

Morfogénesis *in vitro* de *Anthurium cubense* (Araceae)

Jorge Warner¹, Jorge Herrera² y Eric Guevara²

¹ Jardín Botánico Lankester, Universidad de Costa Rica, Apdo. Postal 1031-7050, Cartago, Costa Rica.

² Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

(Rec. 26-X-1992. Acep. 8-VII-1993)

Abstract: A study of the *in vitro* morphogenesis of *Anthurium cubense* was done to develop a suitable micropropagation method. Some factors which affect callus formation from leaf segments are: leaf expansion percentage of the explant donor, leaf section from where the explant was taken, NH_4NO_3 and 2,4-D doses in the culture media, physical constitution of the media and photoperiod. Highest callogenesis percentages were observed in petioles explants taken from leaves with 25% expansion, cultured in Nitsch liquid medium plus 200 mg/l NH_4NO_3 and 0.5 mg/l 2,4-D and kept in darkness. The callus produced roots but not buds. Under these conditions, the procedure developed for *A. scherzerianum* and *A. andraeanum* tissue culture is not suitable for this species.

Key words: *Anthurium cubense*, morphogenesis, tissue culture.

El género *Anthurium* (Araceae) tiene gran importancia económica a nivel mundial principalmente por la presencia de inflorescencias muy atractivas en *A. andraeanum* y *A. scherzerianum*.

El crecimiento lento y la ausencia de métodos de propagación a gran escala pueden ser obstáculos para la comercialización de algunas especies silvestres con potencial económico. Las técnicas de cultivo *in vitro* han permitido la propagación masiva de muchas especies, entre ellas algunas aráceas.

Anthurium andraeanum fue la primera especie de este género que se micropropagó con éxito (Pierik *et al.* 1974). Estudios posteriores originaron un procedimiento bien definido (Pierik 1975, 1976, Pierik y Steegmans 1976, Pierik *et al.* 1979). Un procedimiento muy similar permitió la micropropagación de *A. scherzerianum* (Geier 1982, 1986, 1987).

Uno de los factores más importantes en la morfogénesis de estas especies es la concentración de nitrato de amonio en el medio de culti-

vo. Pierik (1976) determinó que bajar su concentración en el medio de Nitsch (1969) promueve la formación de brotes a partir de callos. En *A. scherzerianum* se ha registrado el mismo efecto (Geier 1982, 1986). También se han observado respuestas similares a la luz y a las dosis de reguladores del crecimiento (Pierik 1975, 1976, Pierik *et al.* 1976, Geier 1982, 1986).

Anthurium cubense Engler es una especie atractiva por su follaje y hábito de crecimiento. Con el fin de lograr su micropropagación, se estudió su morfogénesis *in vitro* evaluando primero el procedimiento establecido para *A. andraeanum* y *A. scherzerianum*.

MATERIAL Y METODOS

Evaluación del procedimiento establecido para *A. andraeanum* y *A. scherzerianum*: Con base en los resultados de Pierik (1975), se comparó la respuesta del material vegetal en el medio de Nitsch (1969) y en un medio similar al anterior (Nitsch modificado) en el cual se bajó la

concentración original de NH_4NO_3 de 720 a 200 mg/l (Geier 1986). Ambos se complementaron con 2% de sacarosa y los microelementos y suplementos vitamínicos del medio de MS (Murashige y Skoog 1962). Se utilizó 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (BA) más 0.1 mg/l de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). El pH se ajustó a 5.8 y los medios se gelificaron con 8 g/l de Bacto-Agar. La esterilización se realizó a 121 °C y 1 kg/cm² por 20 minutos.

Se evaluó la respuesta de explantes tomados de las partes apical (A), media (M), basal (B) y peciolar (P) de hojas de plantas adultas. La edad de las hojas se asoció con su grado de expansión, asignándose un valor de 100% a las completamente expandidas. Los explantes evaluados se tomaron de hojas con 25% y 75% de expansión.

Para su desinfección, el material vegetal se sumergió en alcohol etílico al 70% (v/v) durante 10 segundos. Luego se agitó en una solución de hidróxido de sodio al 1% (v/v) con 0.25 ml/l de Tween 20 durante 15 minutos. Se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril (3, 10, 10 y 10 minutos) en una cámara de flujo laminar.

