

MULTIPLICACIÓN CLONAL *IN VITRO* DEL ANTURIO (*Anthurium andraeanum* Lind. cv. Nicoya)

Mariely Liendo¹ y Norca Mogollón¹

RESUMEN

El anturio 'Nicoya' es una especie ornamental altamente cotizada como planta de flor en maceta y de corte. El objetivo de este trabajo fue estudiar, a partir de brotes iniciados *in vitro*, la multiplicación clonal de esta especie. El proceso se desarrolló en tres fases: A) Multiplicación de brotes, cultivados en las sales de Murashige y Skoog (MS), tiamina 0,5 mg·L⁻¹; ácido nicotínico 0,5 mg·L⁻¹; piridoxina 0,5 mg·L⁻¹; inositol 100 mg·L⁻¹; glicina 2 mg·L⁻¹; sacarosa 3%, y los reguladores de crecimiento benciladenina (BA) en las dosis de 1 y 2 mg·L⁻¹ en combinación con el ácido naftalenacético (ANA) a 0; 0,01 y 0,1 mg·L⁻¹. La mayor tasa de multiplicación se obtuvo a los dos meses de cultivo con BA 1 mg·L⁻¹, libre de auxinas. B) Enraizamiento de los brotes, en donde se probaron cuatro dosis de ANA 0; 0,1; 0,25 y 0,5 mg·L⁻¹. El proceso de rizogénesis ocurrió en todos los tratamientos, incrementándose el número y longitud de las raíces cuando se adicionó al medio 0,1 mg·L⁻¹ de ANA. C) Aclimatización de las vitroplantas, la cual se llevó a cabo bajo dos condiciones ambientales: nebulización y cámara húmeda. Luego de 15 días *ex vitro* la sobrevivencia fue superior al 70 % en ambas condiciones, aunque las plantitas aclimatizadas en la cámara húmeda presentaron mejor apariencia. Este estudio permitió establecer los protocolos para la obtención de vitroplantas de la especie estudiada.

Palabras clave adicionales: Vitroplantas, enraizamiento, reguladores de crecimiento, aclimatización

ABSTRACT

In vitro clonal multiplication of anturio (*Anthurium andraeanum* Lind. cv. Nicoya)

The anthurium 'Nicoya' is a highly marketable ornamental species as both flower pot and cut flower. The objective of this work was to study the clonal multiplication of this species, from *in vitro* grown shoots. The process was developed in three phases: A) Sprout multiplication, grown in Murashige and Skoog basal salt mixture (MS): thiamine 0.5 mg·L⁻¹; nicotinic acid 0.5 mg·L⁻¹; pyridoxine 0.5 mg·L⁻¹; inositol 100 mg·L⁻¹; glycine 2 mg·L⁻¹; sucrose 3 %, and development regulators: benzyladenine (BA) at doses of 1 and 2 mg·L⁻¹ in combination with naphthaleneacetic acid (NAA) at 0; 0.01; and 0.1 mg·L⁻¹. The highest multiplication rate was obtained after 2-months cultivation with BA 1 mg·L⁻¹, free from auxins. B) Shoot rooting, where four doses of NAA were tested 0, 0.1, 0.25 and 0.5 mg·L⁻¹. The rooting process occurred in all treatments, incrementing the number and length of the roots when MS 0.1 mg·L⁻¹ of NAA was added to the medium. C) Acclimatization of *ex vitro* plants, which was conducted under two environmental conditions: mist and humid chamber. The survival rate of *ex vitro* plants after 15 days was higher than 70 % under both conditions, although the plantlets acclimatized in the humid chamber showed a better appearance. This study allowed us to establish protocols for obtaining *in vitro* plans of the targeted species.

