funcionan como inductoras de la división celular. Sin embargo, no siempre se ha logrado promover la división celular usando únicamente agua de coco como regulador de crecimiento (Kunisaki, 1980), lo cual concuerda con los presentes resultados donde se muestra que con agua de coco apenas se logró inducir 1.6 brotes por explante, y que cuando se utilizó BAP en ambos niveles (0.2 y 0.8 mg L<sup>-1</sup>) la inducción de brotes fue siempre superior en las tres concentraciones de sales MS (Cuadro 2).

La baja brotación lograda con agua de coco se compensa con una clara disminución en costos de producción al no utilizar reguladores de crecimiento sintéticos, además de eliminar el obstáculo de imposibilitar la proliferación múltiple en caso de no contar con reguladores de crecimiento sintéticos, con la ventaja adicional de incrementar la homogeneidad genética, debido no tan sólo al tipo de explante utilizado sino también a la fuente natural de citocininas como es el endospermo de coco. La mejor respuesta

en la inducción de brotes múltiples se logró al disminuir las sales MS a 37.5 % en todos los niveles de reguladores de crecimiento utilizados. La concentración de sales nitrogenadas en el medio MS a 100 % se considera alta e inhibe parcialmente la proliferación de brotes múltiples en anturio, pues según Pierik *et al.* (1979) la regeneración *in vitro* de brotes en callos de *Anthurium andreanum* Lind. *in vitro* se estimula al disminuir el nivel de nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) hasta 206 mg L<sup>-1</sup>.

**Alargamiento de entrenudos**

Los brotes cultivados en presencia de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico mostraron desarrollo acelerado y alargamiento de los entrenudos; al cabo de 60 d en cultivo, ‘Kalapana’ alcanzó 11.7 mm y ‘Midori’ 16.7 mm. Con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico ‘Midori’ logró 8.0 mm y ‘Kalapana’ únicamente 2.5 mm (Cuadro 3). Según Thorpe (1981), el ácido giberélico participa en el alargamiento de tejidos vegetales. Ambos cultivares mostraron los valores más bajos cuando la concentración de ácido giberélico fue de 1.0 mg L<sup>-1</sup>.

**Efecto del agente gelificante y la posición de los explantes sobre la brotación**

La interacción resultó significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre agentes gelificantes, posición de las estacas y cultivares, sobre la brotación múltiple. En general, los tratamientos con Phytigel® y miniestacas en posición horizontal sobre el medio de cultivo, fueron mejores que aquéllos sobre agar-agar, en ambos cultivares; ‘Midori’ y ‘Kalapana’ alcanzaron medias de 10.3 y 15.1 brotes/explante a los 75 y 90 d de cultivo *in vitro*, respectivamente (Figura 1). La posición vertical de las miniestacas produjo menos brotes, con medias de 3.3 sobre Phytigel® y de 1.9 en agar-agar, en ambos cultivares. Kunisaki (1980) registró medias de 3.1 brotes por explante en el cultivar ‘Marian Seefurth’ al utilizar secciones de tallo o miniestacas en presencia de agar-agar 0.8 % en posición horizontal.

Cuadro 2. Efecto de los niveles de sales del medio MS, niveles de BAP y agua de coco sobre el número de brotes por explante de los anturios ‘Midori’ y ‘Kalapana’ obtenidos después de seis meses en cultivo *in vitro*.

Cultivares	Concentración de sales MS					
	100%		50%		37.5%	
	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Agua de coco	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Agua de coco	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Agua de coco
Midori	0.2	0.8	0.2	0.8	0.2	0.8
	1.3 d	2.3 bc	2.6 bc	5.3 b	4.3 b	7.6 a
Kalapana	1.6 cd	3.3 bc	1.3 d	2.3 bc	2.3 dc	5.3 b
		1.0 d		0.6 d		1.3 d

DMSH = 1.8164. Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

Cuadro 3. Influencia del ácido giberélico sobre la media de alargamiento internodal (mm) de los anturios 'Kalapana' y 'Midori' cultivados in vitro.

Cultivar	Concentración ácido giberélico		
	0.2 mg L <sup>-1</sup>	0.5 mg L <sup>-1</sup>	1.0 mg L <sup>-1</sup>
Midori	8.0 c	16.7 a	3.0 d
Kalapana	2.5 d	11.5 b	1.5 d

DMSH=2.21

Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

El explante (miniastaca con una yema axilar) colocado en posición horizontal presenta mayor superficie de contacto con el medio y contacto directo con la BAP contenida en el mismo, lo cual pudo haber influido en la mayor producción de brotes que con las estacas colocadas verticalmente. Las miniastacas en posición horizontal tienen un mayor potencial de diferenciación de brotes, y sin formación de callo, ya que en posición vertical produjeron abundante tejido calloso.