Como explantes de las partes A, M y B se utilizaron cuadros de aproximadamente 5 mm de lado. Los de P consistieron en cubos de aproximadamente 3 mm de lado incluyendo la epidermis. Todos se colocaron con la superficie abaxial sobre el medio.

Una mitad de los cultivos se mantuvo en completa oscuridad y otra en un régimen lumínico de 12 horas. La temperatura del cuarto de crecimiento se mantuvo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, y se realizaron 25 repeticiones para cada uno de los 32 tratamientos.

A los 96 días, los explantes que formaron callo se transfirieron al medio de Nitsch modificado. Se evaluaron dos dosis de BA (0.5 y 1 mg/l) y dos condiciones de iluminación (oscuridad y un régimen lumínico de 12 horas).

Experimentos para acelerar la formación de callos: Se utilizó el medio de Nitsch modificado en estado líquido y explantes tomados de la parte P de hojas con un 25% de expansión. Se evaluaron 20 tratamientos producto de la combinación de BA (0, 0.5, 1 y 2 mg/l) y de 2,4-D (0, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 mg/l). Los explantes se colocaron sobre puentes de papel filtro. También se incluyó un tratamiento semisolidificado (8 g/l de Bacto-Agar) con una

dosis de 1.0 mg/l de BA y 0.1 mg/l de 2,4-D (recomendada para *A. andraeanum* y *A. scherzerianum*). Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad. Se realizaron 15 repeticiones para cada uno de los 21 tratamientos.

Experimentos para inducir la formación de brotes: A los 60 días se procedió al subcultivo de los callos formados en el experimento anterior. Se evaluó el medio de Nitsch modificado en estado semisólido y dos dosis de BA (1.5 y 3 mg/l), también en la oscuridad.

Se procedió al subcultivo de callos en otras condiciones. Los callos se iniciaron en el medio de Nitsch modificado en estado líquido más 0.5 mg/l de BA y 0.5 mg/l de 2,4-D y se subcultivaron cuando tenían 30 o 90 días de formados. Se comparó el medio de Nitsch modificado y un medio de MS con la concentración de macroelementos a la mitad. Se probaron diferentes dosis y combinaciones de BA (3-5 mg/l), zeatina (3-4 mg/l), forclorfenuron (2-4 mg/l) y ácido indolacético (0.1 mg/l). Los callos se mantuvieron en la oscuridad o en un régimen lumínico de 12 horas.

RESULTADOS

Evaluación del procedimiento establecido para *A. andraeanum* y *A. scherzerianum*: A los 30 días se determinó que el peciolo es el tejido con mayor capacidad para formar callo, independientemente del medio de cultivo y del régimen lumínico (Figs. 1-2). Todos los explantes tomados de peciolo de hojas con un 25% de expansión formaron callo independientemente de la concentración de NH_4NO_3 . En los explantes tomados de la lámina foliar, la formación de callo más temprana se presentó en aquellos provenientes de hojas con un 75% de expansión, colocados en el medio de Nitsch modificado. Los porcentajes de formación de callo fueron similares en ambos regímenes lumínicos, aunque los desarrollados en oscuridad fueron de mayor tamaño.

Después de la primera evaluación se empezaron a observar problemas de oxidación en los explantes mantenidos bajo iluminación. También la transferencia de callos formados en oscuridad a un régimen lumínico de 12 horas provocó su oxidación.

A los 60 días, se observaron diferencias en el crecimiento de los callos según el medio y procedencia del explante. El medio de Nitsch