Additional key words: *In vitro* plants, rooting, growth regulators, acclimatization

INTRODUCCIÓN

Anthurium andraeanum es una planta ornamental perteneciente a la familia Araceae, reconocida por una larga y vistosa espata de atractivo colorido; así como también, por la belleza de su follaje. Es cotizada como planta de flor y follaje de corte y como planta en recipiente para decorar espacios interiores (Hamidah et al., 1997; Trujillo et al., 1999; Gallaga, 2004). Su propagación sexual tiene limitaciones, ya que no

produce semillas en abundancia y las pocas que se obtienen, pierden la viabilidad rápidamente, y la descendencia es muy variable genéticamente (Hamidah et al., 1997); mientras que la asexual, realizada por división de brotes laterales, requiere disponer de un número importante de plantas (Gallaga, 2004). Por ello, la técnica del cultivo *in vitro* se está usando extensivamente para la explotación comercial, debido a que permite el saneamiento y propicia la multiplicación masiva de la especie, garantizando

Recibido: Junio 16, 2008

Aceptado: Julio 1, 2009

¹ Posgrado de Horticultura, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: mliendo@ucla.edu.ve; norcam@interlink.net.ve

la fidelidad genética (Ziv, 1997; Dhanya y Mary, 2006). En tal sentido, el objetivo de esta investigación fue lograr, mediante cultivo *in vitro*, la multiplicación masiva del *Anthurium andraeanum* Lind. cv Nicoya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para las fases de multiplicación y enraizamiento fueron seleccionados brotes uniformes de *Anthurium andraeanum* Lind. cv. Nicoya desde un plantel madre de vitroplantas, las cuales se caracterizaron considerando la altura (3 a 4 cm de longitud) y número de hojas (3 a 4). A los mismos se les aplicó un protocolo de desinfección que consistió en sumergirlos sucesivamente por 10 minutos en soluciones de Betadine (10 %), Benomyl (3 g·L⁻¹), Kasumín (4 mL·L⁻¹), Bidroxyl (500 mg·L⁻¹) e hidróxido de sodio (i.a. 5,25 %). Entre cada paso se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada. El medio de cultivo estuvo conformado por las sales de Murashige y Skoog al 100 % y sacarosa a 30 mg·L⁻¹ en las dos fases de cultivo. En la multiplicación fueron probadas las combinaciones de benziladenina (BA) a 1 y 2 mg·L⁻¹ en combinación con el ácido naftalenacético (ANA) a 0; 0,01 y 0,1 mg·L⁻¹. En el enraizamiento, el ANA se probó en las dosis de 0; 0,1; 0,25 y 0,5 mg·L⁻¹, excluyendo la BA. En ambas fases el estado físico del medio de cultivo fue semisólido (agar a 7 mg·L⁻¹).

Para evaluar el efecto de los tratamientos se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y 10 brotes como unidad experimental (un brote por tubo).

Los cultivos se colocaron a 25 ± 2 °C; luminosidad de 67,7 y 135,1 μmol·m⁻²·s⁻¹ para las fases de multiplicación y enraizamiento, respectivamente, y fotoperíodo de 16 horas diarias de luz. En la fase de multiplicación se evaluaron la longitud de brotes y número de brotes por explante, al inicio y al final del ensayo; y en la de enraizamiento, el número y longitud máxima de raíces. La fase de aclimatización de las vitroplantas se realizó con las plantas obtenidas de la fase de enraizamiento, y éstas fueron colocadas en dos ambientes (cámara húmeda y nebulización) en un sustrato comercial (Promix). La evaluación de esta fase se realizó determinando el porcentaje de

sobrevivencia. Durante la aclimatización, la temperatura promedio fue de 28 °C y la máxima intensidad luminosa de 27,8 μmol·m⁻²·s⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Multiplicación de brotes

En la fase de multiplicación se detectaron diferencias significativas en las dos variables evaluadas (Cuadro 1). Para la longitud del brote, el mayor valor correspondió a la combinación BA 1 mg·L⁻¹ y ANA 0,01 mg·L⁻¹ con 0,91 cm, el cual superó a la combinación BA 2 mg·L⁻¹ y ANA 0,1 mg·L⁻¹ que alcanzó el menor promedio con 0,61 cm. Las otras combinaciones tuvieron un comportamiento intermedio y fueron similares entre sí. Con relación al número de brotes, el mayor valor correspondió a la combinación BA 1 mg·L⁻¹ sin ANA, con 4,17 brotes por explante la cual superó a tres de las cuatro combinaciones que incluían ANA.

