

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
IASA I**

**“ORGANOGENESIS INDIRECTA *in vitro* DE ANTURIO  
(*Anthurium andreanum* L.), A PARTIR DE SECCIONES  
DE HOJA”**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO  
DE:**

**INGENIERA AGROPECUARIA**

**ELABORADO POR:**

**MIRIAN BELÉN OSCULLO AVILA**

**SANGOLQUÍ, 19 de Diciembre del 2011**

## RESÚMEN

El anturio (*Anthurium andreanum* L.) es una especie altamente cotizada como planta de flor en maceta y de corte. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para organogénesis indirecta *in vitro* de anturio, a partir de secciones de hoja. El proceso se desarrolló en tres fases: A) Protocolo de desinfección de las hojas, mediante la aplicación de 4 tratamientos, en base a dos concentraciones de cloro (i.a) 0.5 y 1%, y dos tiempos de exposición 10 y 15 min en combinación. Se utilizaron explantes de 1 cm<sup>2</sup> provenientes del centro de las hojas jóvenes. La concentración de 1% por 10 min, evidenció los menores índices de contaminación bacteriana y fúngica, mortalidad y fenolización, siendo ésta la mejor opción. B) Introducción de las secciones de hoja, donde se probaron 6 tratamientos preparados en base a las sales de Murashige & Skoog al 50 y 100% de macronutrientes y tres concentraciones de BAP (bencilaminopurina) 1, 1.75 y 2.5 ppm en combinación, con dosis fija de 2,4-D (0.08 ppm). Los explantes introducidos al medio con 50% de macronutrientes y 1 ppm BAP obtuvieron la mayor formación de callo, un aumento en la concentración de macronutrientes al 100% no mostró mayor estímulo en la formación de tejido calloso, además la dosis de 1 ppm BAP redujo más la fenolización del explante. C) Multiplicación de brotes, la cual se llevó a cabo bajo 4 tratamientos, en base a 4 concentraciones de BAP 0, 0.5, 1.25 y 2.00 ppm. Revelando que el número de brotes fué mayor a una concentración de 2.00 ppm. Esta investigación permitió establecer el protocolo para la obtención de vitroplantas de la especie estudiada.

**Palabras claves:** anturio, callo, brote, organogénesis indirecta, contaminación.

## ABSTRACT

The anthurium (*Anthurium andreanum* L.) is a highly marketable ornamental species as both flower pot and cut flower. The objective of this work was to establish a protocol for indirect organogenesis *in vitro* of anthurium, from leaf sections. The process was developed in three phases: A) Disinfection protocol of the leaves, by applying 4 treatments, based on two concentrations of chlorine (ia) 0.5 and 1%, and two exposure times 10 and 15 min in combination. Explants were used from the central 1 cm<sup>2</sup> of young leaves. The concentration of 1% for 10 min, showed the lowest rates of bacterial and fungal contamination, mortality and phenolization, which is the best option. B) Introduction of the leaf sections, where six doses of Murashige and Skoog basal salt mixture were tested 50 and 100% of macronutrients and three concentrations of BAP (benzylaminopurine) 1, 1.75 and 2.5 ppm in combination, and fixed dose of 2.4-D (0.08 ppm). The explants introduced into the medium with 50% of macronutrients and 1 ppm BAP obtained greater callus formation, an increase in the concentration of macronutrients 100% no greater encouragement in the formation of callus tissue, plus a dose of 1 ppm BAP reduced explant phenolization more. C) Sprout multiplication, which was conducted under 4 treatments were applied, based on 4 BAP concentrations 0, 0.5, 1.25 and 2.00 ppm. Revealing the number of sprouts is greatest at a concentration of 2.00 ppm. This research allowed us to establish protocol for obtaining *in vitro* plants of the targeted species.

**Keywords:** anthurium, callus, sprout, indirect organogenesis, contamination.

**CERTIFICACIÓN**

Ing. Abraham Oleas

Ing. Norman Soria

**Certifican:**

Que el trabajo titulado “ORGANOGÉNESIS INDIRECTA *in vitro* DE ANTURIO (*Anthurium andreanum* L.), A PARTIR DE SECCIONES DE HOJA”, realizado por OSCULLO AVILA MIRIAN BELÉN, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de 1 documento empastado y 1 disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Mirian Belén Oscullo Avila que lo entregue a la Ing. Patricia Falconí, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 19 de Diciembre del 2011

---

Ing. Abraham Oleas.  
**DIRECTOR**

---

Ing. Norman Soria  
**CODIRECTOR**

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

MIRIAN BELÉN OSCULLO AVILA

**Declaro que:**

El proyecto de grado denominado “ORGANOGENESIS INDIRECTA *in vitro* DE ANTURIO (*Anthurium andreanum* L.), A PARTIR DE SECCIONES DE HOJA”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 19 de Diciembre del 2011

---

Oscullo Avila Mirian Belén

## AUTORIZACIÓN

Yo, Oscullo Avila Mirian Belén

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “ORGANOGENESIS INDIRECTA *in vitro* DE ANTURIO (*Anthurium andreanum* L.), A PARTIR DE SECCIONES DE HOJA”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 19 de Diciembre del 2011

---

Mirian Belén Oscullo Avila

## **DEDICATORIA**

A Dios y la Santísima Virgen por ser aliento diario, fortaleza y amor inagotable, durante toda mi vida.

A mis padres José Oscullo y Margarita Avila, que con su esfuerzo, sacrificio y apoyo han sido partícipes de mis logros en todos los ámbitos de mi vida.

A mis amigos Vicky López, Pablo Aguirre y Juan Trujillo, que de una u otra manera han sabido animarme y ser consejo en los momentos difíciles.

A mis maestros que fueron conocimiento y valiosa experiencia, durante mi formación.

*Mirian Oscullo*

## **AGRADECIMIENTO**

A mis padres, por su fuerza, perseverancia y lucha constantes, de quienes guardo grandes valores y por quienes nada sería.

Al Director y Codirector del Proyecto, por sus oportunas recomendaciones para el desarrollo de esta investigación.

A la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y su personal docente, por los conocimientos impartidos.

A la Asociación “Agrobiotech”, que financió un 60% de la investigación y contribuyó con su conocimiento, además de la calidez de todo su personal y colaboración.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron para la elaboración y culminación de esta investigación.

*Mirian Oscullo*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1.	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>5</b>
2.2.	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>5</b>
<b>III.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
3.1.	<b>ANTURIO .....</b>	<b>6</b>
3.2.	<b>ORIGEN.....</b>	<b>6</b>
3.3.	<b>TAXONOMÍA .....</b>	<b>7</b>
3.4.	<b>DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA.....</b>	<b>8</b>
3.5.	<b>CONDICIONES AMBIENTALES.....</b>	<b>10</b>
3.6.	<b>PROPAGACIÓN.....</b>	<b>10</b>
3.6.1.	<b>Propagación por semilla.....</b>	<b>10</b>
3.6.2.	<b>Propagación por hijuelos de tallo.....</b>	<b>11</b>
3.6.3.	<b>Propagación por hijuelos de raíz.....</b>	<b>12</b>
3.6.4.	<b>Propagación por división del tallo.....</b>	<b>12</b>
3.6.5.	<b>Cultivo de tejidos .....</b>	<b>12</b>
3.7.	<b>PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> .....</b>	<b>14</b>
3.7.1.	<b>Etapas 0.....</b>	<b>14</b>
3.7.2.	<b>Etapas I .....</b>	<b>14</b>
3.7.2.1.	<b>Explante.....</b>	<b>15</b>
3.7.2.2.	<b>Protocolo de Desinfección .....</b>	<b>16</b>
3.7.3.	<b>Etapas II.....</b>	<b>17</b>
3.7.4.	<b>Etapas III .....</b>	<b>17</b>
3.8.	<b>CULTIVO DE TEJIDOS <i>in vitro</i> .....</b>	<b>17</b>
3.8.1.	<b>Medios de Cultivo y Componentes.....</b>	<b>18</b>
3.8.1.1.	<b>Constituyentes minerales .....</b>	<b>19</b>
3.8.1.1.1.	<b>Fuente de Carbohidratos o azúcares .....</b>	<b>19</b>
3.8.1.1.2.	<b>Vitaminas.....</b>	<b>20</b>
3.8.1.2.	<b>Reguladores de Crecimiento.....</b>	<b>20</b>
3.8.1.2.1.	<b>Auxinas .....</b>	<b>21</b>
3.8.1.2.2.	<b>Citocininas.....</b>	<b>23</b>
3.8.1.2.3.	<b>Giberelinas .....</b>	<b>25</b>
3.8.1.2.4.	<b>Otros Reguladores de Crecimiento.....</b>	<b>26</b>
3.8.1.3.	<b>Gelificante .....</b>	<b>26</b>
3.9.	<b>VÍAS DE REGENERACIÓN EN CULTIVO DE TEJIDOS <i>in vitro</i> .....</b>	<b>27</b>
3.9.1.	<b>Organogénesis Indirecta .....</b>	<b>27</b>
3.10.	<b>FACTORES LIMITANTES DEL CULTIVO <i>in vitro</i> .....</b>	<b>29</b>
3.10.1.	<b>Fenolización.....</b>	<b>29</b>
3.10.2.	<b>Contaminación.....</b>	<b>29</b>
3.10.2.1.	<b>Contaminación exógena .....</b>	<b>30</b>
3.10.2.2.	<b>Contaminación endógena.....</b>	<b>30</b>
3.11.	<b>CONDICIONES FÍSICAS.....</b>	<b>31</b>
3.11.1.	<b>Iluminación .....</b>	<b>31</b>
3.11.2.	<b>Temperatura .....</b>	<b>32</b>
3.11.3.	<b>Humedad relativa .....</b>	<b>32</b>
3.11.4.	<b>pH.....</b>	<b>32</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1.	<b>UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>33</b>