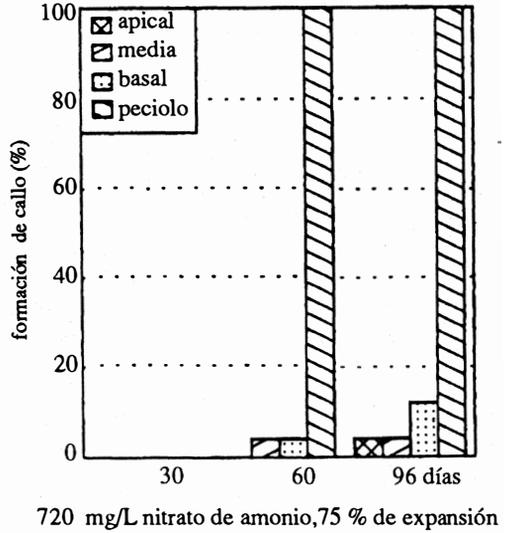
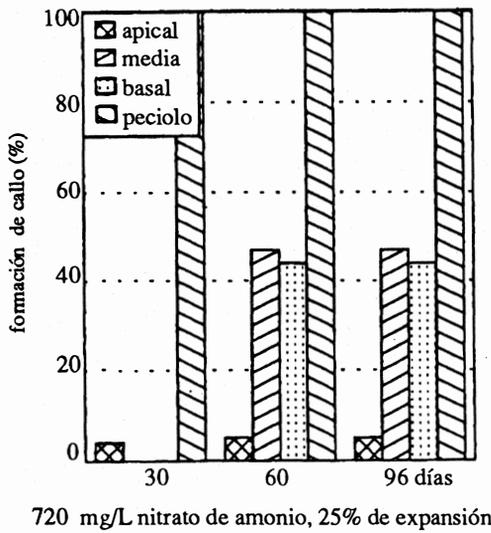
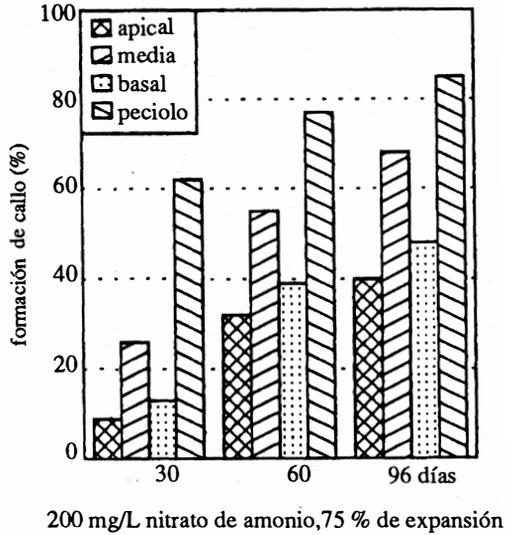
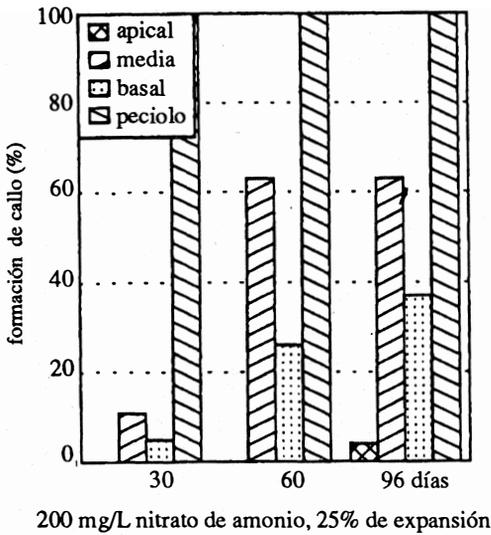


Fig. 1. Efecto de la concentración de nitrato de amonio sobre el desarrollo de callos formados a partir de segmentos de hojas de *A. cubense* (25 o 75% de expansión), cultivados *in vitro* en la oscuridad.

favoreció el crecimiento de callos formados a partir de explantes tomados de hojas con un 25% de expansión, mientras que el Nitsch modificado favoreció el de explantes formados a partir de hojas con un 75% de expansión. Aunque no se cuantificó, a simple vista el tamaño de los callos desarrollados en oscuridad fue mayor.

A los 96 días, los porcentajes de formación de callo variaron muy poco. La mayoría de los

callos cesaron su crecimiento mientras que los mantenidos con iluminación mostraron una fuerte oxidación. A los 120 días, los callos mantenidos en oscuridad también tenían sectores oxidados.

No se indujo la formación de brotes ni aún después de 180 días de cultivo. Tampoco hubo éxito mediante la transferencia de los callos a medios de cultivo con dosis de 0.5 y 1 mg/l de BA y diferentes condiciones de iluminación.