Cuadro 1. Efecto de la combinación de Benziladenina (BA) y el ácido naftalenacético (ANA) sobre la multiplicación del *Anthurium andraeanum* cv. Nicoya a los dos meses de cultivo

Tratamiento (mg·L ⁻¹)	Longitud del brote (cm)	Número de brotes
1 BA + 0 ANA	0,77 ab	4,17 a
1 BA + 0,01 ANA	0,91 a	2,78 c
1 BA + 0,1 ANA	0,77 ab	3,19 bc
2 BA + 0 ANA	0,81 ab	3,80 ab
2 BA + 0,01 ANA	0,76 ab	3,26 bc
2 BA + 0,1 ANA	0,61 b	3,36 abc
Significancia	0,05	0,05
C.V. (%)	33,0	14,0

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) según la prueba de Duncan (longitud de brotes) y LSD (número de brotes). Datos transformados por la función $\sqrt{X+1}$ para la variable número de brotes

Estos resultados coinciden con los de Kuehnle et al. (1992) y de Matsumoto y Kuehnle (1997) quienes lograron la formación de brotes de *Anthurium* en un medio suplementado con dosis bajas de BA (0,5 y 0,2 mg·L⁻¹, respectivamente). También son comparativos a los resultados de Malhotra et al. (1998), Sreelatha et al. (1998) y Lee et al. (2003) en otros cultivares de anturio. Por otra parte, difieren de lo encontrado por

Vargas y García (1995) y Trujillo et al. (1999), quienes alcanzaron una óptima formación de brotes de *Anthurium* sp. al emplear dosis de BA de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los brotes enraizaron en el medio de multiplicación, lo cual tiene semejanza con lo reportado por Lan (1997), aunque el enraizamiento de las vitroplantas se incrementó cuando fueron transferidas a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento. En tal sentido, Sreelatha et al. (1998) señalaron que el anturio produce raíces espontáneamente, por lo que no se hace necesario un medio específico para la emisión de este órgano, mientras que Somoya et al. (1998) encontraron que con la adición de ANA ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se obtuvo un incremento en la calidad y número de raíces. En nuestro caso se consideró necesario realizar la fase de enraizamiento debido a que el número de brotes enraizados y la cantidad de raíces formadas fue muy bajo.

Enraizamiento de los brotes

En esta fase ocurrió rizogénesis en todos los tratamientos (Cuadro 2), por lo que la adición de auxinas al medio de cultivo no fue indispensable para que dicho proceso ocurriera. La suplencia de ANA en bajas concentraciones ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), indujo un incremento en el número de raíces por brote (5,49) y una máxima longitud de raíces (2,59 cm), en un corto período de tiempo (30 días). A medida que se incrementó la dosis de ANA, se observó que las raíces formadas fueron más gruesas y carnosas.

En base a estos resultados se considera que la fase de enraizamiento pudiera no ser necesaria en la propagación *in vitro* de este cultivar. En este sentido, Somoya et al. (1998) y Lee et al. (2003) coinciden que el factor determinante en la propagación *in vitro* es la presencia de las citocininas, excepto para la fase de enraizamiento de los brotes.

Aclimatización de las vitroplantas

A los 15 días del proceso de aclimatización, la sobrevivencia de las vitroplantas de anturio fue de 83 % en las plantas colocadas bajo nebulización, y de 77 % en la cámara húmeda. Se interpreta que este cultivar presentó un alto porcentaje de sobrevivencia en las dos condiciones, respondiendo adecuadamente a los procedimientos

tradicionales de aclimatización (propagador de neblina y cámara húmeda), considerando los criterios señalados por Mogollón (2003). Aun cuando bajo nebulización la sobrevivencia fue ligeramente mayor, las plantas en la cámara húmeda presentaron mejores características en cuanto a color y apariencia.

Cuadro 2. Efecto del ácido naftalenacético (ANA) sobre el enraizamiento *in vitro* del *Anthurium andraeanum* Lind. cv. Nicoya

Tratamiento ANA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de raíces	Longitud máxima de raíces (cm)
0	3,82 b	2,18
0,10	5,49 a	2,59
0,25	3,97 ab	2,01
0,50	4,92 ab	2,35
Significancia	0,05	ns
C.V. (%)	19	16

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$), según la prueba LSD. Datos transformados con la función de $\sqrt{X+1}$ para ambas variables

Considerando el alto porcentaje de sobrevivencia y el hecho de que las hojas de las vitroplantas en las dos condiciones de aclimatización no se deterioraron, se puede presumir que esta especie es fotosintéticamente competitiva, tal como fue comprobado para otras especies de la misma familia y similares condiciones de manejo (Van Huylbroeck et al., 1998; Mogollón, 2003). Por ello, el *A. andraeanum* posiblemente pertenece al grupo 2 de la clasificación de Grout (1988), donde las hojas provenientes del cultivo *in vitro* persisten y generalmente se adaptan a las condiciones autotróficas durante la aclimatización.