4.1.1.	Ubicación Política .....	33
4.1.2.	Ubicación Geográfica .....	33
4.1.3.	Ubicación Ecológica.....	33
4.2.	MATERIALES .....	34
4.3.	MÉTODOS.....	34
4.3.1.	Concentración de cloro y tiempo de exposición adecuado para la desinfección e introducción de secciones de hoja de anturio <i>in</i> <i>vitro</i> .....	34
4.3.1.1.	Fase de desinfección .....	35
4.3.1.1.1.	Elección de explantes.....	35
4.3.1.1.2.	Desinfección de los explantes .....	35
4.3.2.	Concentración de macronutrientes MS adecuado y la relación óptima de citocinina/auxina para la fase de introducción. ....	37
4.3.3.	Concentración óptima de N6-bencilaminopurina (BAP).....	40
4.3.4.	Difusión de la información generada en el proyecto de tesis.....	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
5.1.	PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN .....	42
5.2.	FASE DE INTRODUCCIÓN .....	48
5.2.1.	Concentración de macronutrientes MS adecuado y la relación óptima de citocinina/auxina (BAP/2,4-D).....	48
5.3.	FASE DE BROTACIÓN.....	56
5.4.	FASE DE MULTIPLICACIÓN .....	59
5.4.1.	Concentración óptima de N6-bencilaminopurina (BAP).....	59
5.5.	DIFUSIÓN DE LA INFORMACIÓN .....	63
VI.	CONCLUSIONES.....	64
VII.	RECOMENDACIONES .....	66
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	67
IX.	ANEXOS .....	76

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	
<b>4.3.1.1.2.1.</b>	<b>Concentración de cloro y tiempos de exposición para las secciones de hoja de anturio..... 36</b>
<b>4.3.2.1.</b>	<b>Concentraciones de macronutrientes MS y relación BAP/2,4-D, en la fase de introducción..... 38</b>
<b>4.3.3.1.</b>	<b>Concentración de N6-bencilaminopurina (BAP) en la fase de multiplicación ..... 40</b>
<b>5.1.1.</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para contaminación bacteriana y contaminación fúngica en los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L., sujetos a la aplicación de 4 tratamientos de desinfección. .... 43</b>
<b>5.1.2.</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para mortalidad y fenolización en los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L., sujetos a la aplicación de 4 tratamientos de desinfección..... 44</b>
<b>5.2.1.1.</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para contaminación bacteriana, contaminación fúngica, mortalidad, fenolización y presencia de callo en los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. en el medio de introducción, bajo el efecto de la concentración de macronutrientes MS. .... 48</b>
<b>5.2.1.2.</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para contaminación bacteriana, contaminación fúngica, mortalidad, fenolización y presencia de callo en los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. en el medio de introducción, bajo el efecto de las dosis de bencilaminopurina (BAP)..... 49</b>
<b>5.2.1.3.</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para contaminación bacteriana y contaminación fúngica en los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. en el medio de introducción, bajo el efecto de la interacción macronutrientes MS y BAP (ppm). .... 50</b>
<b>5.2.1.4.</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para mortalidad y fenolización en los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. en el medio de introducción, bajo el efecto de la interacción macronutrientes MS y BAP (ppm). .... 51</b>
<b>5.2.1.5.</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para presencia de callo en los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. en el medio de introducción, bajo el efecto de la interacción macronutrientes MS y BAP (ppm). .... 52</b>

5.3.1.	<b>Promedio <math>\pm</math> del error estándar para número de brotes, número de hojas, número de raíces y fenolización en los explantes con callo de <i>Anthurium andreanum</i> L. por unidad experimental (U.E), en el medio de brotación, bajo el efecto de 1 ppm BAP y en ausencia de 2,4-D.....</b>	<b>57</b>
5.4.1.1.	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para longitud de la plantas de <i>Anthurium andreanum</i> L. cultivadas <i>in vitro</i>, en el medio de multiplicación, bajo el efecto de 4 dosis de BAP (ppm).....</b>	<b>59</b>
5.4.1.2.	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para fenolización de las plantas de <i>Anthurium andreanum</i> L. cultivadas <i>in vitro</i>, en el medio de multiplicación, bajo el efecto de 4 dosis de BAP (ppm).....</b>	<b>60</b>
5.4.1.3.	<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar para número de hojas, número de raíces y número de brotes de las plantas de <i>Anthurium andreanum</i> L. cultivadas <i>in vitro</i>, en el medio de multiplicación, bajo el efecto de 4 dosis de BAP (ppm). .....</b>	<b>61</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura</b>	
<b>5.1.1.</b>	<b>Contaminación bacteriana y fúngica de los explantes de Anturio, sujetos a la aplicación de tratamientos de desinfección: T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>..... 43</b>
<b>5.1.2.</b>	<b>Mortalidad y fenolización de los explantes de Anturio, sujetos a la aplicación de tratamientos de desinfección: T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>. ..... 44</b>
<b>5.1.3.</b>	<b>Presencia de contaminación en el ensayo de los protocolos de desinfección A) T<sub>1</sub> (0.5% Cl (i.a) x 10 min), B) T<sub>2</sub> (0.5% Cl (i.a) x 15 min), y C) T<sub>4</sub> (1% Cl (i.a) x 15 min), de <i>Anthurium andreanum</i> L..... 46</b>
<b>5.1.4.</b>	<b>Presencia de fenolización en las secciones de hoja de <i>Anthurium andreanum</i> L., pertenecientes a T<sub>1</sub> (0.5% Cl (i.a) x 10 min)..... 47</b>
<b>5.1.5.</b>	<b>Secciones de hoja de <i>Anthurium andreanum</i> L. sin contaminación a los 49 días de introducción, pertenecientes a T<sub>3</sub> (1% Cl (i.a) x 10 min) ..... 47</b>
<b>5.2.1.1.</b>	<b>Contaminación bacteriana, contaminación fúngica, mortalidad, fenolización y presencia de callo de los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. sujetos a la aplicación de 2 concentraciones de macronutrientes MS: 50 y 100%..... 49</b>
<b>5.2.1.2.</b>	<b>Contaminación bacteriana, contaminación fúngica, mortalidad, fenolización y presencia de callo de los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. sujetos a la aplicación de 3 dosis de bencialaminopurina (BAP) 1, 1.75 y 2.5 ppm..... 50</b>
<b>5.2.1.3.</b>	<b>Contaminación bacteriana y contaminación fúngica de los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. sujetos a la aplicación de 2 concentraciones de macronutrientes MS (50 y 100%) y 3 dosis de BAP (1, 1.75 y 2.5 ppm): T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>..... 51</b>
<b>5.2.1.4.</b>	<b>Mortalidad y fenolización de los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. sujetos a la aplicación de 2 concentraciones de macronutrientes MS (50 y 100%) y 3 dosis de BAP (1, 1.75 y 2.5 ppm): T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>. ..... 52</b>
<b>5.2.1.5.</b>	<b>Presencia de callo de los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. sujetos a la aplicación de 2 concentraciones de macronutrientes MS (50 y 100%) y 3 dosis de BAP (1, 1.75 y 2.5 ppm): T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>..... 53</b>

5.2.1.6.	Callos de <i>Anthurium andreanum</i> a los 90 días de introducción en medios de cultivo con 50% de macronutrientes MS y A) 1 ppm BAP, B) 1.75 ppm BAP, y C) 2.5 ppm BAP.....	55
5.2.1.7.	Callos de <i>Anthurium andreanum</i> L. a los 90 días de introducción en medios de cultivo con 100% de macronutrientes MS y A) 1 ppm BAP, B) 1.75 ppm BAP, y C) 2.5 ppm BAP.....	56
5.3.1.	Brotos en los callos de los explantes de <i>Anthurium andreanum</i> L. durante la fase de brotación (49 días), en ausencia de 2,4-D. ....	58
5.4.1.1.	Longitud de las plantas de <i>Anthurium andreanum</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> , a diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) 0, 0.5, 1.25 y 2.00 ppm en la fase de multiplicación.....	59
5.4.1.2.	Fenolización de las plantas de <i>Anthurium andreanum</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> , a diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) 0, 0.5, 1.25 y 2.00 ppm en la fase de multiplicación. ....	60
5.4.1.3.	Número de hojas, número de raíces y número de brotes de las plantas de <i>Anthurium andreanum</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> , a diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) 0, 0.5, 1.25 y 2.00 ppm en la fase de multiplicación. ....	61
5.4.1.4.	Plantas de <i>Anthurium andreanum</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> , en la fase de multiplicación, a diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP): A) T <sub>0</sub> : 0 ppm BAP, B) T <sub>1</sub> : 0.50 ppm BAP, C) T <sub>2</sub> : 1.25 ppm BAP, y D) T <sub>3</sub> : 2.00 ppm BAP.....	63