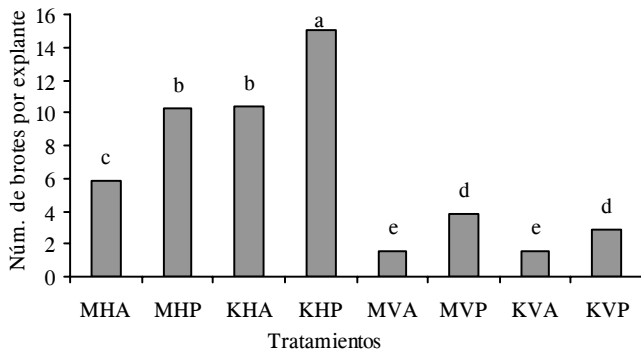


Figura 1. Efecto del agente gelificante (P=Phytigel®, A=agar-agar) y posición del explante (H=Horizontal, V=Vertical) en el número de brotes por explante de los cultivares ('Midori'=M y 'Kalapana'=K). Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). MHA=Midori Horizontal Agar; MHP= Midori Horizontal Phytigel; KHA= Kalapana Horizontal Agar; KHP= Kalapana Horizontal Phytigel; MVA= Midori Vertical Agar; MVP= Midori Vertical Phytigel; KVA=Kalapana Vertical Agar; KVP= Kalapana Vertical Phytigel.

Se obtuvo mayor brotación con Phytigel® a 2.0 g L<sup>-1</sup> que con agar-agar a 7.0 g L<sup>-1</sup>. Diversos autores (Singha, 1982; Von Arnold y Eriksson, 1984; Pasqualetto *et al.*, 1986), han indicado que la concentración y el tipo de agar tienen influencia en la producción de brotes de las plantas micropropagadas, debido al efecto del agente gelificante en la utilización de los reguladores de crecimiento contenidos en el medio de cultivo. Un aumento en la concentración de agar puede dar lugar a descensos en la tasa de proliferación de brotes, lo cual se relaciona con una reducción en la absorción de citocininas y de iones por cambios en el potencial de agua en el medio de cultivo (Bornman y Vogelmann, 1984; Singha *et al.*, 1982).

### Influencia del tipo y concentración de auxinas y de sales inorgánicas en el crecimiento de raíces

También hubo interacción significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre cultivares, tipo y concentración de auxina, y la concentración de sales. El mejor resultado para el enraizamiento *in vitro* en ambos cultivares se logró con 3.0 mg L<sup>-1</sup> de ANA con las sales MS 50 %, en donde el crecimiento de raíces fue de 3.27 mm para 'Midori' y de 2.85 mm para 'Kalapana' (Figura 2); sin embargo, con la concentración de 100 % también se indujo un enraizamiento adecuado, con 2.7 mm para 'Midori' y 2.5 mm para 'Kalapana'.

El tipo y concentración de auxina tienen un papel decisivo en la inducción radical, ya que el AIA en las dos concentraciones utilizadas en combinación con las sales MS, tanto a 50 como a 100 %, redujo el crecimiento de raíces, con medias desde 1.1 hasta 0.4 para el cv 'Midori' y de 0.9 hasta 0.1 mm para el cv 'Kalapana'. Los resultados obtenidos en el presente estudio con respecto al efecto del ANA, coinciden con Tisserat (1984) quien encontró que el ANA fue el mejor inductor de raíces *in vitro* en aráceas, con concentraciones de 0.054 y 0.54  $\mu\text{M}$ , independientemente de la concentración de sales MS. En *Anthurium scherzerianum*, Hamidah *et al.* (1997) lograron inducir gran número de estructuras radicales con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Se podría afirmar entonces que el comportamiento observado está relacionado con el tipo y la concentración de auxina utilizada, ya que hubo menor crecimiento radical con AIA que con ANA, con algunas diferencias entre cultivares.

