

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS**

**INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION *IN VITRO* DE PLANTAS,
A PARTIR DE SEGMENTOS DE HOJAS DE ANTURIO (*Anthurium sp.*)**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

HUGO ROBERTO MORALES CHIROY

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRONOMO

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DEL 2002

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**RECTOR****Doctor LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO****JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA****DECANO
SECRETARIO
VOCAL PRIMERO
VOCAL SEGUNDO
VOCAL TERCERO
VOCAL CUARTO
VOCAL QUINTO****Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera
Ing. Agr. Edil René Rodríguez Quezada
Ing. Agr. Walter Estuardo García Tello
Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle
Ing. Agr. Erberto Raúl Alfaro Ortíz
Br. Wener Armando Ochoa Orozco
Br. Axel Aurelio Herrera Pérez**

Guatemala, noviembre del 2002

**Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala**

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**INDUCCIÓN DE CALLO Y REGENERACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS, A PARTIR DE
SEGMENTOS DE HOJA DE ANTURIO (*Anthurium sp.*)**

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de licenciado.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos para su aprobación, me suscribo de ustedes:

Atentamente,

Hugo Roberto Morales Chiroy

AGRADECIMIENTOS

A:

- DIOS:** Por la vida y la sabiduría necesaria para alcanzar mis metas propuestas
- MIS PADRES** Victor Hugo Morales Jiménez
María Ascención de morales
Por todos sus esfuerzos y sacrificios llevados a cabo para mi formación
- MI ESPOSA** Agnes Liliana, Por el gran apoyo brindado en la realización de este trabajo y en mi vida.
- A MI HIJA** Erica Judith Por dar felicidad a mi vida y fuerzas para seguir adelante
- MIS ASESORES** Ing Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume Mena
Ing Agr. Luis Gerardo Molina
Ing. Agr. MSc. Domingo Amador
Por su valioso e incondicional aporte, para que esta investigación se realizara.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLAS (ICTA) Y A TODO EL PERSONAL TECNICO Y ADMINISTRATIVO QUE EN EL LABORA YA QUE EN UNA U OTRA FORMA COLABORARON CON LA INVESTIGACION.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCION	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. MARCO TEORICO	3
3.1 Marco conceptual	3
3.1.1 Las plantas ornamentales	3
3.1.2 El mercado de plantas ornamentales	3
3.1.3 La industria de plantas ornamentales	4
3.1.4 Biotecnología	4
A. Cultivo de tejidos	5
B. Explante	5
3.1.5 Factores que influyen en el cultivo de tejidos	5
A Condiciones ambientales para la incubación	5
3.1.6 El medio de cultivo	5
A. Sales minerales	6
B. Vitaminas	6
3.1.7 Reguladores del crecimiento	6
A. Auxinas	7
B. Efectos biológicos	8
C. Mecanismos de acción	8
3.1.8 Citocininas	9
A. Efectos biológicos	9
B. Mecanismos de acción	10
3.2 Marco referencial	10
3.2.1 El anturio como planta ornamental	10
3.2.2 Variedades del anturio	10
3.2.3 Origen de sus variedades	11
3.2.4 Métodos de comercialización a nivel mundial	11
3.2.5 Morfología	12
3.2.6 Propagación	13
A. Esquejes apicales	13
B. División de plantas	14
C. Acodo aéreo	14
3.2.7 Distribución geográfica del anturio	14
3.2.8 Clasificación taxonómica	14
3.2.9 Aspectos generales de la regeneración <i>in vitro</i>	15
3.2.10 Cultivo de tejidos en anturio	16

A. Micropropagación por formación indirecta de brotes adventicios y embriones somáticos	16
B. Cultivo de brotes	16
C. Brotes adventicios a partir de callo	17
3.2.11 Medios de cultivo	18
A. Reguladores del crecimiento	18
B. Proliferación de brotes	18
C. Enraizamiento	19
3.2.12 Descripción general del anturio	19
A. Reproducción convencional	19
B. Utilización en jardinera	19
C. Epoca de floración	19
D. Clima	20
E. Suelo	20
F. Riego	20
G. Fertilización	20
4. OBJETIVOS	21
5. HIPOTESIS	22
6. MATERIALES Y METODOS	23
6.1 Area experimental	23
6.1.1 Materiales y equipo	23
6.1.2 Medios de cultivo	23
6.1.3 Esterilización de medios	23
6.1.4 Material vegetal	24
A. Desinfección del material vegetal	24
6.1.5 Siembra del explante en el medio de cultivo	24
6.1.6 Incubación de los explantes	24
6.2 Fases de la investigación	25
6.2.1 Fase I: Inducción de callos	25
A. Tratamientos	25
B. Unidad experimental	25
C. Variables de respuesta evaluadas	26
D. Renovación de medio de cultivo	26
E. Manejo del experimento	27
6.2.2 Fase II: Producción de brotes y plantas	27
A. Unidad experimental	27
B. Variables de respuesta evaluadas	28
C. Manejo del experimento	28
7. RESULTADOS Y DISCUSION	29
7.1 Análisis de la información	29
7.2 Fase I	29
7.2.1 Porcentaje de Inducción de callo	29
7.2.2 Número de callos por explantes	33
7.3 Fase II	35
7.3.1 Número de plantas por callo	35
7.3.2 Eficiencia de propagación	37

8. CONCLUSIONES	39
9. RECOMENDACIONES	40
10. BIBLIOGRAFIA	41
11. APENDICE	43

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Medios de cultivo con sus combinaciones de reguladores del crecimiento y los cultivares de anturio evaluados en fase II	26
2. Porcentaje de inducción de callo, en explantes de segmentos de hoja de anturio, para los medios BN 1 y BN 2 y cultivares rojo y rosado de anturio (6 meses)	33
3. Número promedio de callos por explantes para los medios BN 1 y BN 2 y los cultivares rojo y rosado de anturio (6 meses)	34
4. Número de plantas por callo, en los medios BN 1 y BN 2, así como en los cultivares rojo y rosado de anturio	36
5. Eficiencia de propagación en los medios y cultivares de anturio	39

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Respuesta de los explantes de anturio en los medios y combinaciones de reguladores del crecimiento a los 4 meses	31
2. Número promedio de callos por explante en los medios y cultivares de anturio a los 6 meses.	34
3. Número de plantas por callo en los medios BN 1 y BN 2 y en los cultivares de anturio	37

ABREVIATURAS EMPLEADAS

%	Porcentaje
2,4-D	Acido 2,4 diclorofenoxiacético
2iP	2 isopentenil adenina
ADN	Acido desoxirribonucleico
AIA	Acido indol acético
AIB	Acido indol butírico
ANA	Acido naftalenacético
ARN	Acido ribonucleico
BA	Bencil adenina
BAP	Bencil aminopurina
BN	Medio basal de Bourgin y Nitsch
cm	Centímetros
FOB	Free On Board
g	Gramos
g/l	Gramos por litro
ha	Hectáreas
HCl	Hidrociorado
mg/l	Miligramos por litro
ml	Mililitros
mM	Milimoles
mm	Milímetros
MS	Medio de Murashigue y Skoog (1962)
°C	Grados centígrados
Rj	Rojo
Rs	Rosado

RESUMEN

El anturio, pertenece al género *Anthurium* y a la familia Araceae, y es una planta ornamental muy apreciada por la belleza de sus flores y su follaje por lo que en países como Estados Unidos tiene una gran demanda como flor de corte y follaje, para elaboración de arreglos florales. En nuestro país se tiene el problema con su reproducción ya que los métodos convencionales utilizados (división de hijos, semilla, acodos), son muy lentos y no llenan las exigencias del mercado local y mucho menos las del mercado exterior (22), por lo que se hace necesario generar información sobre una metodología que permita su rápida reproducción. La técnica de cultivo de tejidos consiste esencialmente en el aislamiento de un explante, que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones controladas y la interacción de los distintos factores que intervienen en este proceso, determinará la respuesta que se obtenga *in vitro*. En la presente investigación se realizó la “**Inducción de callo y regeneración *in vitro* de plantas, a partir de segmentos de hoja, de anturio (*Anthurium sp.*)**”. Se evaluaron dos medios nutritivos basales (Bourgin y Nitsch y Pierik), dos combinaciones de auxinas y citocininas, en dos cultivares de anturio (rojo y rosado). Con el propósito de contribuir a generar una metodología adecuada para la rápida propagación de esta planta. La auxina utilizada fue el 2,4-D a concentraciones de 0.1 mg/l y 0.08 mg/l, y las citocininas utilizadas fueron el BA a concentración de 1.0 mg/l y la 2iP a concentración de 3.0 mg/l. La investigación se dividió en Fase I: Inducción de callos y Fase II: Producción e brotes y plantas. Las combinaciones de 2,4-D/BA (0.1/0.08), 2,4-D/2iP (0.08/3.0) mg/l para el medio Bourgin y Nitsch, para el medio Pierik así como para cada cultivar, haciendo un total de ocho tratamientos. Se realizó un análisis descriptivo para evaluar la información en base a porcentajes y medias obtenidas con los datos generados. Con base a los resultados se estableció que utilizando combinaciones de auxinas y citocininas es posible obtener respuesta al cultivo de tejidos *in vitro* de la planta anturio, siendo el mejor tratamiento en las dos fases de la investigación el que contaba con el medio Bourgin y Nitsch y las combinaciones de reguladores del crecimiento de 0.1 miligramos por litro de 2,4-D con 1.0 miligramos por litro de BA respectivamente, con el cultivar rosado. El propósito de la investigación fue contribuir a generar una metodología para la propagación más rápida del anturio y superar de esta forma el problema de su lenta propagación y poder así explotarla de forma intensiva.

1. INTRODUCCION

A nivel mundial el anturio es una planta ornamental que se comercializa como flor de corte, globalmente podemos ver que existen tres mayores consumidores en el mercado de flores, estos son Europa, Japón y Estados Unidos. Este mercado es seguido únicamente por la orquídea en el grupo de flores tropicales (4). Holanda es el principal proveedor del mercado Europeo. Hawaii produce para Japón y la Costa Oeste de los Estados Unidos y Canadá. En 1995 Hawaii produjo 11.3 millones de estambres en un área de 102 ha, de los cuales se exportaron 9.1 millones con un valor F.O.B. de 10.4 billones de dólares (22).

En Guatemala, por su ubicación geográfica y su diversidad de zonas ecológicas, es posible producir el anturio para el mercado nacional y de Estados Unidos. Hasta hoy el anturio nos representa empleo y divisas, aunque en poca escala, contando con muy poca de área sembrada en todo el país distribuida en los departamentos de Retalhuleu y Guatemala. Las plantas ornamentales generan para el país más de 30,000 plazas, se calcula que la producción del anturio puede incrementar esta cantidad en un 25 por ciento. (22).

En Guatemala hay áreas potenciales para producir el anturio por lo que las perspectivas son buenas y para ello se debe contar con métodos modernos de propagación ya que el principal problema de la planta de anturio es el período prolongado de reproducción por medio de los métodos de división o separación de hijos, reproducción por medio de semilla. Por esto se propuso el estudio “**Inducción de callo y regeneración *in vitro* de plantas, a partir de segmentos de hoja , de anturio (*Anturium sp.*)**” para proporcionar una alternativa tendiente a mejorar el proceso de establecimiento, haciéndolo más rápido y atractivo para los inversionistas nacionales al tener la posibilidad de producir en forma masiva plantas de alta calidad genética y fitosanitaria.