CONCLUSIONES

La mayor tasa de multiplicación *in vitro* del *Anthurium andraeanum* 'Nicoya' se obtuvo en el medio de MS suplementado con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, obteniéndose 4,17 brotes/explante. En esta fase hubo emisión de raíces, pero éstas incrementaron en el medio de MS complementado con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, alcanzándose 5,49 raíces por brote y longitud máxima de 2,59 cm.

La aclimatización de las plantas producidas *in vitro* puede realizarse satisfactoriamente bajo condiciones de nebulización y cámara húmeda.

LITERATURA CITADA

1. Dhanya, M.K. y C.A. Mary. 2006. Management of bacterial blight of anthurium (*Anthurium andreaeanum* Linden.) using ecofriendly materials. *Journal of Tropical Agriculture* 44(1-2): 74-75.
2. Gallaga L., S. 2004. Los anturios y su cultivo. Centro de capacitación agropecuaria y forestal. México. <http://www.infojardin.net>. (consulta del 02/02/2008).
3. Grout, B.W. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stress of transplanting. *Acta Hort.* 230: 129-135.
4. Hamidah, M, A. Kaim y P. Deberch. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 189-193.
5. Kuehnle, A., F. Cheng y N. Sugii. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. *Plant Cell Reports* 11: 438-442.
6. Lan T., W, 1997. Regeneration of *Anthurium* adventitious shoots using liquid or raft culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 153-156.
7. Lee, H., J. Cruz y B. García. 2003. Proliferación de brotes múltiples y aclimatación de anturio (*Anthurium andreaeanum*) 'Midori' y 'Kalapana' cultivados *in vitro*. *Revista Fitotecnica Mexicana* 26(4): 301-307.
8. Malhotra, S., D., Puchooa y K. Goofoolye. 1998. Callus induction and plantlet regeneration in three varieties of *Anthurium andraeanum*. *Ornamental Horticulture* 25(4): 132.
9. Matsumoto, T. y A. Kuehnle. 1997. Micropropagation of *Anthurium*. In: Y.P. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag Berlin. pp. 15-28.
10. Mogollón, N. 2003. Estudios morfoanatómicos y fisiológicos en la aclimatización de plantas *in vitro* de *Dieffenbachia maculata* Schott 'Sublime'. Tesis. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 175 p.
11. Somoya, K., P. Narayanaswamy y K. Jayaprasad. 1998. Micropropagation studies in *Anthurium andraeanum* Lind. *Karnataka Journal of Agricultural Science* 11(2): 466-470.
12. Sreelatha U., S.N. Ramachandran y K. Rajmohan. 1998. Factors affecting somatic organogenesis from leaf explants of *Anthurium* species. *Journal of Ornamental Horticulture (New series)* 1(2): 48-54.
13. Trujillo, R., M. Daquinta, L. Nápoles, O. Concepción y M. Balmaseda. 1999. Micropropagación de variedades de *Anthurium andraeanum* de interés comercial. *Agrícola Vergel* 18 (216): 793-796.
14. Van Huylenbroeck, J.M., A. Piqueras y P.C. Debergh. 1998. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plant. *Plant Science* 134: 21-30.
15. Vargas, T. y E. de García. 1995. Propagación *in vitro* de cala blanca *Spathiphyllum* sp. *Agronomía Tropical* 47: 171-183.
16. Vargas, T.E., A. Mejías, M. Oropeza y E. de García. 2004. Plant regeneration of *Anthurium andraeanum* cv. Rubrun. *Electron. J. Biotechnol.* 7(3): 10-11.
17. Ziv, M. 1997. The contribution of biotechnology to breeding, propagation and disease resistance in geophytes. *Acta Horticulturae* 430: 247-258.