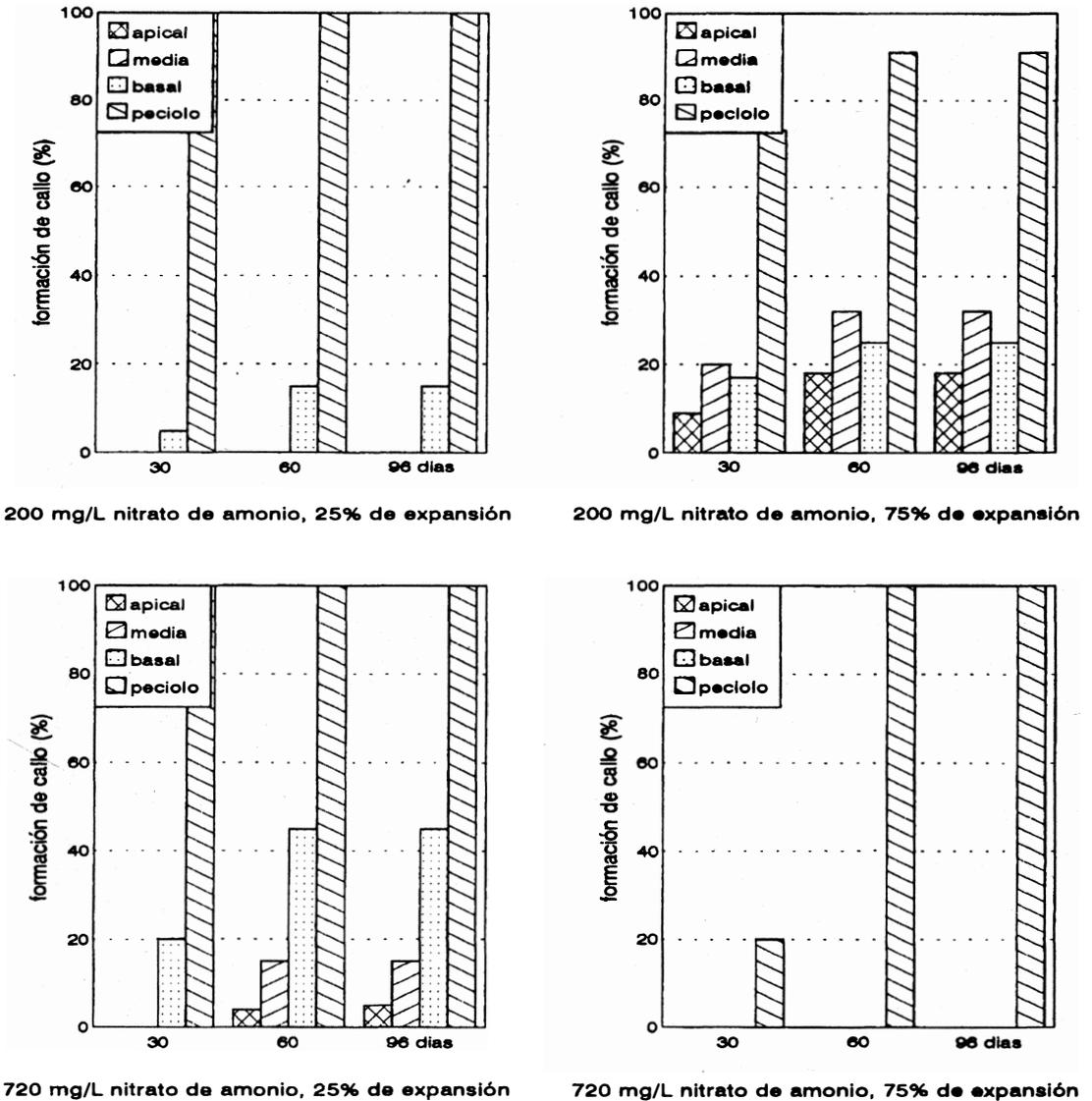


Fig. 2. Efecto de la concentración de nitrato de amonio sobre el desarrollo de callos formados a partir de segmentos de hojas de *A. cubense* (25 o 75% de expansión), cultivados *in vitro* con un régimen lumínico de 12 horas.

Experimentos para acelerar la formación de callos: Se determinó la ventaja de un medio líquido sobre uno semisólido para reducir el tiempo de formación de callos (71% contra 11%) (Cuadro 1). El 100% de los peciolo colocados en el tratamiento con 0.5 mg/l de BA y 0.5 mg/l de 2,4-D formaron callo a los 30 días. Se obtuvo el mismo porcentaje con 1 mg/l de BA y 0.5 mg/l de 2,4-D; sin embargo, los callos fueron de menor tamaño. Cuando se aumentó la

dosis de BA a 2 mg/l, el porcentaje de peciolo que formaron callo disminuyó a un 87%.