Utilizando segmentos de hoja de anturio rojo y rosado como explantes para el cultivo *in vitro* se evaluaron los medios Bourgin y Nitsch y Pierik conjuntamente con dos combinaciones de reguladores del crecimiento en cada uno de estos medios, siendo estas 0.1 mg/l 2,4-D más 1.0 mg/l de BA y 0.08 mg/l de 2,4-D más 3.0 mg/l de 2iP.

Con la información generada en esta evaluación se está dando inicio a un proceso de desarrollo de una tecnología eficaz para la propagación eficiente del anturio para que en un futuro no muy lejano se cuente con una metodología óptima para su producción en gran escala.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La planta ornamental anturio presenta considerables dificultades para su propagación por métodos convencionales tales como división o separación de hijos, acodo aéreo, esquejes apicales, por lo que se hace muy necesaria la evaluación de técnicas que puedan usarse como alternativas para su propagación eficiente debido a que este cultivo promete ser un buen generador de ingresos para Guatemala. Así lo demuestran estudios realizados en la Asociación de Exportadores de Productos no Tradicionales (AGEXPRONT) quienes colocan al anturio entre los primeros 10 productos con alto potencial generador de divisas, ya que es posible producirlo en más de 50% del área nacional debido a sus requerimientos climáticos. (22).

La biotecnología como el caso del cultivo de tejidos ofrece ventajas en la propagación de plantas, como la producción de muchos individuos en relativamente poco tiempo y espacio. Sin embargo, es necesario generar información que permita implementar estas técnicas para luego comparar sus ventajas y de ser posible adoptarlas para generar desarrollo en el país. En Guatemala aún no se ha intensificado el uso de la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la producción masiva de anturio por falta de información. Esta investigación pretende contribuir en parte al desarrollo de una metodología para que personas y empresas interesadas en dicha actividad puedan hacer uso de ella.

3. MARCO TEORICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 LAS PLANTAS ORNAMENTALES

El interés por el cultivo de plantas ornamentales, tanto de follaje como de flor, ha tenido un gran incremento en los últimos años, existiendo gran cantidad de viveros que producen diversidad de plantas ornamentales. Así también varias son las personas que se dedican a la producción comercial de flores para surtir el mercado nacional como para la exportación.

Esto se debe en gran parte a que en Guatemala existe el clima adecuado para mantener un producción constante durante todo el año, además la facilidad de transporte en la actualidad permite que estos productos puedan llegar a los centros de consumo en poco tiempo, lo cual ha incentivado a que cada vez se dediquen más áreas al cultivo de ornamentales. (8)

Guatemala es de las muy pocas naciones que entre sus ventajas comparativas puede contar con la belleza de su paisaje, la dulzura de su clima y de su flora. El turismo internacional apenas la ha descubierto, pero sus jóvenes empresarios exportar esa belleza con éxito asombroso.

3.1.2 EL MERCADO DE PLANTAS ORNAMENTALES

Su diversidad abarca plantas y flores con mercados crecientes en Europa, Norte América y el externo Oriente en abierta competencia con Colombia y Costa Rica. (22).

La producción de plantas ornamentales en Guatemala inició en la década de los años cuarenta contando únicamente en ese entonces con 2 especies en un área muy reducida. El sector de plantas ornamentales ha crecido considerablemente, de la forma que, en la actualidad se producen alrededor de 80 especies y aproximadamente 300 variedades. (22).

Entre las especies que se comercializan hacia el exterior así como en el mercado local podemos mencionar cissus, croton, ficus, fitonia, maranta, peperomia, tupidanthus, schefflera, anturio.

Si bien no hay estadísticas formales sobre la exportación de anturio. Samayoa (22) Ingeniero dedicado al rubro en AGEXPRONT indica que existe en Guatemala producción de esta planta para su

exportación como flor de corte y también para venta en el mercado local. Además menciona que el área total en el país dedicado al cultivo del anturio no es mayor a 15 manzanas, pero con los trabajos de investigación actuales y los estudios de mercado que se han realizado, los inversionistas se interesan cada día más por esta especie. Se espera que en un futuro cercano ya se este exportando cantidades considerables de estas flores.

3.1.3 LA INDUSTRIA DE PLANTAS ORNAMENTALES

Significa aproximadamente un cinco por ciento de ingreso de divisas al país. En el rubro agrario, ocupa el quinto lugar entre los productos no tradicionales, lo que se traduce a poco más de cincuenta millones de dólares anuales, y el dinamismo de su crecimiento sobrepasa el veinte por ciento anual. (1).

Las empresas exportadoras están por todo el territorio nacional incorporando técnicas modernas para la producción, generando empleo directo para más de diez mil personas. (1).

3.1.4 BIOTECNOLOGÍA

El cultivo de tejidos vegetales, una alternativa en la propagación de plantas ornamentales, comprende un extenso grupo de tecnologías útiles con amplias y diversas aplicaciones en la industria y el comercio. Podemos definirla entonces como la aplicación de sistemas y organismos biológicos en proceso técnicos industriales, o como cualquier técnica que utilice organismos vivos o partes de estos para producir o modificar productos, mejorar plantas o animales o desarrollar microorganismos para usos específicos. La biotecnología, a través del cultivo de tejidos vegetales, abarca la investigación sobre la propagación vegetal, el desarrollo de nuevas variedades de plantas, la identificación y detección de organismos patógenos y la identificación y producción de productos naturales a partir de células vegetales, por esto la biotecnología en el contexto agrícola, ofrece grandes posibilidades para el mejoramiento de las variedades vegetales principalmente, el aumento en el rendimiento y el desarrollo de nuevos productos. La aplicación de la biotecnología a las plantas a producido un conjunto de herramientas de gran potencial para el beneficio de la agricultura, el manejo racional de los productos no maderables del bosque y el bosque en general (12).

A. CULTIVO DE TEJIDOS

El cultivo de tejidos *in vitro*, consiste en el aislamiento de un explante (Parte separada de un vegetal), que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. La interacción de los distintos factores que intervienen en el cultivo de tejidos determinará las respuestas que se obtengan *in vitro*. El cultivo de tejidos se fundamenta en principios básicos como totipotencialidad celular, propuesta por Haberlandt, 1902, y la hipótesis del balance hormonal, sugerida por Skoog et al., (1957) (12).

B. EXPLANTE

La elección de un explante apropiado, constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, lo cual está determinado principalmente por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. En la relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas (23).

3.1.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CULTIVO *IN VITRO*

En los estudios realizados sobre organogénesis, se ha establecido que el éxito depende de tres factores fundamentales que son: La composición química y las características físicas del medio de cultivo, control del ambiente de cultivo y la elección de explantes. (15).

A. CONDICIONES AMBIENTALES PARA LA INCUBACION

Para propósitos generales se usa en el establecimiento de los cultivos una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo de 16/8 y temperaturas entre 25 y 28 grados centígrados son adecuados.

3.1.6 EL MEDIO DE CULTIVO

La composición del medio de cultivo es un factor determinante para la organogénesis. Los compuestos esenciales son clasificados en cinco grupos: Sales Minerales, Azúcares, Vitaminas, reguladores de crecimiento y otros suplementos no definidos. (16,10). Una vez definido el objetivo

perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir el medio de cultivo el cual debe poseer los componentes nutritivos básicos ya mencionados (23).

A. SALES MINERALES

Las sales utilizadas para suplementar los requerimientos de macro y micronutrientes deben ser consideradas como medio básico, ya que su composición siempre va a permanecer constante. (16)

Murashige y Skoog, fueron capaces de identificar los factores de crecimiento y fuentes de sales minerales determinando el medio más adecuado para obtener organogénesis en tejidos de tabaco cultivados *in vitro*. Obtuvieron callo utilizando cortes de médula de tallo aproximadamente de 2 mm. ; cultivados en el medio determinaron el tipo y las cantidades de sales minerales y compuestos orgánicos ajustados y adaptados a los requerimientos más generales de la mayoría de las especies, sin embargo, en ocasiones se deben hacer modificaciones en alguno de los constituyentes para satisfacer requerimientos específicos. (16). A través de muchas investigaciones se han generado varias mezclas salinas que contienen micronutrientes como fuentes de carbono, hidrógeno, oxígeno, calcio, magnesio y azufre además micronutrientes para una adecuada actividad metabólica siendo los más esenciales: hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto, molibdeno y EDTA. (8).

B. VITAMINAS

Son requeridas en pequeñas cantidades actuando catabólicamente en el metabolismo, la que posee mayor importancia es la tiamina en concentraciones de 0.1 a 0.3 Mg / Litro. (24). Las vitaminas tienen un papel importante dentro del sistema enzimático actuando como coenzimas en los diferentes procesos fisiológicos de la planta. Solamente la tiamina es considerada como esencial, mientras que otras como el ácido nicotínico y la piridoxina son agregadas para estimular procesos específicos; sin embargo se incluyen a manera de prevención.

El ácido cítrico y ascórbico son utilizados como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de los tejidos, agregándose directamente al medio de cultivo o en tratamientos al explante. (16).

3.1.7 REGULADORES DEL CRECIMIENTO

En micropropagación, principalmente se utilizan citocininas y auxinas como reguladores de crecimiento lo más importante es la proporción y cantidad de las mismas.

Funciones:

Para formación de yemas adventicias:

Promoción: Auxina < Citocinina

Inhibición: Auxina > Citocinina

Para formación de raíces adventicias:

Promoción: Auxina < Citocinina

Inhibición: Auxina > Citocinina

Para formación de callo:

Promoción: Auxina < Citocinina

Inhibición: Auxina > Citocinina

A. AUXINAS

Se utilizan para promover la división celular y la diferenciación de raíces. Normalmente se usan los compuestos siguientes como fuente de auxina:

IAA. (ácido indolacético)

NAA. (ácido naftalenacético)

IBA. (ácido indolbutírico)

2,4, -D.. (2,4- ácido 2,4 diclorofenoxiacético), y otros. (7).

Las auxinas son sustancias que se caracterizan principalmente para activar el crecimiento. Tienen en general, un papel feminizante en las flores, es decir que permiten que el número de flores femeninas sea mayor. Se utilizan para:

- Mejorar El cuajado de frutos como el caso de tomate y berenjena.
- Mejorar el desarrollo de los frutos en circunstancias climáticas desfavorables, principalmente por bajas temperaturas.

- Favorece el enraizamiento de esquejes en plantas como clavel y alcachofa. (15).

B. EFECTOS BIOLÓGICOS

Desempeñan una función importante en la expansión de las células de tallos y coleoptilos. Las Auxinas fueron descubiertas, estudiando las curvaturas tropísticas de coleoptilos; al poner a un lado de un coleoptilo decapitado un bloque de agar que contenga alguna auxina, se desplaza hacia abajo estimulando la expansión celular provocando una curvatura negativa que se aleja del bloque. Para que un compuesto sea clasificado como auxina, deberá provocar una curvatura negativa en la avena, como lo hace el IAA.

Los segmentos del coleoptilo o tallo también se alargan al sumergirlos en soluciones de auxina. Las auxinas estimulan también la división celular fomentan el desarrollo de callos, de los que se desprenden crecimientos similares a raíces; de este modo son muy eficaces para iniciar la formación de raíces de varias especies vegetales, esta respuesta fue la base de la primera aplicación práctica en agricultura de sustancias de crecimiento.

Las auxinas pueden iniciar la floración e inducir el amarre de frutos y su desarrollo en algunas especies. La aplicación de auxinas a frutos jóvenes y en desarrollo, desarrollan su tamaño, adelantan también la maduración de algunos frutos como los higos. (25).