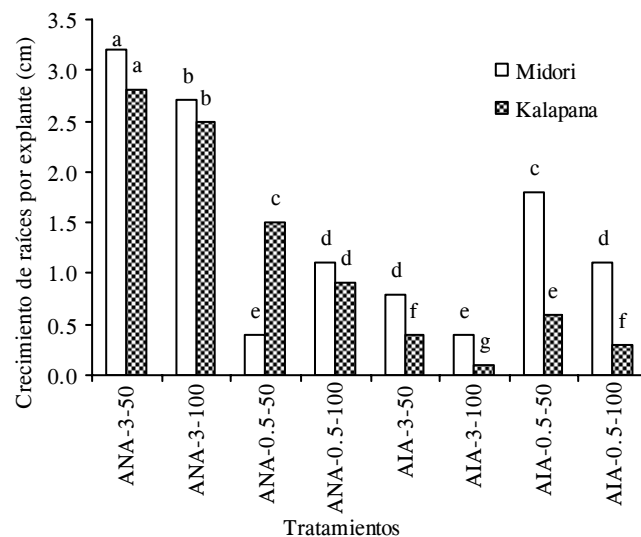


Figura 2. Efecto de la interacción entre cultivares ('Midori' y 'Kalapana'), tipo y niveles de auxina (AIA y ANA, 0.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>) y concentración de sales inorgánicas del medio básico Murashige y Skoog (1962, MS) (50 y 100 %) en el crecimiento de raíces. Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). DMSH<sub>0.05</sub>=0.3

**Sustratos y aclimatación**

En cada uno de los cultivares se detectaron diferencias significativas entre sustratos, en cuanto al crecimiento en altura de planta. Los sustratos musgo turboso y agrolita-musgo turboso promovieron una altura similar durante los primeros 30 d de aclimatación en ‘Kalapana’; sin embargo, a los 60 y 90 d el crecimiento de las plántulas fue superior con musgo turboso (Figura 3). En el cv. ‘Midori’, el musgo turboso resultó ser el mejor sustrato en los tres periodos evaluados (Figura 4).

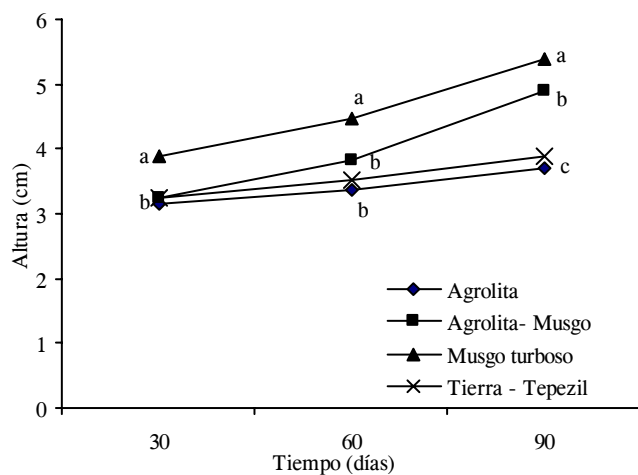


Figura 3. Efecto del sustrato en la altura de anturio cv. ‘Kalapana’, en la fase de aclimatación en invernadero en tres periodos de evaluación (30 d, C.V.=4.35%; 60 d, C.V.=5.43%; 90 d) (C.V.=4.7%). Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMSH<sub>0.05</sub>=0.4915

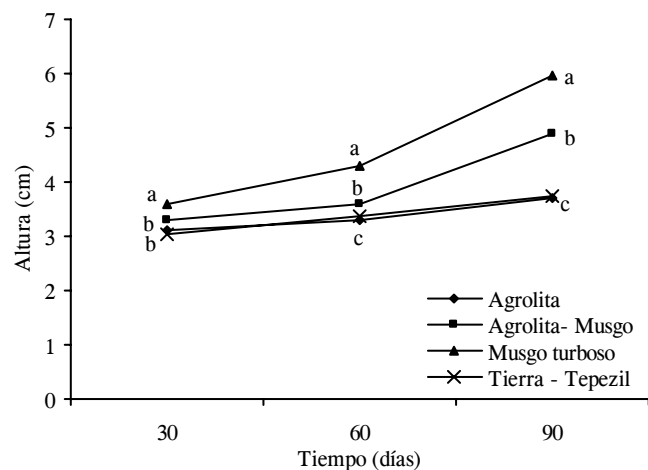


Figura 4. Efecto del sustrato en la altura de anturio cv. ‘Midori’, en la fase de aclimatación en invernadero en tres periodos de evaluación (30 d, C.V. = 2.01%; 60 d, C.V. = 1.58%; 90 d) (C.V. = 0.28%). Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMSH<sub>0.05</sub>=0.2189