## LISTADO DE ANEXOS

## Anexo

- a. Plantas madre de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), donadoras de hojas en estado juvenil, para inducción de organogénesis indirecta *in vitro*. ..... 76
- b. Hoja de Anturio (*Anthurium andreanum* L.) en estado fenológico ideal, para su corte e inducción de organogénesis indirecta *in vitro*. ..... 76
- c. Limpieza superficial de las hojas de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), antes de su ingreso a cámara de flujo laminar. .... 77
- d. Hojas de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), colocadas en abundante agua corriente, para eliminación de residuos de jabón e impurezas, antes de su ingreso a cámara de flujo laminar. .... 77
- e. Separación de las hojas de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), por tratamiento de desinfección : T1 (0.5% Cl (i.a) x 10 min), T2 (0.5% Cl (i.a) x 15 min), T3 (1% Cl (i.a) x 10 min) y T4 (1% Cl (i.a) x 15 min), antes de su ingreso a cámara de flujo laminar. .... 78
- f. Incorporación de cloro y agua destilada estéril, en constante agitación, por tratamiento de desinfección: T1 (0.5% Cl (i.a) x 10 min), T2 (0.5% Cl (i.a) x 15 min), T3 (1% Cl (i.a) x 10 min) y T4 (1% Cl (i.a) x 15 min), en cámara de flujo laminar. .... 78
- g. Corte de los bordes y vena central de las hojas de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), antes de introducirlas al medio de cultivo. .... 79
- h. Corte de las hojas de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), en secciones de 1 cm<sup>2</sup>, para introducirlas al medio de cultivo. .... 79
- i. Introducción de las secciones de 1 cm<sup>2</sup> de hoja de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), en el medio de cultivo. .... 80
- j. Formación de callo en las secciones de hoja de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), a los 90 días de introducción al medio de cultivo. .... 80
- k. Organogénesis indirecta *in vitro* de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), a partir de secciones de hoja. .... 81
- l. Medio de cultivo Murashige-Skoog (1962)..... 81

**NOMENCLATURA UTILIZADA**

AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido naftalen acético
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
AIB	Ácido indol butírico
BAP	Bencilaminopurina
i.a	Ingrediente activo
°C	Centígrados
msnm	Metros sobre el nivel del mar
cm	Centímetro
mm	Milímetro
g	Gramo
mg	Miligramo
ha	Hectárea
kg	Kilogramo
L	Litro
ml	Mililitro
ppm	Partes por millón
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
μM	Micromolar

## I. INTRODUCCIÓN

El anturio (*Anthurium andreaeanum* L.) es una de las especies ornamentales más conocidas de las Aráceas, originaria del norte de los Andes de América del Sur (Sur de Colombia y Norte de Ecuador) (Ruíz, 2000). Su cultivo se desarrolla principalmente en las provincias del Guayas con 139 ha (Celis, 2010), Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, El Oro, Pichincha y Amazonía (Martínez, 2001).

Ecuador tiene mayor aceptación en el mercado Norteamericano y la UE, con anturios que están disponibles en más de 10 colores (Benedictis *et al.*, 2001), altamente apreciada por sus hermosas flores y exótico follaje (Rivero *et al.*, 2008), por lo que su uso se centra principalmente en la parte ornamental (Trujillo *et al.*, 2000). Además presenta actividad biológica notable relacionada al uso de diferentes tipos de extractos vegetales en enfermedades como el cáncer y respuestas fisiológicas como la inflamación (Chen *et al.*, 2003 citados por Salgado, 2007). Las cualidades mencionadas antes hacen que la especie tenga una demanda mundial muy pronunciada y alcance altas cotizaciones en el mercado.

El Anturio dentro de las flores tropicales puede llegar a significar alrededor de 2% del mercado mundial, alcanzando un costo entre 0,18 centavos y 1,00 USD por unidad (Celis, 2010). Se estima que, en México se tiene el valor más alto de las flores en todo el mundo, alcanzando precios de hasta \$ 35.00 por flor (Murguía, 2007).

El productor y comerciante más grande de anturios en el mundo es Holanda, con una producción anual aproximada de 120 millones de tallos (Celis, 2010). Hawaii es la segunda fuente más importante de anturios con 11 millones de tallos (Buldewo, 2002 citado por

Salgado, 2007). La isla Mauricio es la tercera nación con mayor producción de flores de corte de *Anthurium andreanum* en el mundo y abastece alrededor de 10,2 millones de flores anualmente (Prakash, 2005; Buldewo, 2002 citados por Salgado, 2007). Es un cultivo costoso en su inversión pero rentable y productivo todo el año (Murguía, 2007).

El mercado externo está concentrado en España (principal nicho), Inglaterra, Japón, Canadá, Puerto Rico, Islas del Caribe, Panamá y Estados Unidos (Celis, 2010).

En el mercado nacional las flores tropicales y follajes, son considerados como un producto nuevo y atractivo para los diferentes usos decorativos, ha presentado una buena acogida gracias a la variedad que existe (Fundación ALTROPICO, 2005). Además, existen zonas tropicales como Machala, Milagro, Santo Domingo, Tena y Naranjal, que pueden ser utilizadas para expandir este cultivo (Benedictis *et al.*, 2001).

La demanda de este material propagado *in vitro* y de los cultivares nuevos es muy amplia, alcanzando altas cotizaciones de hasta 1,25USD la unidad (planta de anturio), lastimosamente los sistemas de propagación tradicionales no abastecen la demanda para iniciar o renovar una plantación (Fundación ALTROPICO, 2005).

La propagación tradicional por semillas de Anturio es lenta, además requieren de aproximadamente 3 años desde su polinización hasta la producción comercial, pero con este tipo de propagación se tiene el problema de incesto en la plantación élite y aparecen individuos con alta variabilidad genética que afectan negativamente su comercialización. También, se propaga mediante vástagos con raíces aéreas provenientes del tallo principal. Sin embargo, esto propicia la pérdida de individuos por infección de *Xanthomonas*

*campestris* pv. *dieffenbachiae* (Lee *et al.*, 2003), *Xanthomonas axonopodas* pv. *dieffenbachia*, y *Pseudomonas solanacearum* desde su origen en vivero, causando reducciones considerables en el cultivo (ANTHURA, 2007).

Para controlar estos problemas se han realizado varios trabajos de propagación de anturio *in vitro*. Rivero *et al.* (2008), reportan la inducción de embriogénesis somática indirecta en *Anthurium andraeanum* Lind. (Monocotiledónea), usando explantes de segmentos foliares de plantas micropropagadas sobre un medio de cultivo MS modificado suplementado con 6,79  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2,32  $\mu\text{M}$  kin (kinetina). Además, indican la diferenciación de los embriones somáticos en el medio de cultivo MS modificado adicionado 4,44  $\mu\text{M}$  de N6-bencilaminopurina (BAP), en condiciones de oscuridad.

Lee *et al.* (2003), obtuvieron el mayor número de brotes a partir de yemas axilares de *Anthurium andraeanum* L., en medio líquido MS (37,5%) suplementado con 0,8 ppm de N6-bencilaminopurina (BAP), en agitación. Además, probaron medio MS sólido adicionado 0,2 ppm de N6-bencilaminopurina (BAP), que rindieron la mayor proliferación de brotes múltiples por organogénesis directa.

Actualmente, este proceso de regeneración indirecta *in vitro* de anturio (mediada por producción de callo) es una alternativa rápida y eficiente que permite la obtención de plantas sanas, es decir libres de bacterias u hongos (Castellanos *et al.*, 2006). Además, constituye una alternativa para la producción masiva de plantas, sumada a la garantía de homogeneidad genética cuando se parte de explantes apropiados (Lee *et al.*, 2003).

El presente estudio plantea la organogénesis indirecta *in vitro* de secciones de hoja de anturio, como una opción viable para la producción de plantas completas, uniformes y libres de enfermedades. A continuación se experimenta con diferentes reguladores de crecimiento y concentración de macronutrientes MS, en las fases de introducción y multiplicación, para generar material sano, en un lapso corto de tiempo.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo para organogénesis indirecta *in vitro* de anturio (*Anthurium andreanum* L.), a partir de secciones de hoja.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la concentración de cloro y tiempo de desinfección más adecuado, para obtener niveles bajos de contaminación en la fase de introducción.

Determinar la concentración de macronutrientes MS y la relación de citocinina/auxina más adecuados, en la fase de introducción para obtener callos embriogénicos a partir de explantes foliares.

Determinar la concentración óptima de citocinina, mediante la evaluación de tres concentraciones en la fase de multiplicación, que permita la formación de mayor número de brotes.

Difundir los resultados y conclusiones de la investigación mediante la publicación de un artículo científico.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. ANTURIO

El Anturio es una planta ornamental que se distingue por los llamativos colores de su espata, apreciada por su larga vida en florero (15 a 20 días), muy razonable con respecto a otras especies (Fundación ALTROPICO, 2005). Inicialmente, su cultivo y selección se realizaron en Francia y Bélgica, descubierta durante una expedición al oeste de los Andes en Colombia y Ecuador en el año 1876, dando origen mediante hibridaciones a las variedades de flores para corte y maceta (ANTHURA, 2011).