C. MECANISMOS DE ACCIÓN

Una de las primeras teorías, de que las auxinas incrementan la plasticidad de las paredes celulares (Heyn, 1931) sigue siendo aún más satisfactoria, aunque es necesario efectuar más trabajo a fin de revelar cuales son los mecanismos exactos que se encuentran implicados.

El aumento de tamaño de las células se produce en dos etapas, primeramente ocurre un aflojamiento de las paredes celulares (presencia de auxinas y oxígeno), seguido de una absorción de agua y una expansión de las paredes. En muchas plantas y partes vegetales, las auxinas provocan y fomentan la síntesis de RNA y proteínas lo cual puede ser un requisito previo al crecimiento provocado por las auxinas.

Pueden requerirse enzimas para causar efectos de suavizar las paredes y expandir las células al aplicar auxinas; se desconoce la naturaleza de esas enzimas, pero la aplicación de auxinas produce cambios en los patrones proteínicos.

3.1.8 CITOCININAS

Son sustancias derivadas de la adenina, caracterizadas por su capacidad de intervenir en la división celular y adicionadas al medio de cultivo promueven además, la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callo y órganos. (7,15).

Como fuente de citocininas se pueden usar los compuestos siguientes:

- BA (6-Benciladenina).
- BAP (6-Bencilaminopurina).
- 2iP (N-Isopentilaminopurina).
- Zeatina (13).

Pueden ser utilizadas para diferentes funciones como:

- Inducir la partenocarpia de algunos frutos.
- Activar la formación de yemas en hojas separadas de la planta.
- Estimular la pérdida de agua por transpiración en algunas plantas.
- Estimular la formación de tubérculos en la patata. (15).

A. EFECTOS BIOLÓGICOS

Dos efectos sorprendentes de las citocininas son provocar la división celular y regular la diferenciación de los tejidos cortados. En concentraciones extremadamente bajas la citocinina llamada Zeatina, provoca la división celular en medula de tabaco y explantaciones de floema de zanahoria, Sin Zeatina el crecimiento de estos dos tejidos es muy ligero. La citocinina es muy necesaria en la iniciación así como en la continuación de la división celular, por ello su disponibilidad ha hecho posible al cultivo de muchos tejidos in vitro al añadir tan solo unos compuestos orgánicos necesarios como Sacarosa, Tiamina, Mio-inositol y auxinas. Además influyen en la diferenciación de los cultivos, interactúan con las auxinas. Además influyen en la diferenciación de los cultivos, interactúan con las auxinas para mostrar expresiones diferentes de crecimiento, por ejemplo SKOOG y MILLER

demonstraron in vitro, que, cambios en el equilibrio entre auxinas y citocininas pueden afectar las expresiones de crecimiento.

Otro efecto de las citocininas es retrasar el envejecimiento de los tejidos vegetales, aparentemente, los efectos antiscenecentes de las citocininas se deben al mantenimiento de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en la oscuridad. (25).

C. MECANISMOS DE ACCION

Hoy se sabe que las citocininas pueden incorporarse a los ácidos nucleicos en las células. (Hall 1968, Kovoorty Klambt 1968); el hecho de que muchas citocininas se hayan aislado a partir de preparados de RNA, indica su relación con los ácidos nucleicos. También se han detectado citocininas en el RNA de transferencia "SERINA" en el hígado, las levaduras y el RNA de escherichia coli (Skoog y Colaboradores 1966). (25).

3.2 MARCO REFERENCIAL

3.2.1 EL ANTURIO COMO PLANTA ORNAMENTAL

Los anturios conforman un grupo grande de plantas cuya característica distintiva más importante como planta ornamental la constituyen sus hojas que son comercializadas como follaje y sus flores de distintos y atractivos colores que en realidad son hojas modificadas; el anturio es cultivado tanto para flor cortada como para maceta, según las tendencias del mercado (5).

La generación del nombre anturio viene de las palabras griegas "Antos y Oura", lo cual significa "Florecimiento de Cola". Puede tomar distintas denominaciones dependiendo donde este se encuentre por ejemplo en Sur América es llamado "Cresta de Gallo", en Holanda "Flor de Laca o Barniz" (2).

3.2.2 VARIEDADES DEL ANTURIO

Puede dividirse en cuatro grupos básicos:

- Variedades de *Anthurium andreanum*
- Híbridos interespecíficos entre las variedades del este y especies enanas

- Híbridos de *Anthurium scherzeranum*
- Anturios de follaje

Anthurium andreanum L. es la especie de mayor valor comercial. El género *Anthurium* es originario de Guatemala y Costa Rica; *Anthurium scherzeranum* L. Planta tropical originaria del norte de los andes en Sur América (sur de Colombia y norte de Ecuador); su sistema radicular es carnoso, raíces de hábito resistente al estrés hídrico (22).

3.2.3 ORIGEN DE LAS VARIEDADES

En 1957 el primer *Anthurium scherzeranum* fue introducido a Europa por el Doctor Karl Van Scherwer. En una expedición en 1876 el *Anthurium andreanum* fue descubierto en el Oeste de los Andes por el francés Botánico Eduard Andre (1840-1911). Se quería reunir todas las plantas posibles incluyendo orquídeas, Bromeliaceae y Araceae, las cuales más tarde las enviaría fuera de Europa. Un sembrador Belga Jean Linden compró el primer ejemplar de *Anthurium andreanum* L. quien lo cultivó y posteriormente comercializó, este fue el principio del cultivo de esa especie. A través del cruzamiento de especies y selección el cultivo más importante de variedades emergió desde estas dos variedades el *Anthurium andreanum* y el *Anthurium scherzeranum* (2).

3.2.4 METODOS Y COMERCIALIZACION DEL ANTURIO A NIVEL MUNDIAL

Los principales mercados para el anturio a nivel mundial se encuentran en Europa, Estados Unidos y Japón, así como en países tropicales. Los mayoristas de algunos países europeos encuentran problemática a esta flor por su alta sensibilidad al frío.

En Colombia "PROEXPORT" entidad que apoya las exportaciones ha identificado buenas oportunidades para el anturio en Estados Unidos, donde existe alta demanda de flores tropicales en los últimos años, esto debido a que el consumidor ahora busca lo exótico diferente al clavel o rosa; junto con las orquídeas *Dendrobium*, los anturios conforman el 90 por ciento de las importaciones de flores tropicales en los Estados Unidos.

La demanda de Estados Unidos está subabastecida, como complemento a la producción que este país desarrolla en el estado de Hawaii, se realizan importaciones de República Dominicana (37%), Trinidad (32%), Jamaica (13%), La Isla de Mauritius (13%), y el 5% restante de otros países. Los cultivos comerciales más grandes y tecnificados probablemente están en Hawaii, donde en 1996 se

reportaron 81 ha en producción, pero hay producción en varios países caribeños; además de los ya mencionados cultivan Anturios para exportación San Vicente, Costa Rica, México y Panamá. Colombia y más recientemente Ecuador, aparecen con pequeñas participaciones en las importaciones de esta flor por parte de Estados Unidos. En el lejano Oriente producen Singapur, Sri Lanka y Tailandia (5).

Holanda es un importante productor de flores de corte bajo invernadero que abastece principalmente el mercado Europeo y que presenta, además, importantes avances en el desarrollo de variedades nuevas, ofreciendo en la actualidad una buena gama de ellas, en distintos colores incluyendo algunos tan exóticos como verde y café, diversas presentaciones y características y con buena resistencia a algunas enfermedades y plagas. Sin embargo, la expansión en Hawaii y Holanda se dificulta por el alto costo de la tierra y la mano de obra; el Sur Oeste asiático por su parte, no dispone de servicio suficiente de carga aérea para exportar eficientemente a los Estados Unidos.

Dada la inversión necesaria para producir anturios y el grado de tecnificación necesaria para llegar a la calidad exigida para exportar, se ha propuesto la conformación de unidades de clasificación y empaque a las cuales pueden acceder pequeños productores. Las importaciones de anturios en los Estados Unidos no han sufrido variación considerable en los últimos cuatro años ni en volumen ni en valor, ubicándose cerca del millón y medio de unidades y un millón de dólares al año.(5).

3.2.5 MORFOLOGIA

Una característica común de la familia Araceae (y asimismo del anturio), es la típica forma o figura de copa, la inflorescencia de la planta, consistente en la espada y la flor (2). La gran variación en inflorescencias es determinada por la figura, color y el tamaño de la espada y su flor verdadera. El pequeño andrógeno de flor está colocado sobre la espada. Andrógeno significa que estas flores tienen ambos sistemas reproductores masculino y femenino, en otras palabras ellos poseen estambres y pistilos. La espada primero produce un florecimiento femenino y después alrededor de un mes, un florecimiento masculino, para prevenir su propia fertilización.

La espada consiste en un largo número de pistilos, existen usualmente cuatro estambres alrededor de cada pistilo. Al existir el cruce de polinización usualmente es tomado el lugar por insectos como abejas y moscas, quienes son tan atraídos por el color y el aroma. Los granos colorados que están colocados sobre la espada después de muchos meses de polinización, contienen una o dos

semillas entre una matriz gelatinosa. La palma o flor colorada atrae a los pájaros, ellos comen las bayas esparciendo de esta forma las semillas (2).

3.2.6 PROPAGACION

El anturio se puede propagar tanto por semilla como por metodos vegetativos. La reproducción por semilla no es muy eficiente para el anturio, ya que es muy lenta y tarda unos 9 meses en madurar y las semillas pierden su poder germinativo en cuestión de días. Esta forma de reproducir el anturio se puede practicar durante todo el año pero requiere de un sustrato de alta porosidad como el musgo o la hierba (Peat Moss), temperaturas entre 20 y 25 °C y humedad relativa entre 90 a 95%, la germinación es lenta y los primeros brotes se observan a los 2 meses después de sembrar. Además, cabe mencionar que la reproducción por semilla implica una variabilidad genética, es decir, los hijos de una planta madre presentarán características diferentes a esta y diferentes entre sí, reduciéndose la uniformidad de una variedad dada en lo que se refiere, por ejemplo, a su productividad, tamaño de flor, color de la flor, cantidad de flores por planta, tamaño de la planta y otras (2,5).

Dentro de la reproducción vegetativa que es otro método de multiplicación del anturio se encuentran los métodos siguientes:

- ESQUEJES APICALES
- DIVISIÓN DE PLANTAS
- ACODO AEREO
- CULTIVO DE TEJIDOS

La clonación vegetativa es la técnica más adecuada como alternativa.

A. ESQUEJES APICALES

Consiste en remover lo que se llama popularmente la copa de la planta, la cual no debe tener flores, deben cosecharse con equipo desinfectado y sembrarse a mediana profundidad.

B. DIVISION DE LAS PLANTAS

Util método de reproducción, especialmente en el caso de *A. scherzeranum*, consiste en dividir las plantas, separando estacas o rizomas de 5 a 7 centímetros o comúnmente denominados hijuelos que brotan de las plantas madres.

C. ACODO AEREO

Es la inducción del crecimiento de raíces aéreas y tallos laterales a partir de plantas bien desarrolladas que se han levantado del suelo y tienen las raíces expuestas. Se debe envolver la base de una cepa u otro medio con alto contenido de materia orgánica, de manera que cuando las raíces aéreas comienzan a desarrollarse en el medio propagativo, se puede proceder a separar el acodo que será en realidad una planta enraizada.