Estos resultados concuerdan con Chen *et al.* (1992-1993) quienes aclimataron plantas de anturio en tres clases de bagazo procesado, en comparación con musgo turboso; los autores señalan que el sustrato para el trasplante de plantas enraizadas *in vitro*, fue importante para la sobrevivencia. Los mismos autores afirman que los inhibidores o los cambios dramáticos en el pH del mismo, pueden afectar adversamente el desarrollo de las raíces y el éxito en el trasplante, y reportan al musgo turboso como el mejor sustrato, aunque lo mezclaron con otros materiales que se degradaban menos con el tiempo. En el presente estudio, el musgo turboso presentó los mejores resultados para ambos cultivares, ya que provee de un adecuado soporte a las plantas, pH aceptable y buena amortiguación, y es además lo suficientemente poroso para permitir la aireación y el drenaje.

**CONCLUSIONES**

Los ápices laterales de anturios, ‘Midori’ y ‘Kalapana’, tienen potencial morfogénico para generar brotes múltiples, siempre que se les proporcionen reguladores exógenos de crecimiento.

Específicamente, la bencilaminopurina (BAP) que adicionada al medio MS en una concentración de 0.2 mg L<sup>-1</sup> fue mejor promotor de brotes múltiples.

El ácido giberélico adicionado al medio MS en concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> estimuló el alargamiento de entrenudos hasta en 16.75 mm; ello facilitó la posterior disección de los ápices utilizados en la fase de proliferación múltiple.

En la producción de brotes múltiples resultó mejor la posición horizontal de las miniestacas en el medio gelificado con Phytigel® 0.2%, en ambos cultivares.

En la fase de aclimatación en invernadero, el mejor sustrato fue el musgo turboso (peat moss) para ambos cultivares.

Los ápices de anturio de los dos cultivares son explantes apropiados para lograr la proliferación múltiple *in vitro*, como un método alternativo para la producción masiva de plantas calidad élite, acorde con las necesidades del mercado.

**BIBLIOGRAFÍA**

Bornman C H, T C Vogelmann (1984) Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61:505-512.  
 Chen B, W H Chen, L Yang, G D Wu (1992-1993) Effect of planting media on the growth of *Anthurium* seedlings. Taiwan Sugar Research Institute. Annual Report 1992-1993. pp: 26-27

- Dix L, J Van Staden (1982)** Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1:239-245.
- Geier T (1982)** Morphogenesis and plant regeneration from spadix of *Anthurium scherzerianum* cultured *in vitro*. In: Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Cong. Plant Cell and Tissue Culture. A. Fujiwara, (ed). Research Conference. Tokyo, Japan. pp: 137-138.
- Geier T (1990)** *Anthurium*. In: P V Ammirato, D A Evans, W R Sharp, Y P S Bajaj (eds). Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species. McGraw-Hill, New York. 5:228-252.
- Hamidah M, A Ghani, P Debergh (1997)** Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48:189-193.
- Kunisaki J T (1980)** *In vitro* propagation of *Anthurium andraeanum* Lind. *HortScience* 15:508-509.
- Kunisaki J T (1977)** Tissue culture of tropical ornamental plants. *HortScience* 12:141-142.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Pasqualetto P A, R H Zimmerman, I Fordham (1986)** Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of Gala apple *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hortic. Sc.* III:978-980.
- Pierik R L M, H H M Steegmans, J A Van der Meys (1974)** Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. *Scientia Hortic.* 2:193-198.
- Pierik R L M, P van Leeuwen, G C C M Rigter (1979)** Regeneration of leaf explants of *Anthurium andraeanum* Lind. *in vitro*. *Netherlands J. Agric. Sci.* 27: 221-226.
- SAS (1982)**. SAS User's guide: Statistics, Edición 1982. Cary, NC: SAS Institute, Inc.
- Singha S (1982)** Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. "Almay" and *Pyrus communis* "Seckel". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:657-660.
- Steel R, J H Torrie (1980)** Principles and Procedures of Statistics, a Biometrical Approach. 2nd Ed. McGraw-Hill Book Company. Inc. New York. 633 p.
- Teng W (1997)** Regeneration of *Anthurium* adventitious shoots using liquid or raft culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49:153-156.
- Thorpe T A (1981)** Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York. 379 p.
- Tisserat T (1984)** Plant Cell Culture: A Practical Approach. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. IRL Press Ltd. Eynsham, Oxford, England. 85 p.
- Von Arnold S, T Ericksson (1984)** Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3:257-264.