#### 3.2. ORIGEN

El nombre de la variedad *Anthurium* proviene de las palabras griegas anthos y oura, que significan respectivamente “florecimiento” e “inicio” (ANTHURA, 2011), a la que pertenecen cerca de 1000 especies (Rivero *et al.*, 2006), siendo la más conocida en el mercado por su demanda *A. andreanum* Linden, que cuenta con la mayoría de las variedades comerciales (Murguía, 2007).

El anturio (*Anthurium andreanum* L.), es una planta herbácea perenne originaria de los bosques lluviosos de Colombia, Ecuador y América Central (Fundación ALTROPICO, 2005). En su medioambiente, los anturios nacen y crecen sobre la hojarasca del bosque y bajo la sombra de los árboles, donde hay buena humedad y noches frescas, además la planta tiende a pegarse al tallo de los árboles a través de raíces adventicias, y muchas veces asociada a otras epífitas como las orquídeas y bromelias (Murguía, 2007).

### 3.3. TAXONOMÍA

Según Salgado (2007), la clasificación taxonómica del anturio es la siguiente:

Dominio:	<i>Eukaryota</i>
Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Viridaeplantae</i>
Phylum:	<i>Tracheophyta</i>
Subphylum:	<i>Spermatophytina</i>
Infraphylum:	<i>Angiospermae</i>
Clase:	<i>Liliopsida</i>
Subclase:	<i>Aridae</i>
Suborden:	<i>Aranae</i>
Orden:	<i>Arales</i>
Familia:	<i>Araceae</i>
Subfamilia:	<i>Photoideae</i>
Género:	<i>Anthurium</i>
Especie:	<i>Anthurium andreanum</i>

Nombres comunes:	Anturio
	Corazón chino
	Planta del flamenco (Países Bajos)
	Cresta de gallo (América del Sur)
	Cabeza de buey (China)
	Flor de cola (Estados Unidos)

Variedades: *Linden ex André, Schott, Tropical, Avoclaudia, Avonette, Avanti Casino, Lunette, Avoanneke, Limbo, Scorpion, Acrópolis, Fantasía, Cuba, Merengue, Uranus, Paradise, Champion, Alii, New Paho Red, Marian Seefurth, Tatsata Pink, Kalapana, Oshiro Red, Lavender Lady, Mickey Mouse, Oshiro White, Tropic Mist, Rainbow, Blush Oishi, Kozohara, Blush Bride, Nitta, Ozaki, Red Obake, Bettina, Sarah, Plew Thien Phuket, Valantino, Sonat.*

### 3.4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

*Anthurium andraeanum* Linden es una planta perenne y por esta razón permanece viva durante el invierno, con una vida productiva de varios años; es herbácea y epífita. La raíz es fibrosa, cilíndrica, de consistencia carnosa, gruesa, no profundiza mucho en la tierra, blanca, con producción de raíces adventicias. El tallo es erecto, simple, herbáceo cuando joven y semileñoso cuando adulto, llega a crecer hasta 1.5 m. Las hojas son grandes de ápice agudo y borde liso, miden 30 cm de longitud por 20 cm de ancho, con una disposición alternada en el tallo. El pecíolo de la hoja está envuelto por una vaina inserta en el tallo, es largo y de color verde brillante. La flor comercial es una hoja modificada

llamada espata en forma de corazón de alrededor de 5-8 cm de longitud, la cual envuelve a una estructura cilíndrica denominada espádice de aproximadamente 9.5 cm de longitud (Salgado, 2007). El espádice es grueso, de colores rojo, rosado, amarillo, blanco, verde, bicolor y naranja, con 300 florecillas diminutas, aproximadamente, las cuales son blancas, hermafroditas, con un ovario, dos carpelos y cuatro anteras (Murguía, 2007).

Los híbridos producen espatas de color blanco, verde, rosado, rojo salmón, rojos, vinotinto, naranja, rosado y coral, que se clasifican en tres categorías: estándar (coloreada y en forma de corazón simple), el obaki (bicoloreadas de verde con algún otro color en su mayoría producido por antocianinas), y el tipo tulipán (Prakash, 2005 citado por Salgado, 2007). Su textura va de lisa hasta rugosa (Buldewo, 2002 citado por Salgado, 2007).

La planta produce flores todo el año; la secuencia de hoja, flor y nueva hoja se mantiene a través de toda la vida de la planta, y el intervalo entre cada nacimiento de una hoja nueva se acorta o alarga de acuerdo con los cambios en las condiciones ambientales. Durante la primavera y el verano, cuando las condiciones son favorables para el crecimiento, se esperan más flores por planta que durante los meses de invierno, cuando las temperaturas son más bajas y hay menos luz. Los frutos aparecen después de la polinización de las flores como unas protuberancias verrugosas sobre el espádice; éstos son bayas globulosas amarillas o rojas de 0.5 cm que contienen de una a dos semillas pequeñas de 0.03 cm y color amarillo (Murguía, 2007).

### 3.5. CONDICIONES AMBIENTALES

El Anturio es una planta tropical y, por lo tanto, no tolera bien las temperaturas inferiores a 15 °C y las superiores a 30 °C (ANTHURA, 2007), asimismo puede soportar temperaturas extremas de 40 °C, sin embargo los pedúnculos largos y las espatas anchas, representativas de la más alta calidad, se han obtenido a temperaturas de 19 a 22 °C en el aire (Murguía, 2007). Se cultiva para producción comercial a altitudes entre 200 y 2000 msnm (FLORES ORGASMIC, 2010). La intensidad luminosa más apropiada se ubica entre 18000-25000 lux (250-300 Watt), además prefiere un 75% de media sombra, con malla negra o plateada, una fija que proporcione el 60% y una segunda que proporcione el 50% de protección, con una humedad relativa entre el 60 y el 80% (ANTHURA, 2007).

### 3.6. PROPAGACIÓN

Todos los métodos de propagación existentes pueden ser utilizados para multiplicar el anturio, como son la división de plantas, esquejes o “chupones” del rizoma (Trujillo *et al.*, 2000), propagación por acodo e incluso la propagación sexual por semilla, los cuales resultan lentos y poco costeados (Geir, 1986 citado por Ruiz, 2000). A continuación se describen las formas de propagación comúnmente usadas:

#### 3.6.1. Propagación por semilla

*Anthurium andreaum* L. es una especie de flores protóginas. Aunque las plantas son autocompatibles, la polinización cruzada en algunas plantas es preferida para producción comercial de semilla, donde se realiza una selección de plantas “élite” por aspectos como

tamaño, forma de la espata y color (Ruiz, 2000). Sin embargo este es un proceso lento, que lleva hasta tres años desde que se establece la semilla hasta la floración (Murguía, 2007), posteriormente pasan seis o siete meses para que se formen los frutos maduros y se obtenga la semilla (Ruiz, 2000), además su viabilidad es muy corta, presenta una gran variación en la progenie y la fase juvenil es de larga duración (Pierik *et al.*, 1974).

La técnica consiste en presionar con los dedos el fruto maduro, del cual brotan una o dos semillas, que se colocan sobre sustrato en contenedores por 15 a 25 días hasta su germinación en constante humedad, y en los cuales permanecen por un lapso de cuatro meses hasta su traslado a macetas o bolsas, seguidamente se desarrollarán por un tiempo de dos a tres años hasta la aparición de su primera flor (Murguía, 2007). Además no produce semillas en abundancia y las pocas que se obtienen, pierden la viabilidad rápidamente ya que no pueden ser almacenadas por períodos de más de 3 a 4 días (Lee *et al.*, 2003), asimismo la descendencia presenta alta variabilidad genética que afecta negativamente su comercialización (Hamidah *et al.*, 1997 citado por Liendo y Mogollón, 2009). Por esto no es sorprendente que el progreso en el mejoramiento de estas plantas sea muy lento, y que más de un tercio de las plantas semilleras sean descartadas antes de florear (Ruiz, 2000).

### **3.6.2. Propagación por hijuelos de tallo**

Esta forma de propagación es la más rápida, utilizando los hijuelos que brotan del tallo (1 a 8 por año) para una vez que den su primera flor separarlos de la planta, aproximadamente en ocho a diez meses, dependiendo de la variedad y manejo del cultivo (Murguía, 2007).

### **3.6.3. Propagación por hijuelos de raíz**

Para obtener plántulas de la raíz, es necesario dar condiciones óptimas de nutrición, aireación y riego a la planta, para seguidamente cortarlos y sembrarlos cuidadosamente, debido a que son muy tiernos y se deshidratan fácilmente (Murguía, 2007).

### **3.6.4. Propagación por división del tallo**

Este método consiste en seccionar las plantas adultas cuyo tallo sea de más de 40 cm de altura y posea por lo menos cinco nudos. Los mismos que se siembran preferiblemente en forma horizontal sobre un substrato poroso esterilizado. Posteriormente emergerán las raíces de las estacas y cuando broten las primeras hojas se transplantarán al lugar definitivo (Murguía, 2007).

### **3.6.5. Cultivo de tejidos**

La propagación en el laboratorio, también llamada por cultivo de tejidos, permite obtener un gran número de plantas en muy poco tiempo, libres de virus y enfermedades bacterianas o fungosas (Ruiz, 2000).

El cultivo *in vitro* de anturio fue desarrollado inicialmente por Pierik (1974), y posteriormente abordado por otros investigadores (Lee *et al.*, 2003).