3.2.7 DISTRIBUCION GEOGRAFICA DEL ANTURIO

De acuerdo con el taxonomista Engler, quien vivió alrededor del año 1900, habiendo coleccionado y descrito un gran número de variedades. Las variedades de anturio son comunes a través de Centro y Sur América, el límite del área de distribución termina cerca de México en la ciudad de Orizaba. Las variedades de anturio pueden ser encontradas en áreas muy diversas y con amplias diferencias climatológicas. Desde las regiones secas del oeste mexicano hasta los bosques lluviosos tropicales de América del Sur.

La altitud está relacionada con las especies, el rango va desde el nivel del mar hasta una altura de 3,000 metros sobre el nivel del mar. El mayor desarrollo de los géneros ha tomado lugar en Los Andes, Centro y Sur América entre 10 grados de longitud y 5 grados de latitud con una temperatura mínima de 10 °C (2).

3.2.8 CLASIFICACION TAXONÓMICA

El anturio pertenece a la compleja familia Araceae la cual tiene ocho subclasificaciones. La sub-familia de los Pathoidae separa al anturio en seis ordenes (Tribus). El anturio pertenece a la subfamilia Pathoidae y al orden arales. Dentro de la familia Araceae, el anturio es uno de los géneros más grandes conteniendo aproximadamente 900 variedades incluyendo las más conocidas como lo son el *A. andreanum* y *A. scherzeranum*. (2).

Taxonomía del Anturio:

REINO:	Plantae
SUBREINO:	Embryobionta
DIVISION:	Magnoliophyta
CLASE:	Liliopsida
SUBCLASE:	Arecidae
ORDEN:	Arales
FAMILIA:	Araceae
GENERO:	<i>Anthurium</i>
ESPECIE:	<i>Anthurium sp.</i>

3.2.9 ASPECTOS GENERALES DE LA REGENERACION *IN VITRO*

Si hablamos de regeneración, se tienen que considerar algunos aspectos fundamentales relacionados con la teoría celular referidos principalmente a la totipotencialidad de las células vegetales, la organización estructural de cada órgano o tejido en particular, es un efecto de la información genética contenida en cada célula del tejido y cada una de esas células es capaz de expresar su potencial genético para regenerar una planta completa; basándose en esta característica principalmente los investigadores consideraban que si lograban aislar una célula o grupos de ellas, se podían desarrollar metodologías *in vitro* manipulando adecuadamente su ambiente. Tales manipulaciones serían causar un estímulo para obtener la diferenciación celular, así, la propagación *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales consiste en el cultivo de las partes de una planta que pueden ser células, protoplastos o tejidos especializados (explantes), bajo condiciones asépticas en un medio nutritivo y ambiente controlado (16).

Gottlieb Haberlandt; en 1902, fue la primera persona que aisló e intentó cultivar células vegetales; sin embargo fracasó, concluyendo que probablemente se requerirían de "Enzimas de Crecimiento", que estimularan la división celular.

Trisserat y Hussey consideran que la regeneración a través de la organogénesis puede lograrse por medio de los siguientes modelos:

- Producción de órganos adventicios originados de callo derivado éste a su vez del explante.

-

- Emergencia de órganos adventicios directamente del explante sin la intervención de la fase de callo.
- Producción de plántulas a partir del desarrollo de yemas axilares.

Es importante diferenciar estos modelos porque se puede utilizar uno incorrecto y afectaría la uniformidad genética de las plantas producidas cuando esto no se desea. La uniformidad genética se conserva solamente cuando la regeneración se realiza por medio del desarrollo de yemas axilares o brotes adventicios directamente del explante; cuando la formación de brotes es inducida a partir de tejido calloso, la probabilidad de que ocurran cambios genéticos es muy alta, aumentando cada vez más con el tiempo y subcultivos a que sea sometido el mismo (16).

3.2.10 CULTIVO DE TEJIDOS EN ANTURIO

A. Micropropagación por formación indirecta de brotes adventicios y embriones somáticos

Ocurre a través de una proliferación celular que conlleva a la formación de callo, a partir de un explante adecuado por ejemplo: segmento de hoja, tejido de almacenamiento, ápices, embriones de semilla o inflorescencias inmaduras. Los callos son obtenidos cuando el explante es sembrado en un medio de cultivo conteniendo relativamente altos niveles de auxina o sin citocinina. Los callos pueden ser multiplicados y un cultivo de suspensión puede ser obtenido a través del sub-cultivo de callos en un medio líquido de la misma composición. Cuando las auxinas son reducidas o eliminadas del medio, se pueden formar brotes o embriones. Este método de propagación a generado altos índices de multiplicación, sin embargo, su inconveniente es la baja capacidad de formar plantas y más importante, la inestabilidad genética de las plantas regeneradas (Barbier and Dulieu, 1983) a pesar de estos problemas hay algunos reportes que indican la habilidad de establecer plantulas estables regeneradas a partir de cultivos de callos, por ejemplo: en crisantemo (Earle y Langhans, 1974.) (23).

B. Cultivo de brotes

En 1980, Kunisaki describió un método para el cultivo de brotes de Anthurium (6). En un inicio, las yemas vegetativas se cultivaron en un medio líquido conteniendo sales MS, 0.4 mg/l de tiamina HCl, 0.5 mg/l de ácido nicotínico y pyridoxina HCl, 15% de agua de coco y 2% de sacarosa. Los brotes fueron multiplicados en el mismo medio solidificado con agar (sin agua de coco) y 0.2 mg/l de BAP. Se produjeron múltiples brotes de secciones de tallo con dos nudos. Geier citado en (6), en

1990, encontró que los brotes se forman mediante el cultivo de brotes provienen tanto de yemas axilares como adventicias.

El cultivo de brotes tiene la desventaja de que solamente un pequeño número de yemas puede extraerse de una planta madre, los explantes son muy susceptibles a contaminarse y la planta madre es virtualmente destruida durante la disección.

C. Brotes adventicios a partir de callo

A pesar de que existe la posibilidad de utilizar el cultivo de brotes, el anturio se propaga con frecuencia con procedimientos que recaen, al menos en parte, en la producción de brotes adventicios de cultivo de callo. Este género es, por lo tanto, uno de los pocos en los cuales se emplea la regeneración indirecta de brotes.

Pierik y colaboradores (19), fueron los primeros en desarrollar un método de propagación de anturio a través de cultivo de callo. Se puede obtener callo capaz de producir brotes adventicios de una variedad de tejidos incluyendo el espádice, la espada, el pedúnculo y los peciolos y la lámina de hojas jóvenes.

Las secciones de hojas jóvenes son ahora las que se usan con más frecuencia en la micropropagación de anturio. En la mayoría de genotipos, estos explantes forman callo capaz de producir brotes adventicios cuando se incuban en la oscuridad a 25°C en un medio de cultivo adecuado. Los brotes adventicios etiolados surgen espontáneamente del callo primario, el cual puede ser subdividido y subcultivado de nuevo en la oscuridad para obtener más brotes. Si el callo se traslada a condiciones de luz (40-50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), se producen brotes de apariencia normal. El callo puede también subdividirse en esta fase para una posterior proliferación de brotes. Existen genotipos que no responden en un medio estándar, ya sea que no produzcan callo o que el callo producido no de origen a brotes adventicios (6).

Se ha dicho que la variación en las poblaciones micropropagadas de anturio no es alta, a pesar de que son el resultado de la formación indirecta de brotes. Para asegurar que la uniformidad de las plantas se mantenga dentro de límites aceptables, Leffring y colaboradores (14), en 1976, sugirieron que los brotes adventicios producidos por cultivo de callo sean subcultivados en un medio que permita el desarrollo de brotes axilares. Esta combinación de regeneración indirecta de brotes adventicios

seguida por cultivo de brotes parece ser el método de micropropagación más ampliamente usado en la práctica comercial.

3.2.11 Medios de cultivo

Geier citado en (6), encontró satisfactorio el medio de Bourgin y Nitsch para la formación de callo y multiplicación de brotes en las especies *A. andreanum* y *A. scherzeranum*. En este medio, el nitrato de amonio se redujo a 200 mg/l (2.5 mM) y se aumentó la sacarosa con 20 gramos por litro. Esta reducción en la concentración del ion NH_4^+ ayudo en la producción de callo y regeneración de brotes en un mayor rango de genotipo.

Otros investigadores como Pierik y Leffring (19,14) han utilizado sales de MS (17) a la mitad de su concentración normal, vitaminas MS normales y entre 20-40 gramos porlitro de glucosa para el cultivo de callo.

A. Reguladores del crecimiento

Los reguladores de crecimiento agregados a estos medios para inducir la formación de callo seguido por la regeneración de brotes en otros trabajos realizados han sido:

1 mg/l de 2,4-D más 1 mg/l de BAP

0.08 mg/l de 2,4-D más 3 mg/l de 2iP (6)

Estas combinaciones fueron utilizadas para la inducción de callos por Geier (1986) y por Leffring y Soede (1979 a,b), utilizando los medios Bourgin y Nitsch y Pierik con ambas combinaciones de reguladores del crecimiento.

B. Proliferación de brotes

La proliferación de brotes axilares y adventicios de los brotes separados del cultivo de callo, puede efectuarse en el medio de Bourgin y Nitsch con 20 g/l de sucrosa citado en (6), o en un medio que contenga la mitad de la concentración normal de sales MS (con solo 200 mg/l de NH_4NO_3), vitaminas MS y 40 g/l de glucosa. Esta fase de la propagación es idéntica a la técnica de Kunisaki descrita arriba, en la que utilizó medio MS para el cultivo de brotes. Puede llevarse a cabo en medio líquido o sólido.

A pesar de que la proliferación de brotes es inducida con 0.2-0.5 mg/l de BAP, la capacidad subsecuente de los brotes para formar raíces decrece si se continúa subcultivando. Por lo tanto puede ser preferible utilizar hasta 3 mg/l de cinetina para inducir la proliferación de brotes (14).

C.Enraizamiento

La sobrevivencia de plántulas y brotes generalmente ha sido baja cuando se ha intentado enraizarlos *ex vitro*. Generalmente se enraizan *in vitro* utilizando un medio diluido sin reguladores del crecimiento o uno conteniendo baja concentración de auxina (6).

3.2.12 Descripción general del anturio

Planta ornamental de crecimiento perenne, de la familia de las Aráceas y originaria de las regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica, recibiendo los nombres comunes de “Flor flamenco” o “lirio Flamenco”. Alcanza de 40 a 70 centímetros de altura, con tallo herbáceo, hojas largas puntiagudas en forma de corazón, algo gruesas, color verde oscuro. Produce sus flores en forma de corazón, de consistencia dura, en colores que pueden ser rojo, blanco o rosado, con una bráctea roja o amarilla en el centro, sostenida por un largo pedúnculo, consistente y rígido .

A. Reproducción Convencional

Asexual, por división de las macollas. Esta operación puede hacerse en los meses de Febrero a Abril, preferentemente, pero podría hacerse en otras épocas del año. Al dividir la planta debe procurarse que cada sección tenga dos o más tallos o hijos.

B. Utilización en Jardinería

Como planta de jardín exterior o interior, sembrada directamente en el suelo o en macetas de 20 a 30 cms de diámetro, en ambiente luminoso pero no de sol directo, creciendo bien en lugares de semisombra. Directamente en el suelo sembrar una planta a cada 30 centímetros .

C. Epoca de Floración

El anturio florea la mayor parte del año.