Experimentos para inducir la formación de brotes: El subcultivo de los callos a medios con 1.5 o 3.0 mg/l de BA no indujo la formación de brotes. Después de dos meses, los explantes mostraron signos de oxidación y crecimiento aislado de callo.

Tampoco fue posible inducir brotes en callos, de 30 o 90 días de edad, transferidos a

CUADRO 1

Porcentaje de formación de callo en peciolas de *Anthurium cubense* cultivados en el medio de Nitsch modificado en estado líquido y diferentes dosis de BA y 2,4-D

2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)			
	0	0.5	1	1*
0	0	0	0	0
0.05	0	36	40	79
0.1	0	62	71	11 93
0.2	13	36	67	64
0.5	21	100	100	87

* medio gelificado con 8 g/l de Bacto-Agar.

medios con citoquininas (BA, zeatina y forclorfenuron) en dosis de hasta 5 mg/l. Los callos mantenidos con iluminación se oxidaron rápidamente. El evento morfogénico más sobresaliente fue la formación ocasional de raíces después de prolongar los cultivos por más de dos meses (Fig. 3).

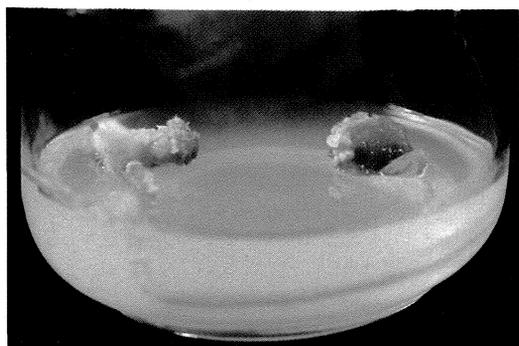


Fig. 3. Raíz de *A. cubense* formada a partir de un segmento de peciolo cultivado *in vitro*.

DISCUSION

Con el esquema de cultivo *in vitro* que se utiliza en *Anthurium andraeanum* y *A. scherzerianum*, los brotes se originan de callos formados en el medio de iniciación, después de un período de oscuridad que se puede prolongar hasta 20 semanas en genotipos con respuesta morfogénica lenta (Geier 1986). La no formación de brotes después de 25 semanas demostró que, en las condiciones en que se realizó el trabajo, este esquema no es apto para el material de *A. cubense* evaluado.

El peciolo de hojas con un 25% de expansión es el tejido que desarrolló callo en forma

más temprana, independientemente del medio de cultivo y del régimen lumínico (Figs. 1-2). Esto demostró que existen diferencias en la capacidad de respuesta de las diferentes partes de las hojas y comprobó observaciones previas realizadas por Pierik *et al.* (1979), quienes encontraron en plantas de dos y cinco años, que las hojas más suaves y sin abrir poseen la mayor capacidad regenerativa. Geier (1986) observó lo mismo en *A. scherzerianum* al determinar que explantes tomados de hojas completamente duras son incapaces de producir callos y brotes. Este autor no observó diferencias entre las partes de hojas con el mismo grado de expansión, como sí se observó en el presente trabajo.

Es notable que, a diferencia de los peciolos, los explantes de la lámina foliar tomados de hojas con un 75% de expansión respondieron antes que los tomados de hojas con un 25% de expansión. Sin embargo, esta observación es válida para los explantes cultivados en el medio de Nitsch modificado, lo que evidencia que la respuesta depende de la concentración de NH_4NO_3 . En la literatura del cultivo *in vitro* de *Anthurium* no hay informes que indiquen que la concentración de NH_4NO_3 afecte la formación de callo según la procedencia del explante, efecto que sí fue evidente en los resultados de este trabajo (Figs. 1-2). Lo que sí se ha observado es su papel en la formación de brotes. Así, Pierik (1976) encontró que un incremento en la concentración de NH_4NO_3 de 206 a 825 mg/l inhibió la regeneración de brotes en subcultivos de callo y cultivo de explantes tomados de hojas.

En general, los porcentajes de formación de callo sugieren la existencia de un gradiente de respuesta entre las partes de la hoja. Por esta razón se propone que la maduración basípeta de las hojas (Turgeon 1989) podría estar inversamente relacionada con la capacidad para formar callo.