Según Geir (1990) citado por Ruiz (2000), en anturio se ha obtenido regeneración de la planta vía callo a partir de tejidos de embriones, explantes de lámina de hoja, peciolo, inflorescencia del tallo, espata y espádice.

Jiménez (1996), empleó hojas jóvenes abiertas, para la propagación clonal *in vitro* de anturio a través de callo u organogénesis indirecta, cortando secciones de 3 cm x 8 cm y de 1.5 cm x 2 cm, sembrados en tubos de ensayo en un medio semisólido de iniciación, constituido de 50% macronutrientes y 100% micronutrientes, suplementado con 1.5 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D y 30 g L<sup>-1</sup> Glucosa, permitiendo su propagación masiva comercial.

Lee *et al.* (2003), obtuvieron el mayor número de brotes a partir de yemas axilares de *Anthurium andreanum* L., en medio líquido MS (37,5%) suplementado con 0.8 ppm de N6-bencilaminopurina (BAP), en agitación. Además, probaron medio MS sólido adicionado 0.2 ppm de N6-bencilaminopurina (BAP), que rindieron la mayor proliferación de brotes múltiples por organogénesis directa.

Rivero *et al.* (2008), reportan la inducción de embriogénesis somática indirecta en *Anthurium andraeanum* Lind. (Monocotiledónea), usando explantes de segmentos foliares de plantas micropropagadas sobre un medio de cultivo MS modificado suplementado con 6.79 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2.32 µM kin (kinetina). Además, indican la diferenciación de los embriones somáticos en el medio de cultivo MS modificado adicionado 4,44 µM de N6-bencilaminopurina (BAP), en condiciones de oscuridad.

Liendo y Mogollón (2009), obtuvieron la mayor tasa de multiplicación *in vitro* del *Anthurium andreanum* “Nicoya”, con medio MS suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, alcanzando 4.17 brotes/explante. Además consiguieron 5.49 raíces por brote y una longitud máxima de 2.59 cm, con medio MS complementado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

### **3.7. PROPAGACIÓN *in vitro***

Este es un método de propagación rápido, que permite obtener un gran número de plantas libres de enfermedades, virus, bacterias u hongos, en muy poco tiempo (Ruiz, 2000). Consta de cinco etapas, que se describen a continuación (Castillo, 2004):

#### **3.7.1. Etapa 0**

Se refiere al mantenimiento de la planta madre, es decir en condiciones sanitarias óptimas, con una nutrición y riego adecuados, para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

#### **3.7.2. Etapa I**

Esta es la etapa de iniciación, donde se realiza el aislamiento estéril de los explantes, eliminando los contaminantes externos como hongos y bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. De ésta manera se puede llevar a cabo un crecimiento y desarrollo sin contaminación para poder establecer el cultivo *in vitro*.

### 3.7.2.1. Explante

Para el establecimiento y desarrollo de cada cultivo se debe seleccionar el explante adecuado (Pierik, 1976 citado por Ruiz, 2000). La elección del explante se basa principalmente, en el objetivo que se persigue y la especie utilizada (Roca y Mroginski, 1991b). Por lo que se debe de tomar en cuenta los siguientes factores:

**Edad de la planta:** la capacidad regenerativa disminuye conforme la planta envejece, por lo que se utiliza material procedente de plantas juveniles. Para la regeneración *in vitro* de *Anthurium andreanum* L., es necesario el uso de tejido joven y aún blando (Geier, 1990).

**Edad del órgano o tejido:** Los tejidos jóvenes son más apropiados para el cultivo que los tejidos viejos y leñosos. En *Anthurium andreanum* se pueden utilizar explantes de órganos jóvenes que están en la parte aérea de la planta, como la vena central de la hoja y el espádice de la inflorescencia (Ruiz, 2000).

**Tamaño del explante:** Mientras mayor sea el fragmento vegetal, más fácil es inducir el crecimiento y la regeneración, debido a que cada fracción aislada tiene su propia porción de reservas y hormonas (Pierik, 1990 citado por Yáñez, 2011).

**Tipo de explante:** La propagación de anturio a través de segmentos de hoja es la más utilizada, ya que da la mayor cantidad de explantes y su desinfección es más eficiente que la espata o el espádice, evitando pérdida general de material por ataque de microorganismos (Geier, 1986 citado por Ruiz, 2000).

### 3.7.2.2. Protocolo de Desinfección

Según Pierik (1990), existen cuatro fuentes de infección: la planta, el medio, el aire y el operador. De estas la más importante es la planta, y por ende el material vegetal debe ser bien esterilizado superficialmente antes de su aislamiento *in vitro*.

En el caso del anturio (*Anthurium andreanum*), la fase crítica para su propagación *in vitro* es la etapa de iniciación. Según Geier (1986), existen distintas formas de llevar a cabo la desinfección en los diferentes tipos de explantes utilizados, sin embargo la mayoría incluyen soluciones con hipoclorito de sodio (NaOCl) como ingrediente activo, por ejemplo: se recomienda sumergir el material en alcohol al 70% por unos segundos, seguido por una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio que contenga 15 g L<sup>-1</sup> de cloro activo y 0.5 ml de Tween por cada 100 ml de solución desinfectante por 10 a 15 min, para finalmente enjuagar tres veces con ADE.

Para las hojas se recomienda lavar su superficie con agua y jabón líquido, y posteriormente en cámara de flujo laminar sumergirlas en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 15 min, con tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución, seguida de tres enjuagues de 2 min cada uno con ADE (INA, 1994 citado por Ruiz, 2000).

Según Pierik (1990), para evitar la contaminación en el cultivo de tejidos (eliminar los microorganismos), se debe utilizar sustancias químicas como Alcohol (etanol); para material vegetal al 70%, Hipoclorito de sodio; en una concentración de 5.25% de ingrediente activo, Tween 80; agente mojante que disminuye la tensión superficial para un mejor contacto superficial del explante con la solución desinfectante.

### **3.7.3. Etapa II**

Es la fase de introducción del material *in vitro*, donde luego de la desinfección superficial del material seleccionado, se coloca en medio de cultivo estéril. Para posteriormente en el lapso de una semana o quince días dependiendo de la especie, comienza la regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

### **3.7.4. Etapa III**

En esta fase se produce la multiplicación de los brotes pertenecientes a los explantes que sobrevivieron a las etapas anteriores, se espera originen brotes con varias hojas, ya que en la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras, de esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas (Castillo, 2004).

## **3.8. CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro***

Este tipo de propagación se basa en la “Totipotencia celular”, que es la capacidad de las células para regenerarse en una planta completa. El cultivo *in vitro* se realiza en estrictas condiciones de asepsia, con medios de cultivo nutritivos y condiciones artificiales controladas, simulando el medio de la planta madre (Jordan y Goreaux, 1990; Reyes y Hewstone, 1994 citados por Toro, 2004).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son la posibilidad de aplicar estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; realizar la bioconversión y producción de compuestos útiles; incrementar la variabilidad genética; obtener plantas libres de patógenos; propagación de plantas; y conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Mroginski, 1991b).

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través del cual un fragmento (explante) de una planta madre, produce una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones.

En especies que responden rápidamente bajo estas condiciones, es posible obtener millones de copias de una misma planta (clones) en el curso de un par de años bajo condiciones de laboratorio (Jordan y Goreaux, 1990 citados por Toro, 2004).

### **3.8.1. Medios de Cultivo y Componentes**

El medio de cultivo es el sustrato donde se va a colocar al explante seleccionado, se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. Su composición depende de la especie vegetal con la que se trabaja, edad de la planta, edad del órgano o tejido, tipo de órgano o tejido que se cultiva y de la etapa del proceso de micropropagación (Castillo, 2004). Además cumple con dos funciones principales: proporciona soporte físico y todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del explante (Cañizares, 1998).

Para el cultivo *in vitro* de anturios, se utiliza generalmente el medio derivado de la fórmula de Murashige & Skoog, utilizando la mitad de los macroelementos, el total de los microelementos y hierro, glucosa y las hormonas BAP y 2,4-D son modificadas en cada etapa de crecimiento y desarrollo (Geier, 1990 citado por Ruiz, 2000).

### **3.8.1.1. Constituyentes minerales**

Los medios de cultivo deben contener todos aquellos elementos esenciales para el explante, compuesto generalmente por macro o microelementos. Se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) que son esenciales de los tejidos vegetales e intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas, y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl) que participan en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas (Bengoa, 1990 citado por Toro, 2004).

#### **3.8.1.1.1. Fuente de Carbohidratos o azúcares**

Entre los compuestos orgánicos, la sacarosa es el azúcar que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa; usualmente la maltosa y la galactosa son menos efectivas (Roca y Mroginski, 1991a).

Se sabe que la ausencia de azúcares se convierte en un factor limitante en la organogénesis de los tejidos, presentando una acción metabólica y energética, siendo esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, debido a que en éstas condiciones muy pocos cultivos son autótrofos. La sacarosa es generalmente la fuente carbonada que se utiliza en los estudios de organogénesis, sin embargo en algunas ocasiones se ha sustituido por la glucosa o

fructosa. Además una dosis de sacarosa de 20 a 60 g L<sup>-1</sup> se recomienda para un buen desarrollo en cultivo de callos (Kenneth y Torres, 1989 citados por Cañizares, 1998).