D. Clima

Cálido, templado y frío, alturas comprendidas entre los 500 a 9,000 pies sobre el nivel del mar, con temperatura ambiental entre los 15 y 28 °C y. alta humedad ambiental.

E. Suelo

Franco, con buen contenido de materia orgánica y broza de montaña, bien drenado y un pH de 5.0 a 6.0. Utilizar la mezcla de tierra recomendada para Azalea .

F. Riego

Dos a tres veces por semana. Regar las hojas con un spray fino para mantener la humedad ambiental, suspendiendo cuando la planta está en floración.

G. Fertilización

Plantas en crecimiento hasta de 20 centímetros de altura, aplicar un cuarto de onza de fertilizante 15-15-15 ó BLAUKORN 12-12-17 mas un cuarto de onza de Sulfato de amonio por planta, separado de la base de los tallos 10 centímetros alrededor y enterrado 4 centímetros. A los 90 días después repetir la misma cantidad de Blaukorn o en sustitución 13-13-20 ó 14-14-29. Dos veces al año aplicar un cuarto de onza de OSMOCOTE 18-6-12 por planta, distribuido en la misma forma. En plantas adultas de un año en adelante efectuar las siguientes aplicaciones: En abril un cuarto de onza de BLAUKORN 12-12-17 ó 14-14-29 más un medio de onza de sulfato de amonio, por planta, a 12 centímetros de los tallos y enterrado 6 centímetros. En julio y octubre aplicar un medio de onza de 15-15-15 por planta y en enero un medio de onza de urea. Dos veces al año aplicar un cuarto de onza de OSMOCOTE 18-6-12 ó 14-14-14 (8)

4. OBJETIVOS

GENERAL

Contribuir al desarrollo de una metodología para la propagación *in vitro* del anturio.

ESPECIFICOS

1. Inducir la producción de callo a partir de segmentos de hoja de anturio en los cultivares rojo y rosado.
2. De los callos producidos regenerar plantas, en los cultivares rojo y rosado.
3. Determinar la eficiencia de propagación para cada medio de cultivo y cultivar.

5 HIPOTESIS

1. Al menos en uno de los cultivares de anturio, rojo o rosado, será posible la inducción de callo a partir de segmentos de hoja.
2. Al menos en uno de los cultivares, rojo o rosado, se regenerarán plantas a partir de los callos formados, provenientes de segmentos de hoja de anturio.
3. Cada medio de cultivo y cultivar tiene una determinada eficiencia de propagación.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Area Experimental

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), ubicado en el kilómetro 21.5 carretera a Amatlán, Bárcena, Villa Nueva.

6.1.1 Materiales y Equipo

- | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------|
| - Agua destilada | - Tubos de cultivo | - Hipoclorito de sodio |
| - Agitadores | - Papel aluminio | - Soluciones madre |
| - Alcohol | - Pinzas | - Frascos de vidrio |
| - Bisturís | - Jabón Tween 20 | - Tijeras de podar |
| - Autoclave | - Potenciómetro | - Marcadores |
| - Balanza analítica | - Reguladores de crecimiento | - Mecheros |
| - Beackers | - Toallas de algodón | - Reactivos |
| - Agua desmineralizada | - Atomizadores | |
| - Estufa con agitación magnética. | - Encendedores | |
| - Cámara de flujo laminar | - Cinta adhesiva | |

6.1.2 Medios de Cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo y dos combinaciones de reguladores del crecimiento en la fase de iniciación o formación de callo siendo estos medios: Bourgin y Nitsch (1967) H, Pierik y Steegmans (1976) a y las combinaciones de reguladores 0.1 mg/l 2,4-D+1mg/l BA y 0.08 mg/l 2,4-D+3 mg/l 2iP. Cada combinación de reguladores se utilizó con cada uno de los medios. La elaboración de los medios se muestra en el anexo.

6.1.3 Esterilización de Medios

Los medios fueron servidos en tubos de cultivo con 10 ml de medio en cada uno de ellos, luego fueron esterilizados durante 20 minutos a una temperatura de 120 grados centígrados y 15 libras por pulgada cuadrada de presión.

6.1.4 Material Vegetal

El material utilizado para la fase de iniciación estuvo constituido por hojas jóvenes recolectadas directamente de plantas de anturio de variedades rojo y rosado, las plantas se encontraban en camas de concreto utilizando como sustrato arena blanca y bajo la cobertura de una tela plástica o sarán con un 73% de sombra proyectada sobre estas.

A. Desinfección del material Vegetal

Las hojas recolectadas fueron lavadas con jabón en recipientes separados, luego se cortaron segmentos de hoja de 6x8 cm aproximadamente, a las cuales se les lavó de nuevo. En seguida, estos cortes, que incluían en ellos la nervadura central de la hoja, fueron introducidos en alcohol al 70% durante 30 segundos, posteriormente se trasladaron a un recipiente de vidrio que contenía hipoclorito de sodio al 1% con jabón tween 20, durante 15 minutos, y se trasladaron al interior de la cámara de flujo laminar. Posteriormente y antes de realizar la siembra del explante en el medio de cultivo fueron practicados tres lavados seguidos a cada segmento en agua destilada y esterilizada para luego seccionarlos en cortes aún más pequeños que fueron los explantes utilizados para el estudio quedando de un tamaño aproximado de 0.8 x 0.5 cm.

6.1.5 Siembra del Explante en el Medio de cultivo

La siembra fue realizada en la cámara de flujo laminar, la cual fue desinfectada con anterioridad utilizando alcohol al 70% aplicado con un atomizador y distribuido por todas las superficies de esta con una toalla para eliminar los residuos. Para la manipulación de los explantes se utilizaron pinzas y bisturís, los cuales eran flameados en un mechero cada vez que se realizaba la siembra de un explante. El explante fue colocado dentro del medio introduciéndolo en este, en una forma vertical y perpendicularmente al medio dejándolo sumergido hasta la mitad.

6.1.6 Incubación de los Explantes

Posteriormente a la siembra los tubos fueron sellados con parafilm y trasladados al cuarto de crecimiento para quedar en condiciones de oscuridad y a una temperatura media de 25 grados centígrados para la etapa de iniciación.

6.2 Fases de la Investigación

La investigación se desarrolló en las fases siguientes: Fase I, que consistió en la inducción de callo y posteriormente la renovación de medio al tercer mes a los explantes con callo inducido. Fase II, que tenía como finalidad utilizar un medio específico para que los callos producidos produjeran brotes o plantas enraizadas aproximadamente en el octavo mes.

6.2.1 Fase I: Inducción de callos

La etapa de iniciación consistió en la siembra de los explantes, constituidos por segmentos de hoja, en los diferentes medios de cultivo con sus respectivas combinaciones de reguladores en los tubos de cultivo conteniendo 10 ml de medio de cultivo. Esta fase se desarrolló en condiciones de completa oscuridad y a 25 grados centígrados dentro del cuarto de crecimiento.

A. Tratamientos

Los tratamientos evaluados consistieron en las combinaciones de dos concentraciones de reguladores del crecimiento adicionados a dos medios de crecimiento los cuales fueron evaluados para dos cultivares de anturio (rojo y rosado). Se tomaron los medios de crecimiento con sus combinaciones de reguladores como cuatro tratamientos en total. Se tomaron los medios de cultivo (2), las combinaciones de reguladores del crecimiento (2), y los cultivares de anturio (2), para un total de ocho tratamientos.

B. Unidad Experimental

Estuvo formada por un tubo de cultivo con 10 ml de medio de cultivo y un explante (segmento de hoja), utilizándose 20 repeticiones por tratamiento obteniéndose un total de 160 unidades experimentales.

Cuadro 1. Medios de cultivo con sus combinaciones de reguladores del crecimiento y los cultivares de anturio que servirán para evaluarlos en la fase I de la investigación.

Medios de Cultivo	Acido 2,4 diclorofenoxiacético (mg/l)	Bencil adenina (mg/l)	2 isopentil aminopurina (mg/l)	Cultivares
Bourgin y Nitsch 1 BN 1	0.1	1.0	0.0	Rojo
Bourgin y Nitsch 2 BN 2	0.08	0.0	3.0	Rojo
Pierik 1 P1	0.1	1.0	0.0	Rojo
Pierik 2 P2	0.08	0.0	3.0	Rojo
Bourgin y Nitsch 1 BN 1	0.1	1.0	0.0	Rosado
Bourgin y Nitsch 2 BN 2	0.08	0.0	3.0	Rosado
Pierik 1 P1	0.1	1.0	0.0	Rosado
Pierik 2 P2	0.08	0.0	3.0	Rosado

C. Variables de Respuesta Evaluadas

Porcentaje de inducción de callo:

Se calculó el número de explantes que formaron callo dividido por el número total de explantes multiplicado por 100.

Número de callos por explante:

Se calculó dividiendo el número de callos sembrados entre el número de repeticiones sembradas (segmentos de hoja).

D. Renovación del medio de cultivo

Este procedimiento fue realizado en el tercer mes de haber iniciado el estudio y se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70%, instrumental esterilizado (pinzas y bisturís), mechero para flamear los tubos al momento de traslado y consistió en tomar con una pinza el explante (segmento de hoja) del tubo con medio original y trasladarlo a un tubo que

contenía medio fresco de cultivo con su respectiva combinación de reguladores del crecimiento, con el objetivo de que la masa callosa ya formada tuviera a su disposición todos los nutrientes necesarios para continuar su crecimiento, luego se sellaron todos los tubos nuevos ya conteniendo los explantes con callo y fueron trasladados al mismo cuarto de crecimiento bajo condiciones de oscuridad a 25 grados centígrados. Para esta renovación de medio se utilizaron los medios originales o de iniciación.

E. Manejo del Experimento

Se realizó la siembra de segmentos de hoja de 0.8 X 0.5 cm en los dos medios, las dos combinaciones de reguladores del crecimiento y las dos variedades de anturio (rojo y rosado) en tubos de cultivo conteniendo 10 ml de medio, depositando en cada tubo un explante. Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones en condiciones de total oscuridad y condiciones homogéneas de temperatura para estimular la formación de callo, luego de esta etapa se realizó la renovación de medio de los explantes a nuevos tubos conteniendo los mismos medios de cultivo, este cambio de medio fue realizado en la cámara de flujo laminar con todo el instrumental esterilizado, mechero para flamear los tubos para nuevamente colocarlos en el cuarto de crecimiento bajo condiciones de oscuridad y temperatura de 25 grados centígrados. Esta actividad se realizó en el tercer mes después de iniciado el estudio.

6.2.2 Fase II: Producción de brotes y plantas

Esta fase consistió esencialmente en tomar todos los callos bien desarrollados de la fase I los cuales habían permanecido hasta ese momento en completa oscuridad y a 25 grados centígrados ya que algunos presentaban cierto abultamiento como de una yema axilar madura, con coloración rosado pálido en la punta lo cual indicó que era momento de dejar que los brotes se desarrollaran, por lo que se elaboró el medio Bourgin y Nitsch conteniendo una concentración de 0.2 mg/l de BA solamente (Su elaboración en anexo), especialmente dirigido al desarrollo de estos brotes. Esta actividad se realizó a los seis meses de haber iniciado la investigación. Los callos que poseían más de un inicio de brote fueron separados y colocados en tubos individuales.

A. Unidad Experimental

Una unidad experimental estuvo constituida por un callo en un tubo de cultivo con 10 ml de medio de crecimiento para desarrollo de brotes.

B. Variables de Respuesta Evaluadas

Número de plantas por callo:

Se calculó realizando un conteo de todas las plantas formadas dividiendo este valor entre el número de callos sembrados, multiplicado por 100.