El uso de un medio líquido para estimular la formación de callo demostró ser una alternativa al empleo de 2,4-D en dosis mayores que las recomendadas para otras especies del género (0.08-0.1 mg/l) (Cuadro 1).

No ha sido posible inducir la formación de brotes a pesar de la transferencia de los callos a medios semisólidos con citoquininas en concentraciones de hasta 5.0 mg/l. El cultivo prolongado de los explantes mantenidos en condiciones de oscuridad origina una oxidación gradual, probablemente por la exposición continua a altas dosis de citoquinina.

El desarrollo ocasional de raíces fue el evento morfogénico más destacable. Sin embargo, el estímulo que originó su formación no puede atribuirse a la dosis inicial de citoquininas. La explicación más plausible es que las raíces se formaran como respuesta a una interacción de los niveles endógenos de auxinas en los callos con los de las citoquininas agregadas al medio de cultivo, después de una disminución en su actividad inicial. El inicio de la formación de raíces después de casi dos meses de subcultivo refuerza esta idea.

A fin de lograr la formación de brotes, cabe explorar el subcultivo de callos en medios con dosis más altas de citoquininas, solas o combinadas, pero por un tiempo menor para evitar los problemas de oxidación.

En las condiciones de este trabajo, se concluye que: 1º) no fue posible inducir la formación de brotes con los procedimientos que permiten la micropropagación de las otras dos especies de *Anthurium* y 2º) los explantes tomados de las hojas tienen poca capacidad morfogénica.

Para lograr el cultivo *in vitro* de *Anthurium cubense* se sugiere explorar vías de multiplicación con otros tejidos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Manuel Zeledón sus valiosos comentarios al manuscrito. J. Herrera y E. Guevara son miembros del Programa de Apoyo Financiero a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

RESUMEN

Se realizó un estudio de la morfogénesis *in vitro* de *Anthurium cubense* con el fin de desarrollar un procedimiento para su micropropagación. Algunos de los factores que determinan la formación de callo, a partir de segmentos de hojas cultivadas *in vitro*, son el porcentaje de expansión de la hoja y la parte de la hoja donadora del explante, las concentraciones de NH_4NO_3 y de 2,4-D en el medio de cultivo, el estado físico del medio y el régimen lumínico. Los porcentajes más altos de formación de callo

se observaron en segmentos de peciolo tomados de hojas con un 25% de expansión, cultivados en oscuridad en un medio líquido de Nitsch con una concentración de 200 mg/l de NH_4NO_3 y de 0.5 mg/l de 2,4-D. Se observó la formación de raíces pero no fue posible inducir la formación de brotes a partir de callos. Bajo las condiciones en que se realizó el experimento, los resultados indican que el procedimiento que se utiliza para inducir la formación de brotes y plántulas en *A. andraeanum* y *A. scherzerianum* no es apto para esta especie.

REFERENCIAS

- Geier, T. 1982. Morphogenesis and plant regeneration from spadix fragments of *Anthurium scherzerianum* cultivated *in vitro*, p.137-138 In A. Fujiwara (ed.). Plant Tissue Culture 1982. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Tokio.
- Geier, T. 1986. Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott (Araceae) cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 6:115-125.
- Geier, T. 1987. Micropropagation of *Anthurium scherzerianum*: Propagation schemes and plant conformity. Acta Hort. 212:439-443.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Nitsch, J.P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology 19:389-404.
- Pierik, R.L.M. 1975. Callus multiplication of *Anthurium andraeanum* Lind. in liquid media. Neth. J. agric. Sci. 23:299-302.
- Pierik, R.L.M. 1976. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from *in vitro* cultivated callus tissues. Physiol. Plant. 37:80-82.
- Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans & J.A.J. Van der Meys. 1974. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. Sci. Hort. 2:193-198.
- Pierik, R.L.M. & H.H.M. Steegmans. 1976. Vegetative Propagation of *Anthurium scherzerianum* Schott through callus cultures. Sci. Hort. 4:291-292.
- Pierik, R.L.M., P. Van Leeuwen & G.C.C.M. Rigter. 1979. Regeneration of leaf explants of *Anthurium andraeanum* Lind. *in vitro*. Neth. J. agric. Sci. 27:221-226.
- Turgeon, R. 1989. The sink-source transition in leaves. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40:119-138.