#### **3.8.1.1.2. Vitaminas**

Las vitaminas son requeridas como catalizadores en varios procesos metabólicos (Torres, 1988 citado por Toro, 2004). Favorecen el crecimiento de las células de plantas superiores y la diferenciación de los callos, por lo que pueden llegar a ser un factor limitante. Entre las vitaminas utilizadas para el cultivo *in vitro* están: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y myo-inositol (Cañizares, 1998 citado por Yáñez, 2011).

Otras vitaminas (ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina) pueden ser útiles pero no absolutamene necesarias. También se utiliza el ácido cítrico y el ácido ascórbico, pero no como vitaminas sino como antioxidantes, retrasando el efecto de la oxidación fenólica (González, 2003 citado por Vaca, 2008).

#### **3.8.1.2. Reguladores de Crecimiento**

Los reguladores de crecimiento representan un conjunto de productos sintéticos con una actividad semejante a las hormonas. Estos son responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza, además de determinar el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta, por lo que se puede decir que el cultivo de tejidos *in vitro* es casi imposible sin reguladores (Pierik, 1990 citado por Ruíz, 2000). Según Geir (1990) sobre inducción de callo demuestran que el cultivo en *Anthurium andreanum*, en ausencia de hormonas no muestra formación de callo.

Las sustancias reguladoras de crecimiento que generalmente se usan en la mayoría de los casos son del tipo de las auxinas o las citocininas, y en menor grado otros reguladores (Roca y Mroginski, 1991b).

#### **3.8.1.2.1. Auxinas**

El nombre auxina significa en griego “crecer” y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. Existen varias auxinas naturales, tales como el AIA (ácido indolacético), indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, entre otras. De éstas el AIA es el compuesto de mayor utilización (Scott, 1984 citado por Krikorian, 1991). Las auxinas sintéticas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB). Estas generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) formación de raíces adventicias, proliferación axilar y adventicia (Ruiz, 2000).

El ácido indol-3-acético (AIA), es la principal auxina endógena, sintetizada en la planta a partir del L-triptofano, que puede estar libre o formando parte de proteínas. Los principales lugares de síntesis son los ápices de coleótilos de las gramíneas, en meristemos apicales de tallos y, en menor proporción de las raíces, también en embriones y en hojas jóvenes, flores y frutos. Afectan al crecimiento del tallo, las hojas y las raíces, al desarrollo de ramas laterales y elongación de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución (Lucas, 2002). Además hay otros muchos procesos de correlación, como la dominancia apical,

diferenciación celular, activación del cambium vascular, desarrollo del sistema radicular y aéreo, crecimiento de los frutos (biosíntesis de etileno, cuaje y maduración), formación de flores, frutos (partenocárpicos), raíces y semillas, efectos sobre el fototropismo y el gravitropismo, inhibición de la abscisión y control de malas hierbas (García, 2000). El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejido fue posible gracias a la acción de las auxinas sobre la división celular.

No es posible establecer una concentración particular de la auxina, sin embargo en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg L<sup>-1</sup>, siendo un punto óptimo entre 0.1 a 1 mg L<sup>-1</sup> (Krikorian, 1991).

El AIB (ácido indolbutírico), es la hormona más utilizada para la multiplicación asexual de plantas (estacas, esquejes, etc), elongación celular, expansión de los tejidos y división celular (formación de callo), por su estabilidad y poca movilidad. Además es ampliamente utilizada en la agricultura para enraizamiento (Pierik, 1990 citado por Ruiz, 2000).

El ANA (ácido naftalenacético) es un miembro de la clase de hormonas conocidas como auxinas sintéticas, utilizado en cultivos que requieren inducir la caída de frutos, ya sea para una eliminación parcial de frutos jóvenes y reducir la competencia, o para mejorar los tamaños (manzana, pera). Además se utiliza para promover el crecimiento y diferenciación celular, floración, senectud e inducir la formación de raíces en los callos no diferenciados (Gonzalez *et al.*, 1999). Generalmente se utiliza en concentraciones entre 1 a 10 mg L<sup>-1</sup>, con un punto óptimo de 2 mg L<sup>-1</sup> (Krikorian, 1991).

El 2,4-D es la auxina sinética más efectiva para promover callogénesis, además puede utilizarse para inhibir la caída de frutos en etapa madura, aplicando la auxina a frutos cercanos a maduración, y así evitar su caída prematura por liberación natural de etileno antes de la cosecha, esto se basa en una competencia hormonal auxina-etileno para inducir o inhibir la formación de la zona de abscisión en el pedúnculo de los frutos. Se utiliza en concentraciones que varían de 0.1 a 10 mg L<sup>-1</sup>, con un óptimo de 1 a 5 mg L<sup>-1</sup>. Y cuando se usan en concentraciones altas tienen propiedades herbicidas en algunas plantas (Lucas, 2002).

#### **3.8.1.2.2. Citocininas**

Las citocininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular, son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemas en la punta de las raíces, donde son translocadas a través del xilema hasta el brote. Las mayores concentraciones se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo (Gonzales *et al.*, 1999).

Existen dos grupos de importancia por grupos químicos: los conformados a base de adeninas y los que son a base de fenilureas. De las primeras se han identificado a la Benciladenina, Kinetina, Isopenteniladenina (IPA), Dihidrozeatina y Zeatina, de ésta última se derivan la Ribofuranosilzeatina, la Glucopiranosida de Zeatina, entre otras. Del segundo tipo se encuentran la Difenilurea y algunos derivados como Forclorfenurón (CPPU) o Tidiazurón (TDZ); (Soberón *et al.*, 2005).

Estas hormonas estimulan la división celular y el crecimiento, inhiben el desarrollo de raíces laterales, rompen la latencia de las yemas auxiliares, promueven la organogénesis en

los callos celulares, promueven la expansión celular en cotiledones y hojas, originan la maduración de los cloroplastos y retrasan la senescencia de los órganos vegetales (Ruiz, 2000).

La kinetina (KIN (6-furfunil aminopurina)), es una sustancia estimuladora de la división celular, se han aislado varias sustancias relacionadas partir de preparaciones de ADN, sin embargo no se ha podido demostrar que esté presente como un compuesto natural. La KIN se usa en concentraciones de 0.1 a 2 mg L<sup>-1</sup>, en conjunto con AIA y 6-anilinopurina (Krikorian, 1991)

La zeatina (N-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil) aminopurina), fue la primera citocinina natural aislada, obtenida de granos de maíz (*Zea mays*), de la cual se derivan otras citocininas activas como la ribofuranosilzeatina y la glucopiranosida de zeatina (Soberón *et al.*, 2005). Es considerada el prototipo de las adenilcitocininas, ésta es hasta diez veces más potente que la KIN (Vaca, 2008). La zeatina se utiliza generalmente en concentraciones similares al BAP, sin embargo se utiliza con más frecuencias a niveles más bajos por ser bastante activa (Krikorian, 1991).

La N6-bencilaminopurina (BAP), es una citocinina sintética recientemente aislada de forma natural y utilizada con mayor frecuencia que la KIN o la ZEA, por su alta actividad y costo razonable (Krikorian, 1991).

Según Lee *et al.* (2003), la mejor brotación en la fase de establecimiento y multiplicación, con cinco a ocho brotes por explante, se produce al suplementar 0.8 mg L<sup>-1</sup> de BAP en agitación rotatoria.

La adenina sulfato fue usada por primera vez para el crecimiento de explantes de tabaco, para la estimulación de formación de vástagos adventicios. Esta se ha utilizado en concentraciones que varían entre 2 a 120 mg L<sup>-1</sup> (Pierik, 1990 citado por Yáñez, 2011).

En Anturio se ha reportado la inducción a partir de hojas de embriones somáticos, especialmente bajo la adición de sulfato de adenina, ya que favorece la formación de estructuras embriogénicas (Salgado, 2007).

### 3.8.1.2.3. Giberelinas

El ácido giberélico (AG), fue aislado a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, siendo la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta (Krikorian, 1991). Existen varios tipos de giberelinas, siendo las más comunes: GA1, GA3, GA4, GA7 y GA9. Estas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo (Gonzalez *et al.*, 1999). Las principales funciones que cumplen son incrementar la tasa de división celular (mitosis), aumentar el crecimiento en los tallos, interrumpir el período de latencia de las semillas, inducir la brotación de yemas, promover el desarrollo de los frutos y estimular la síntesis de RNAm. Además pueden tener un papel en el proceso organogénico, sin embargo en varias especies estos reguladores de crecimiento juegan un papel represivo o no tienen efectos en la formación de órganos *in vitro* (Toro, 2004).

La concentración de AG varía entre 0.01 a 1 mg L<sup>-1</sup> con un punto óptimo alrededor de 0.1 mg L<sup>-1</sup>. Además el AG (25 mg L<sup>-1</sup>) en conjunto con el AIA (1 mg L<sup>-1</sup>) estimula la formación de callo (Krikorian, 1991).

#### 3.8.1.2.4. Otros Reguladores de Crecimiento

El etileno o eteno,  $\text{CH}_2\text{:CH}_2$ , es el hidrocarburo insaturado más sencillo. Es un gas incoloro e inflamable, con olor débil y agradable. Se halla en forma natural en las plantas, reconocida como la fitohormona responsable de la maduración, abscisión, senescencia, dormancia, floración y otras respuestas. Es biosintetizado a partir de la S-Adenosil Metionina (SAM), producido por todas las partes vivas de las plantas superiores, la tasa varía con el órgano y tejido específicos, su estado de crecimiento y desarrollo (Gonzalez *et al.*, 1999).