Eficiencia de propagación:

Estuvo calculada por el número promedio de plantas regeneradas en cada tratamiento en un período de ocho meses, a partir de un explante inicial (segmento de hoja).

C. Manejo del Experimento

Se tomaron los tubos conteniendo callos provenientes de la fase de iniciación que habían permanecido hasta ese momento en completa oscuridad y se procedió a trasladarlos a tubos que contenían el medio específico para desarrollo de brotes, actividad que tuvo lugar dentro de la cámara de flujo laminar desinfectada previamente con alcohol al 70%, y utilizando instrumental debidamente esterilizado y con un mechero para flamear dicho instrumental así como los tubos que eran manipulados para el traslado de los callos con iniciación de brote. Se tomó entonces una pinza esterilizada y se extrajo el callo del tubo que lo contenía colocándolo en otro que contenía medio de Bourgin y Nitsch para brotación conteniendo 0.2 mg/l de BA únicamente para inducción de brotes. Los tubos fueron flameados en el mechero antes y después de haber introducido el callo al medio de regeneración, además, cada vez que se realizaba un traslado de callo las pinzas también se flameaban. Al finalizar la siembra se sellaron los tubos con parafilm, para poder ser sacados de la cámara y llevados al cuarto de crecimiento para quedar desde ese momento en plena luz aproximadamente a una intensidad de 3,000 lux, a una temperatura de 25°C. Se realizaron observaciones cada semana tomando nota de los cambios significativos que se fueron dando en el desarrollo de los brotes.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de la investigación se realizaron observaciones periódicas, desde la fase de iniciación, que comprende el desarrollo del callo, hasta la formación de plantas.

Para visualizar el proceso de la investigación, a continuación se describen los resultados obtenidos en las dos fases más importantes del proceso de formación, crecimiento y desarrollo de callos, brotes y plantas provenientes de explantes constituidos por segmentos de hoja de *Anthurium sp.* cultivares (rojo y rosado).

7.1 Análisis de la Información

A los valores de las variables evaluadas se les aplicó un análisis descriptivo con base en porcentajes y medias obtenidas. Con los resultados finales de esta etapa se elaboraron cuadros y figuras para una mejor ilustración de las respuestas obtenidas.

7.2 Fase I

7.2.1 Porcentaje de Inducción de Callo

Finalizados los dos primeros meses de la investigación (fase I) se pudo observar la aparición de callos en los explantes, aunque no se presentaba todavía en todos los medios. Hasta ese momento eran dos los medios que se destacaban en mostrar respuesta en cuanto a la inducción del callo. Estos medios eran el Bourgin y Nitsch (BN1) suplementado con 2,4-D más BA en concentraciones de 0.1 mg/l y 1.0 mg/l, respectivamente, y el Bourgin y Nitsch (BN2) suplementado con 2,4-D más 2iP en concentraciones de 0.08 mg/l y 3.0 mg/l, respectivamente, en los que se podía observar cierto hinchamiento en los bordes laterales del explante, el cual se encontraba sumergido en el medio de inducción hasta la mitad. Dicha respuesta era visible tanto fuera como dentro del medio de cultivo, en ese momento el explante (segmento de hoja), presentaba la coloración verde normal y mantenía cierto brillo característico de las hojas de anturio.

Cultivar rosado

En el medio BN1 (Bourgin y Nitsch suplementado con 0.1 mg/l de 2,4-D más 1.0 mg/l de BA) hubo respuesta para este cultivar, con el cual se obtuvo el porcentaje más alto para la variable en

estudio con un valor del 55%. En el medio BN2 (Bourgin y Nitsch suplementado con 0.08 mg/l de 2,4-D más 3.0 mg/l de 2iP) también respondió bien este cultivar con un valor de 40%. En los medios P1 (medio Pierik suplementado con 0.1 mg/l de 2,4,-D más 1.0 mg/l de BA), y P2 (medio Pierik suplementado con 0.08 mg/l de 2,4,-D más 3.0 mg/l de 2iP) la respuesta de este cultivar fue menor, con valores de 15% en ambos medios, pero, habiéndose producido contaminación por bacteria en estas repeticiones, no fue posible tomarlas en cuenta para la fase II que contempló el desarrollo de plantas.

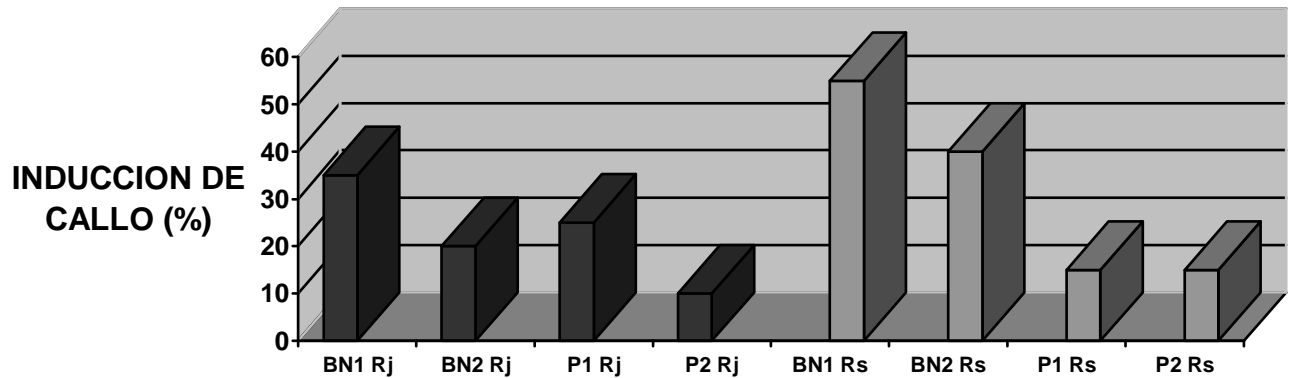
Cultivar rojo

Para este cultivar se obtuvieron porcentajes de respuesta de inducción de callo con valor del 35%, siendo el más alto porcentaje en el medio BN1 (Bourgin y Nitsch suplementado con 0.1 mg/l de 2,4-D más 1.0 mg/l de BA), luego, con el 25% de respuesta, el medio P1 (medio Pierik suplementado con 0.1 mg/l de 2,4,-D más 1.0 mg/l de BA), y los valores de respuesta más bajos para los medios BN2 (Bourgin y Nitsch suplementado con 0.08 mg/l de 2,4-D más 3.0 mg/l de 2iP) y P2 (medio Pierik suplementado con 0.08 mg/l de 2,4,-D más 3.0 mg/l de 2iP) con porcentajes de respuesta de 20% y 10%, respectivamente. Las repeticiones de los medios P1 y P2 tampoco se tomaron en cuenta para la fase II debido a que se produjo contaminación por bacteria.

Haciendo mención de otros trabajos, Kamada (13), también utilizó hojas tiernas de anturio sembradas en medio Bourgin y Nitsch (1967) H. Con las mismas concentraciones y reguladores en condiciones también de oscuridad y a los tres meses pudo observar la formación de callos ya bien definidos. El 2,4-D es una auxina que, aplicado en concentraciones adecuadas, induce la formación de callos como se demostró al utilizar puntas de raíz de ajo en medio MS (Murashigue y Skoog) suplementado con 1.0 y 2.0 mg/l de 2,4-D, en donde la concentración 2.0 mg/l produjo, posteriormente, una frecuencia más alta en la regeneración de brotes.

Habiendo transcurrido el cuarto mes de la investigación se observó el efecto de las combinaciones de reguladores del crecimiento agregadas a los medios. Dichas combinaciones estuvieron formadas por una auxina y una citocinina en este caso son 2,4-D y BA; y 2,4-D y 2iP, respectivamente.

Figura 1. Porcentaje de inducción de callo según medio de cultivo y cultivar.



BN= Medio basal Bourgin y Nitsch

P = Medio basal de Pierik

1 = 0.1 miligramo por litro de 2,4-D más 1.0 miligramo por litro de BA

2 = 0.08 miligramos por litro de 2,4-D más 3.0 miligramos por litro de 2iP

Rs = Cultivar rosado

Rj = Cultivar rojo

Las auxinas son usadas frecuentemente e incorporadas al medio nutritivo para la iniciación de callos. Irvine et al. (1983) ha reportado 79 pruebas sobre el uso de reguladores potenciales para la iniciación de callo en tejido de hojas de caña de azúcar de las cuales un 96% de los compuestos efectivos utilizados están asociados a actividades relacionadas con auxinas. La auxina que más frecuentemente se utiliza para la iniciación de callo es el 2,4-D. Algunos investigadores reportan que esta auxina puede causar variabilidad genética si se sigue subcultivando el callo de modo que prefieren utilizar para subcultivos de callo el ácido naftalenacético (ANA) o el ácido indolacético (AIA) luego de haber iniciado el proceso con el 2,4-D. (6).

Fue en el medio Bourgin y Nitsch, en las dos combinaciones de reguladores del crecimiento, donde se pudo observar la formación de masas de células (callos) las cuales estaban situadas en los bordes de los explantes, tanto fuera como dentro del medio de cultivo y presentaban una coloración blanca, principalmente. Para producción de callo se han utilizado concentraciones altas de auxina y bajas concentraciones de citocininas, cultivándose en la oscuridad total o con fotoperíodos de 12 horas (21). En el caso de la presente investigación no se utilizaron fotoperíodos intermitentes de 12 horas ya que los explantes permanecieron en total oscuridad durante los meses que duró la etapa de iniciación o inducción de callo (6 meses), lográndose también la formación de masas callosas.

Existen varios factores para explicar la no respuesta a la formación de callo en un determinado medio, en cultivo de tejidos de anturio y uno de ellos, el más crítico es el genotipo que se utilice para la evaluación. Pierik y colaboradores (19), examinaron 38 genotipos de *Anthurium andreanum* y pudieron observar una fuerza moderada en cuanto a la formación de callos de segmentos de hoja en 31 tipos, muy pobre en cuatro tipos y no hubo respuesta en los restantes tres tipos.

En los medios en donde existió la formación de callos se pudo observar su consistencia, en algunas ocasiones de tipo compacta, con coloración blanca y no producía disgregación al momento del corte con el bisturí, también se produjeron callos de consistencia friable, los cuales eran fácilmente disgregables en otros más pequeños al momento de cortarlos para ser propagados. Además de los factores mencionados que determinan la inducción del callo en un explante, podemos referirnos al medio de cultivo ya que dentro de sus ingredientes pueden haber algunos que son esenciales para la formación del callo. En ocasiones debe existir un balance entre estos para que exista desarrollo de callo, en este caso los iones NH_4^+ y NO_3^- deben estar balanceados ya que ambos son fuente de nitrógeno y se considera que las diferencias en las concentraciones de estos iones con las vitaminas desempeñan un importante papel para la inducción de callos embriogénicos por el nitrógeno que aportan. En sorgo, por ejemplo, el nivel alto de amonio y bajo de nitrato en medio MS, produjo la formación de callos embriogénicos compactados. Aumentando la proporción de nitrato de 39.9 a 82.4 mM en medio MS, se produjeron callos friables en algunos genotipos (13).

En el medio BN1 utilizado para esta investigación en donde existió la formación de callo, se utilizaron 2.5 mM de amonio y 11.9 mM de nitrato, se obtuvieron mayor número de callos disgregables que callos compactos, aunque existieron de los dos tipos. En comparación los resultados en sorgo coincide en cuanto a los niveles de amonio y nitrato ya que Kamada utilizó alto amonio y bajo nitrato y obtuvo callos compactos y en esta investigación se utilizó bajo amonio y alto nitrato y se obtuvieron callos friables, y en el medio BN2 que contenía 20.62 mM de amonio y 39.91 mM de nitrato se observó respuesta de los explantes a la formación de callos, de modo que este factor no influyó en la no respuesta.

En el cuadro 2 se resumen los resultados obtenidos para la variable en estudio (porcentaje de inducción de callo), durante los primeros seis meses de formación de callo.

Cuadro 2. Porcentaje de inducción de callo, según medio de cultivo y cultivar, a los seis meses de iniciado el cultivo.

Cultivar	Medio de Cultivo	Repeticiones	Inducción de callo (%)
Rojo	Bourgin y Nitsch 1	6	100
Rojo	Bourgin y Nitsch 2	2	100
Rojo	Pierik 1	0	0
Rojo	Pierik 2	0	0
Rosado	Bougin y Nitsch 1	8	100
Rosado	Bourgin y Nitsch 2	8	100
Rosado	Pierik 1	0	0
Rosado	Pierik 2	0	0

1= 0.1 miligramos por litro de 2,4-D más 1.0 miligramo por litro de BA

2= 0.08 miligramos por litro de 2,4-D más 3.0 miligramos por litro de 2iP

7.2.2 Número de Callos por Explante

En forma general, se pudo observar la inducción de callos en los explantes, en ocasiones se desarrollaban fuera del medio de crecimiento y en ocasiones se podían observar el desarrollo de callos sumergidos en el medio emergiendo de los bordes de los segmentos de hoja. De un mismo explante podía haber hasta 3 ó 4 callos y también podía haber sólo uno, todos manifestaban una pigmentación blanca.

Cultivar rosado

Para la variable número de callos por explante (cuadro 3), este cultivar produjo un número mayor de ellos en el medio Bourgin y Nitsch 1, con el más alto valor, 3.4 callos por cada explante sembrado.

Cultivar rojo

Este cultivar respondió en el medio Bourgin y Nitsch 1 aunque fue menor su respuesta, ya que su valor más alto fue 2.5 callos por cada explante sembrado.

En todos los explantes hubo desarrollo de callos y en forma general se pudo observar la inducción y la formación de pequeños brotes dentro de un mismo explante, es decir, que ambas estructuras podían ocurrir dentro de un mismo segmento de hoja, estos brotes semidesarrollados siempre emergían del callo mismo, nunca emergía un brote del borde del segmento de hoja.

En algunos callos se podía observar en la parte superior, un abultamiento que sobresalía tomando un color rosado pálido que era donde se empezaba a desarrollar el brote, el cual era de color blanco por estar en condiciones de oscuridad. En ocasiones habían callos con pequeños brotes por debajo del explante, es decir, sumergidos dentro del medio.

Cuadro 3. Número promedio de callos por explante según medio de cultivo y cultivar, a los seis meses de iniciado el cultivo.

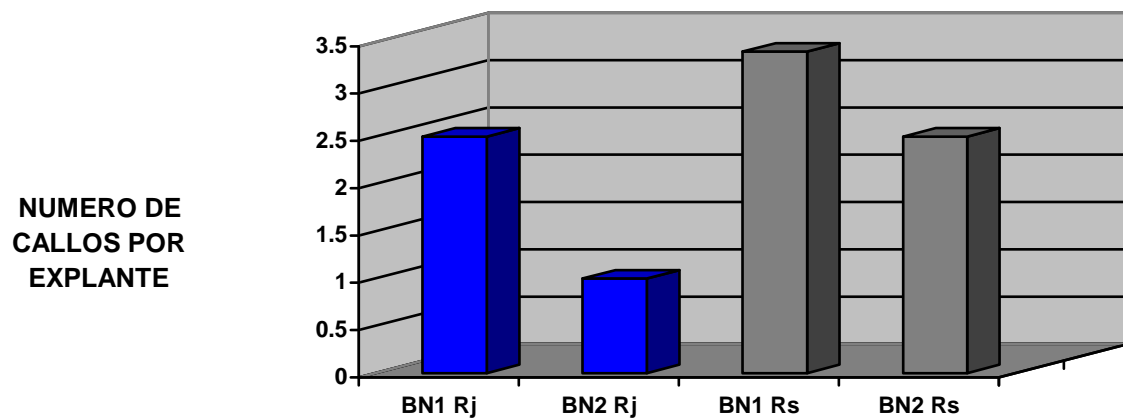
Cultivar	Medio de Cultivo	Repeticiones	Número de callos sembrados	Número de callos por explante
Rojo	Bougin y Nitsch 1	6	15	2.5
Rojo	Borgin y Nitsch 2	2	2	1
Rojo	Pierik 1	0	0	0
Rojo	Pierik 2	0	0	0
Rosado	Bourgin y Nitsch 1	8	27	3.4
Rosado	Bourgin y Nitsch 2	8	20	2.5
Rosado	Pierik 1	0	0	0
Rosado	Pierik 2	0	0	0

1= 0.1 miligramos por litro de 2,4-D más 1.0 miligramo por litro de BA

2= 0.08 miligramos por litro de 2,4-D más 3.0 miligramos por litro de 2iP

BN= Bourgin y Nitsch

Figura 2. Número de callos por explante según medio de cultivo y cultivar.



1 = 0.1 miligramos por litro de 2,4-D más 1.0 miligramos por litro de BA

2 = 0.08 miligramos por litro de 2,4-D más 3.0 miligramos por litro de 2iP

Rs = Cultivar rosado

Rj = Cultivar rojo

En la figura 2 se aprecia que el medio Bourgin y Nitsch 1 y el cultivar rosado son los que produjeron mayor número promedio de callos por explante, el medio Bourgin y Nitsch 2 y el cultivar rojo produjeron también callos aunque en menor cantidad.

7.3 FASE II

7.3.1 Número de Plantas por Callo

En la segunda fase de la investigación, la cual se desarrolló bajo condiciones de luz, (3,000 lux) y a 25 grados centígrados, los brotes, que en la fase I eran pequeños, sin una forma definida y de coloración blanca se comenzaron a tornar de color verde y con el paso del tiempo fueron tomando forma.

Se podían observar ya en esta fase la formación de plantas verdaderas, con hojas acorazonadas y brillantes, pigmento clorofílico, el característico de la planta adulta, todo este proceso era desarrollado en un medio de brotación que difiere del medio de iniciación o inducción de callo en la supresión de la auxina 2,4-D y dejando actuar únicamente al BA (citocinina), el cual era el promotor del desarrollo satisfactorio de estos brotes.

Skoog, en 1956, afirmó que las citocininas son unas sustancias muy activas y al igual que la auxina presentan muchas formas de actuar siendo las principales:

- Efecto en la división celular, en este proceso son indispensables y eficaces, en ausencia de auxinas. Las dos se complementan, la auxina favorece la duplicación del ADN y la citocinina hace posible la separación de los cromosomas.
- Un papel muy claro en la organogénesis, en la que brindan estimulación considerable a la formación de yemas.
- Las citocininas promueven la división celular y la organización de callos, diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos. (4).

Las citocininas promueven la división celular y organización de callos, las más utilizadas son: benciladenina (BA), cinetina y zeatina, en concentraciones de 0.03 – 30 mg/l. La BA es la citocinina de empleo más generalizada. (11).

En esta fase de la investigación, que comprende la formación de plantas, se perdieron brotes por causas que se le atribuyen a oxidación, lo cual estuvo caracterizado porque los brotes pequeños provenientes de la fase I, tomaron un color café oscuro el cual recubrió todo el brote, dicho problema les impidió el desarrollo quedando achaparrados y finalmente murieron dentro del tubo de cultivo.

Cuadro 4. Número de plantas por callo según medio de cultivo y cultivar.

Cultivar	Medios de Cultivo	Número de callos sembrados	Número de callos por explante	Número de plantas por callo
Rojo	Bourgin y Nitsch 1	15	2.5	0.67
Rojo	Bourgin y Nitsch 2	2	1	0
Rojo	Pierik 1	0	0	0
Rojo	Pierik 2	0	0	0
Rosado	Bourgin y Nitsch 1	27	3.4	1.4
Rosado	Bourgin y Nitsch 2	20	2.5	0.15
Rosado	Pierik 1	0	0	0
Rosado	Pierik 2	0	0	0

1= 0.1 miligramos por litro de 2,4-D más 1.0 miligramo por litro de BA.

2= 0.08 miligramos por litro de 2,4-D más 3.0 miligramos por litro de 2iP.

Cultivar rosado

Para la variable número de plantas por callo este cultivar respondió mejor en el medio Bourgin y Nitsch 1, con 1.4 plantas por callo (cuadro 4), producido en la fase II. Es el medio antes mencionado el que mejor respuesta ha generado en todas las variables hasta ahora tomadas en cuenta.

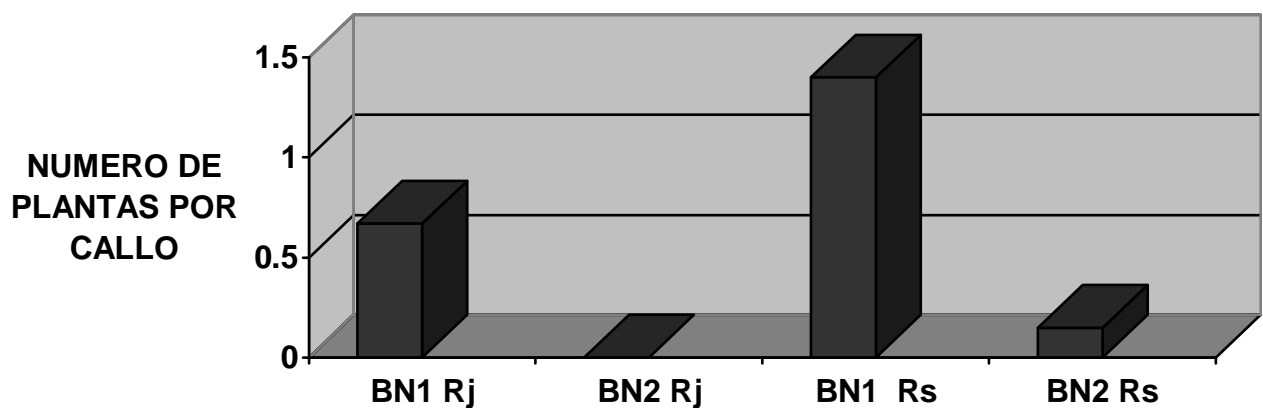
Cultivar rojo

Para este cultivar también hubo respuesta pero con valores más bajos para la variable en estudio ya que se obtuvo 0.67 plantas por callo y solamente en el medio Bourgin y Nitsch 1.

Según Skoog y Miller, citados por Calderón (4), la interacción auxina–citocinina provoca la formación de brotes inducidos previsiblemente de callos de tabaco usándose relativamente bajos niveles de auxina y altos niveles de citocinina en el medio de propagación. En el caso del medio de brotación utilizado para la propagación de anturio en la presente investigación, se le suprimió por completo la adición de la auxina 2,4–D y se agregó únicamente la citocinina BA (benciladenina), con lo cual efectivamente se logró provocar el desarrollo de brotes sobre callos ya formados. Además, Rodríguez, menciona que a partir de callos se pueden desarrollar embrioides (embriones no sexuales) .