El Ácido abscísico (ABA), conocido anteriormente como dormina o abscisina, es considerado como un inhibidor del crecimiento natural presente en plantas (Gonzalez *et al.*, 1999), generalmente produce efectos negativos en el cultivo *in vitro* (Pierik, 1990 citado por Vaca, 2008).

#### 3.8.1.3. Gelificante

En el cultivo de anturio el medio a utilizar debe ser sólido, para que haya crecimiento y diferenciación de órganos (Pierik, 1990). El agar disuelto forma un gel que es capaz de retener agua y absorber compuestos, la concentración habitual es de 0.6 – 0.8%, sin embargo las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Ruiz, 2000).

### **3.9. VÍAS DE REGENERACIÓN EN CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro***

Existen diferentes métodos de propagación vegetativa *in vitro*, entre éstos se incluyen: esquejes de segmentos nodales, ramas axilares, generación de órganos adventicios (raíces o vástagos) sobre explantes, formación de embriones somáticos sobre callo, y regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares y protoplastos (Pierik, 1990 citado por Ruiz, 2000).

Para la formación de órganos adventicios, se conocen dos procesos: organogénesis directa, en la que del explante se originan directamente brotes o raíces, y organogénesis indirecta, en la que hay formación de callo a partir del explante, y de este tejido calloso se originan los brotes y raíces (Pierik, 1990 citado por Ruiz, 2000). La organogénesis indirecta o regeneración de órganos a partir de callo, consta de las siguientes etapas:

- Desdiferenciación de células diferenciadas.
- División celular, seguida por formación de callo.
- Formación de órganos.
- Desarrollo de órganos (Pierik, 1990).

#### **3.9.1. Organogénesis Indirecta**

Un callo es un tejido tumoral, que surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. Por lo que se denomina inducción de callo al inicio de su formación. Si en el explante diferenciado solo existen células diferenciadas, es necesario producir una desdiferenciación, antes de que tenga lugar la división celular, siendo las células

parenquimáticas las que generalmente pueden sufrir este proceso. La dediferenciación, permite que las células del explante de una planta adulta presenten una redefinición. En este proceso, las células adultas son capaces de pasar de su forma adulta a la forma juvenil. Después de la dediferenciación, las células se empiezan a dividir rápidamente bajo la influencia de reguladores de crecimiento, lo que da lugar al callo (Pierik, 1990 citado por Ruiz, 2000).

Según Geir (1990), cualquier órgano (raíz, tallo, hoja, flor, etc.) puede ser usado como material inicial para la inducción de callo. El material inicial y la posición del explante sobre la planta madre, pueden tener una gran influencia en procesos como la división celular y la formación de callo.

Para comenzar con la formación de callos a partir de un explante es necesario agregar reguladores exógenos al medio de cultivo. Éste regulador exógeno a aplicar dependerá del genotipo del explante y de su contenido de hormonas endógenas. Según Pierik (1990) estas necesidades pueden dividirse en tres categorías:

1. Solo se necesitan auxinas.
2. No se requieren más que citocininas.
3. Se precisan tanto auxinas como citocininas.

Otros factores importantes para la formación de callo son el genotipo, el medio nutritivo, factores físicos de crecimiento como luz y temperatura.

Además se debe considerar que un callo es un tejido de crecimiento rápido y fácil de cultivar. Si se van a utilizar los callos como medio de propagación vegetativa de plantas, deben de reunir los siguientes requisitos:

- No deben de perder su potencial regenerativo después de varios repicados.
- Debe ser estable genéticamente.
- El material obtenido debe ser idéntico a la planta madre en la medida que sea posible (Ruiz, 2000).

### **3.10. FACTORES LIMITANTES DEL CULTIVO *in vitro***

#### **3.10.1. Fenolización**

La Fenolización es el pardeamiento que se presenta con mayor frecuencia en explantes de especies leñosas, se relaciona con la liberación al medio y oxidación de polifenoles, es producido por acción de enzimas oxidasas que contienen cobre, como las polifenoloxidasas y las tirosinasas que se liberan al herirse los tejidos, dando como resultado compuestos quinónicos altamente activos y tóxicos para el explante (Seemann y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004).

#### **3.10.2. Contaminación**

La contaminación de los explantes se puede presentar en forma exógena por una inadecuada esterilización del material vegetal o en forma endógena cuando existen contaminantes sistémicos difíciles de eliminar (Seemann y Barriga, 1993 citados por Toro,

2004). Según Roca y Mroginski (1991b), las fuentes de donde proceden los contaminadores son: el explante (tejido), el medio, el aire y el investigador; siendo la más importante el material vegetal.

#### **3.10.2.1. Contaminación exógena**

La contaminación que el explante lleva en su superficie se puede eliminar mediante un eficiente protocolo de desinfección, generalmente se hace uso de soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones de 1 a 3%, es una de las preparaciones más útiles como germicida, se lo ha utilizado durante muchos años como esterilizante superficial en los tejidos, siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora. Como esterilizante superficial también se utiliza la solución de bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), sin embargo es altamente tóxico y se debe utilizar con cautela en una solución acuosa entre 0.1 a 1.5% (p/v) por 3 a 10 minutos. También se puede hacer uso de desinfectantes como el yodo, fungicidas, y otros bactericidas de naturaleza química (Roca y Mroginski, 1991b).

#### **3.10.2.2. Contaminación endógena**

Esta se produce cuando los contaminantes se encuentran dentro del tejido y por ende son difíciles de eliminar. En este caso puede ser útil la inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo; el sulfato de gentamicina, la penicilina y el sulfato de estreptomicina (10 a 50 mg L<sup>-1</sup>), son algunos de los productos de amplio espectro que se pueden utilizar (Roca y Mroginski, 1991b).

El cultivo de tejidos incrementa el promedio de multiplicación normal de las plantas y puede considerarse como una fuente de material limpio, ya que está libre de bacterias y otras enfermedades como la antracnosis, decadencia, mancha de la hoja y nudo de raíz (Puchooa, 2003 citado por Salgado, 2007).

### **3.11. CONDICIONES FÍSICAS**

La organogénesis puede estar afectada por una gran variedad de factores como la luz, temperatura, humedad relativa, y pH (Toro, 2004).

#### **3.11.1. Iluminación**

Generalmente en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa esta compuesta de lámparas fluorescentes (del tipo “luz de día”) y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación (Roca y Mroginski, 1991a).

Los *Anthurium* necesitan un mínimo de 150 pies/candela (ft/c) en los interiores, pero son producidos bajo 1500 a 2500 (ft/c); (Pataky, 2001 citado por Salgado, 2007).

El fotoperíodo afecta la morfología en el linaje de la planta el cual es relativo a las respuestas del explante durante los siguientes cultivos. También puede afectar los niveles internos de los reguladores de crecimiento, usualmente 12 a 16 horas con 1000 a 3000 lux es suficiente para inducir la organogénesis. Además el fotoperíodo, cantidad e intensidad de luz pueden ser críticos para la formación de brotes en algunas especies (Ruiz, 2000), al igual que la calidad de la luz especialmente la roja y la roja intensa también afectan los

procesos hormonales y consecuentemente los resultados *in vitro* (Adelheid, 1992 citado por Salgado, 2007).

### **3.11.2. Temperatura**

En general, temperaturas entre 25 y 28 °C son adecuadas para el establecimiento de los cultivos, sin embargo la temperatura óptima del cuarto de crecimiento se encuentra entre 20-28 °C. La regulación de ésta se puede lograr mediante un sistema de aire acondicionado, alarmas y controles (Roca y Mroginski, 1991a).

### **3.11.3. Humedad relativa**

Dentro del cuarto de crecimiento, la humedad relativa debe ser entre 70 – 80%, ya que valores más bajos, usualmente provocan una desecación del medio de cultivo (Seemann y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004).

### **3.11.4. pH**

El pH es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de explantes *in vitro*, de forma general se recomienda ajustar el pH entre 5.5 y 5.8 ya que un pH más bajo suele producir inestabilidad de AIA, giberelinas, vitamina B1 y ácido pantoténico (Quak, 1977 citado por Toro, 2004). Además favorece la precipitación de sales de fosfato y sales férricas, por lo que un pH de 5.7 a 5.8 es adecuado para mantener todas las sales en forma soluble (Murashige y Skoog, 1962).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

#### **4.1.1. Ubicación Política**

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Asociación “Agrobiotech”, ubicada en Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia Selva Alegre, localizada a 78°25’56.02’’(O) y 0°20’35.44’’(S), a una altitud de 2526 msnm. Con una temperatura promedio de 21°C, y una humedad relativa del 45%.

#### **4.1.2. Ubicación Geográfica**

El laboratorio de la Asociación “Agrobiotech” se encuentra en una posición geográfica de 78°25’56.02’’(O) y 0°20’35.44’’(S), a una altitud de 2526 msnm.