La embriogénesis ocurre con alta concentración de 2,4-D que es la auxina más utilizada. Al transferirse los callos a un medio sin auxinas y en ocasiones con bajas concentraciones de citoquininas se desarrollan unos puntos verdes que son zonas preferenciales de diferenciación y la subsecuente formación de embriones que al desarrollarse generan una planta nueva. Villalobos (IICA 1988), citado por Rodríguez (21), señala que generalmente los embriones adventicios tienen su origen en una sola célula o en un pequeño grupo de ellas, a la vez menciona que a través de la embriogénesis somática se puede tener un número ilimitado de plantas. La limitante es el incremento de la variabilidad como ocurrió en papaya (Litz, 1982), citado por Samayoa (22).

Figura 3. Número de plantas por callo según medios de cultivo y cultivar.



BN= Medio basal Bourgin y Nitsch

1 = 0.1 miligramos por litro de 2,4-D más 1.0 miligramo por litro de BA

2 = 0.08 miligramos por litro de 2,4-D más 3.0 miligramos por litro de 2iP

Rs = Cultivar rosado

Rj = Cultivar rojo

En cuanto a la baja respuesta de formación de plantas en el medio BN2 para ambos cultivares, George (6) menciona que algunos genotipos no responden a un medio determinado, ya sea que no se produzca callo o que el callo producido no de origen a brotes adventicios, y posiblemente esta pueda ser una de las razones por las que hay baja formación de plantas.

7.3.2 Eficiencia de Propagación

Se calculó al final de la fase II con el número de plantas formadas dividido por el número de segmentos de hoja que fueron sembrados en el medio de cultivo inicialmente.

Cultivar rosado

Fue en este cultivar y en el medio Bourgin y Nitsch 1, en el que mayor eficiencia de propagación se obtuvo, con un valor de 4.75, lo que nos indica que a partir de un explante inicial se pueden obtener 4.75 plantas en un tiempo de ocho meses (cuadro 5).

Cultivar rojo

Se obtuvo una eficiencia de propagación de 1.6 (cuadro 5).

Cuadro 5. Eficiencia de propagación según cultivares y medios de cultivo.

Cultivar	Medios de Cultivo	Número de Callos por Explante	Número de Plantas por Callo	Eficiencia de Propagación
Rojo	Bourgin y Nitsch 1	2.5	0.67	1.6
Rojo	Bourgin y Nitsch 2	1	0	0
Rojo	Pierik 1	0	0	0
Rojo	Pierik 2	0	0	0
Rosado	Bourgin y Nitsch 1	3.4	1.4	4.75
Rosado	Bourgin y Nitsch 2	2.5	0.15	0.37
Rosado	Pierik 1	0	0	0
Rosado	Pierik 2	0	0	0

1= 0.1 miligramos por litro de 2,4-D más 1.0 miligramo por litro de BA

2= 0.08 miligramos por litro de 2,4 -D más 3.0 miligramos por litro de 2iP

En el cuadro 5 se aprecia que el medio BN1 es más eficiente que el BN2 en cuanto a la propagación, así como el cultivar rosado tuvo una mayor eficiencia que el cultivar rojo.

Se cuenta ahora, con los resultados de la presente investigación, como una alternativa metodológica para la propagación de anturio, la cual puede servir como herramienta tecnológica para la producción masiva de esta especie ornamental que promete ser una buena alternativa de inversión para los empresarios nacionales, principalmente.

8. CONCLUSIONES

1. Cultivando *in vitro* segmentos de hoja, como explantes, y con la aplicación de reguladores del crecimiento (auxinas y citocininas), es posible inducir la formación de callo, y de estos formar brotes y plantas de anturio, en los cultivares rojo y rosado.
2. De los cuatro medios evaluados el que mostró mayor respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas, fue el de Bourgin y Nitsch suplementado con 0.1 miligramos por litro de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) más 1.0 miligramo por litro de bencil adenina (BA), en los cultivares rosado y rojo.
3. Con el cultivar rojo se obtuvo una eficiencia de propagación de 1.6 plantas por explante inicial en un período de ocho meses, mientras que con el cultivar rosado 4.75, ambos con el medio Bourgin y Nitsch suplementado con 0.1 miligramos por litro de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) más 1.0 miligramo por litro de bencil adenina (BA).

9. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar el medio Bourgin y Nitsch, suplementado con 0.1 miligramos por litro de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) más 1.0 miligramo por litro de bencil adenina (BA), para lograr una satisfactoria inducción de callo y regeneración de plantas, utilizando como explante segmentos de hoja, en los cultivares de anturio rojo y rosado.
2. Se recomienda evaluar el medio basal Bourgin y Nitsch, suplementado con 0.1 miligramos por litro de 2,4-D más 1.0 miligramo por litro de BA, en la mayor cantidad posible de cultivares, para determinar la consistencia y extrapolación hacia otros cultivares, de los resultados obtenidos en esta investigación.
3. Se recomienda evaluar diferentes tamaños de explantes sobre el medio de cultivo para explorar la obtención de mayor número de explantes por hoja.
4. Se recomienda evaluar diferentes posiciones de los explantes sobre el medio de cultivo para determinar si hay desarrollo de callo en otras áreas de la hoja y no sólo del borde.

10. BIBLIOGRAFIA

1. AGEXPRONT. 2001. National directory of exporters of ornamental plants, foliage and flowers Guatemala. Guatemala. 77 p.
2. ANTHURA, B.V. 1998. Cultivation guide *Anthurium*; origen and variates. Holland, Anthura. 140 p.
3. BOURGIN, J.P.; NITSCH, J.P. 1976. Production of haploid *Nicotiana* from excised stamens. *Ann. Physiol. Veg. (USA)* 9:377-382.
4. CALDERON ESTRADA, J.R. 2000. Respuesta de dos cultivares de aguacate *Persea americana* Mill. Var. Guatemalensis cv. Hass y var. Americana CV.Booth8 al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 69 p.
5. GARCES, L.A. 1997. Anturios; producción de Anturios. Santa Fé de Bogota, Colombia, Hortitécnia. p. 3-15.
6. GEORGE, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture. England, Exegetics. 1361 p.
7. GUATEMALA. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS; JOCV. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala. 165 p.
8. GUDIÉL, V.M. 1987. Manual de floricultura. Guatemala, Productos Superb. 257 p.
9. GUTIERREZ, B.J. 1996. Micropropagación *in vitro* del clon de banano (*Musa sp.*) enano ecuatoriano. Tesis In. Agr. Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. p. 14-27.
10. HARTMAN, H.T. 1985. Propagación de plantas principios y prácticas; métodos de propagación. Trad. por Marino A. Ambrosio. 5 ed. México, CECSA. 797 p.
11. HERNANDEZ G., C.M. 1999. Respuesta de los cultivares de aguacate *Persea americana* Mill. Fuerte y Booth 7, al cultivo *in vitro* de yemas axilares. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, 72 p.
12. HERNANDEZ T., M.A. 2000. Respuesta de la planta zarzaparrilla *Smilax moranensis* Mortens y Galiotti al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 78 p.
13. KAMADA, K. 2002. Micropropagación de *Spatyphyllum*, Anturio, camote, ajo; informe final. Guatemala, Agencia de Cooperación Internacional de Japón. 120 p.
14. LEFFRING, L.; HOOGSTRATE, J.; BRASTER, M. 1976. Weekselkweek *Anthurium*: resultaten nog lang geen 100%. *Vakblad Bloemisterij (pais)* 31:14-15.
15. LORENT, H.J. 1998. Biblioteca de la agricultura; técnicas agrícolas en cultivos extensivos. edit. Idea Books, 1ª. ed. Barcelona, España.. 768 p.

16. MARTINEZ, A.F. 1992. Regeneración *in vitro* de 4 genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de brotes apicales. Tesis Ing. Agr. Nuevo León, México, Universidad Autónoma de México. p. 4-25.
17. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* (USA) 15:473-497.
18. PASOS, G.A. 1999. Respuesta de tres cultivares de rosal (*Rosa sp.*) variedades Samantha, Cristaline y Peach, a la multiplicación y enraizamiento de brotes *in vitro* en diferentes proporciones de auxinas y citocininas. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 53 p.
19. PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; VAN SCHAIK, W.; VANEYK-VOS, G. 1975. With the aid of shaking machines: callus propagation of *Anthurium andreanum*. *Vakblad Bloemisterij* (País) 30:27.
20. ROCA, C.C. 1996. Respuesta de dos diferentes tipo de explantes de zapote (*Pouteria zapota* L.) y diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 84 p.
21. RODRIGUEZ R., B.F. 1994. Respuesta del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la regeneración *in vitro*. En: Informes de Investigación 1991-1993. Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas. 13-26 p.
22. SAMAYOA, R.D. 2000. Generalidades del cultivo de anturio en Guatemala, AGEXPRONT. 45 p.
23. SIMPOSIO NACIONAL SOBRE CULTIVO DE TEJIDOS EN VEGETALES (1., 1996, Guatemala). Memorias. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. 129 p.
24. TELLO, E.G. 1993. Estudio de la respuesta del pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) a su reproducción vegetativa *in vitro* utilizando dos medios de cultivo, dos explantes y seis combinaciones hormonales. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. p. 14-30.
25. WEAVER, R.J. 1984. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. por Agustín Contín. País, Editorial. 622 p.

11. APENDICE

Cuadro 7A. Composición del medio basal Bourgin y Nitsch (1967) H, usado para la inducción de callo en segmentos de hoja de anturio *Anthurium sp.*

Componentes	mg/l
<u>MACROELEMENTOS</u>	
KNO ₃	950
NH ₄ NO ₃	200
CaCl ₂ .2H ₂ O	219.9
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	68
<u>MICROELEMENTOS</u>	
MnSO ₄ .4H ₂ O	25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.25
<u>VITAMINAS</u>	
Thiamina.HCl	0.5
Ácido Nicotínico	5
Pyridoxina.HCl	0.5
Biotina	0.05
Ácido Fólico	0.5
<u>COMPONENTE ORGANICO</u>	
Myo-Inositol	100
<u>AMINO ACIDOS</u>	
Glicina	2.0
<u>FUENTE DE CARBONO</u>	
Azúcar	20 gr/l
<u>OTROS</u>	
pH	6

Cuadro 7B. Composición del medio basal Pierik y Steegmans (1976)a, usado para la inducción de callo en segmentos de hoja de anturio *Anthurium sp.*

Componentes	mg/l
<u>MACROELEMENTOS</u>	
KNO ₃	1950
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
<u>MICROELEMENTOS</u>	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
CuSO ₄ .SH ₂ O	0.025
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.25
<u>VITAMINAS</u>	
Thiamina HCl	0.1
Ácido Nicótico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
<u>COMPONENTE ORGANICO</u>	
Inositol	100
<u>AMINO ACIDOS</u>	
Glicina	2.0
<u>FUENTE DE CARBONO</u>	
Azúcar	30 g/l
<u>OTROS</u>	
pH	6

**Cuadro 7C. Elaboración del medio Bourgin y Nitsch (500 ml),
para desarrollo de brotes y plantas de anturio *Anthurium sp.***

COMPONENTES	CANTIDAD REQUERIDA
MACROELEMENTOS X 50	6 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O X 100	2.5 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O X 200	2.5 ml
Hierro M.S. X 100	5 ml
MICROELEMENTOS X 200	2.5 ml
VITAMINAS X 500	0 ml
ACIDO FOLICO X 50	10 ml
Inositol	0.05 g
BA	0 ml
Azúcar	10 g
pH	6
Agar	4 g