#### **4.1.3. Ubicación Ecológica**

Los laboratorios de la Asociación “Agrobiotech”, se encuentran en una ubicación ecológica correspondiente a una zona de vida de bosque húmedo pre-montano, a una altitud de 2526 msnm con una temperatura entre 20.06° a 8.08°, una temperatura promedio de 16.35° y una precipitación de 1200 mm/año. El cuarto de crecimiento del laboratorio de cultivos vegetales posee un ambiente controlado, con una temperatura promedio de 21°C, y una humedad relativa del 45%.

## 4.2. MATERIALES.

Se utilizaron los siguientes equipos y materiales: cámara de flujo laminar, cámara de crecimiento, autoclave, estufa, balanza analítica, agitador, pHmetro, destilador de agua, refrigerador, cajas petri, frascos de vidrio, tarrinas de plástico transparentes, botellas, probetas, bandejas, pinzas, tijeras, mechero, bisturí y atomizador.

Los reactivos utilizados fueron: yodo, Benlate, hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio, ácido peracético, peróxido de hidrógeno, macroelementos MS, microelementos MS, Myo-inositol, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, glycina, sucrosa, agar, oxitetraciclina, N6-bencilaminopurina (BAP) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Los insumos utilizados fueron: explantes de anturio (secciones de hoja de 1 cm<sup>2</sup>), tijera podadora, guantes de caucho, papel periódico, papel aluminio, papel toalla, fundas de plástico, mascarillas, fungicidas (Benlate), cinta masking, etiquetas, cubetas, jeringuillas, bisturís, regla, marcadores, jabón antibacterial líquido, cloro, Tween 20, Tween 80, alcohol, cloro, detergente y agua destilada estéril (ADE).

## 4.3. MÉTODOS

### 4.3.1. Concentración de cloro y tiempo de exposición adecuado para la desinfección e introducción de secciones de hoja de anturio *in vitro*.

El material vegetativo se obtuvo de las plantas de anturio pertenecientes a los laboratorios de la Asociación Agrobiotech.

Para el desarrollo de esta investigación se consideraron las siguientes fases: desinfección, introducción, brotación y multiplicación. Se utilizó como medio basal en todas las fases, el compuesto por las sales inorgánicas del medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog (1962), referidas como sales MS, modificando solo las concentraciones de citocininas y auxinas en cada fase.

Los explantes cortados fueron desinfectados e introducidos en el medio, donde permanecieron 49 días para su evaluación, para posteriormente cambiarlos al medio de brotación y multiplicación respectivamente.

#### **4.3.1.1. Fase de desinfección**

##### **4.3.1.1.1. Elección de explantes**

Se contó con plantas adultas de *Anthurium andreaenum* Lind. de la variedad “Sonate”, que crecían en condiciones controladas dentro de un invernadero, y de las cuales se obtuvieron hojas jóvenes aún blandas que tengan entre 50 y 70% del largo definitivo, ya que tienen mayor capacidad de regeneración.

##### **4.3.1.1.2. Desinfección de los explantes**

Una vez seleccionadas, se procede a lavar las hojas con agua y jabón líquido limpiando el limbo suavemente con una esponja para eliminar polvo e impurezas, posterior a esto se las coloca en abundante agua corriente para quitar residuos de jabón.

Inmediato al ingreso del material a la cámara de flujo, se debe sumergir las hojas en una solución de cloro agitando suavemente; en esta fase se evaluaron cuatro tratamientos de desinfección, que consistieron en la interacción de diferentes concentraciones de cloro y tiempos de exposición (Cuadro 4.3.1.1.2.1), luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar todo residuo del agente desinfectante, para una vez desinfectadas las hojas, cortarlas en segmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y finalmente introducirlas en medio MS basal, colocándolas de forma que las tres cuartas partes queden sumergidas en el medio de cultivo.

**Cuadro 4.3.1.1.2.1. Concentración de cloro y tiempos de exposición para las secciones de hoja de anturio.**

<b>Tratamientos</b>	<b>% Cloro (i.a)</b>	<b>Tiempo de exposición (min.)</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>
<b>T<sub>1</sub></b>	0,5	10	Montes <i>et al.</i> , 2004
<b>T<sub>2</sub></b>	0,5	15	Cuéllar, 2008
<b>T<sub>3</sub></b>	1	10	Atak y Celik, 2009
<b>T<sub>4</sub></b>	1	15	Com. Per. Daquinta, 2010. <sup>1</sup>

Las variables que se evaluaron durante la fase de introducción, fueron: porcentaje de fenolización, porcentaje de contaminación bacteriana, porcentaje de contaminación fúngica y porcentaje de mortalidad. Las evaluaciones se realizaron una vez cada 7 días por 7 ocasiones.

<sup>1</sup> Daquinta, M. 2010. Multiplicación *in vitro* de anturio (entrevista). Selva alegre-Ecuador. Servicios Agrobiotecnológicos, AGROBIOTECH.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar y se contó con cuatro repeticiones por tratamiento.

La unidad experimental fué un contenedor de plástico transparente de 8.5 cm de diámetro y 5.5 cm de alto, con cuatro segmentos de hoja de anturio de 1 cm<sup>2</sup>, en medio MS basal.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ij} = u + C_i + T_j + (CT)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = variable aleatoria

$u$  = media general

$C_i$  = efecto del i-ésimo de la concentración de cloro

$T_j$  = efecto del j-ésimo del tiempo de exposición

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental

#### **4.3.2. Concentración de macronutrientes MS adecuado y la relación óptima de citocinina/auxina para la fase de introducción.**

Para determinar la concentración de macronutrientes MS adecuado y la relación óptima de citocinina/auxina en la fase de introducción, se evaluaron seis tratamientos, donde se ensayaron dos concentraciones de macronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962), y tres relaciones de citocinina/auxina (Cuadro 4.3.2.1), los mismos que poseen como base la adición de 30 g L<sup>-1</sup> de sucrosa, y 4.5 g L<sup>-1</sup> de agar, manteniendo un pH entre 5.6 a 5.8.

Los medios fueron esterilizados en autoclave, y se dispensó en cámara de flujo laminar, alrededor de 70 ml en cada contenedor transparente de 0.5 L.

**Cuadro 4.3.2.1. Concentraciones de macronutrientes MS y relación BAP/2,4-D, en la fase de introducción.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Macronutrientes (MS)</b>	<b>Concentración de BAP</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>
<b>T<sub>1</sub></b>	50%	1	Jiménez, 1996
<b>T<sub>2</sub></b>	50%	1.75	Montes <i>et al.</i> , 2004
<b>T<sub>3</sub></b>	50%	2.5	Rivero <i>et al.</i> , 2008
<b>T<sub>4</sub></b>	100% + NO <sub>3</sub> 50%	1	Jiménez, 1996
<b>T<sub>5</sub></b>	100% + NO <sub>3</sub> 50%	1.75	Montes <i>et al.</i> , 2004
<b>T<sub>6</sub></b>	100% + NO <sub>3</sub> 50%	2.5	Rivero <i>et al.</i> , 2008

Las concentraciones de reguladores de crecimiento que se probaron en cada uno de los medios antes mencionados son: N6-bencilaminopurina (BAP) 1, 1.75 y 2.5 mg L<sup>-1</sup>; y el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) se empleó en dosis fija de 0.08 mg L<sup>-1</sup>.

Posteriormente, se realizó la introducción de las secciones de hoja desinfectadas, en cámara de flujo laminar, de tal manera que el haz se encuentre en contacto con el medio y las tres cuartas del mismo queden sumergidas en este.

Las variables tomadas en este ensayo fueron: presencia de callo, días a la aparición del callo, porcentaje de contaminación fúngica, porcentaje de contaminación bacteriana, porcentaje de fenolización y porcentaje de mortalidad. Los datos se tomaron una vez cada 7 días por 7 ocasiones.

El tipo de diseño fue completamente al azar, con arreglo factorial 2 x 3, y se contó con cuatro repeticiones por tratamiento.

La unidad experimental fué un contenedor de plástico transparente de 8.5 cm de diámetro y 5.5 cm de alto, con diez segmentos de hoja de anturio.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijk} = u + C_i + R_j + (CR)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = variable aleatoria

$u$  = media general

$C_i$  = efecto del i-ésimo de la concentración de macronutrientes

$R_j$  = efecto del j-ésimo de la relación citocina/auxina

$(CR)_{ij}$  = Interacción Concentración - Relación

$\varepsilon_{ijk}$  = error experimental

Los explantes provenientes de la fase de introducción, que formaron callo, pasaron al medio de brotación, mismo que fue previamente seleccionado en función de los resultados de la fase de iniciación, en ausencia de 2,4-D. En esta fase no se evaluaron concentraciones de reguladores de crecimiento, únicamente se tomó las siguientes variables: día a la aparición de brotes, número de brotes formados, número de hojas y número de raíces. Se realizó una toma de datos cada 7 días hasta completar 7 evaluaciones. Los resultados y conclusiones se expondrán posteriormente.

### 4.3.3. Concentración óptima de N6-bencilaminopurina (BAP).

Las vitroplantas que formaron dos o más hojas y tenían una altura aproximada de 1 cm o más, fueron separadas del explante en el medio de brotación y pasadas al medio de multiplicación, a razón de diez vitroplantas por unidad experimental. En esta fase se evaluaron tres concentraciones de N6-bencilaminopurina (BAP), para determinar la concentración óptima que permita la mayor formación de brotes por explante (Cuadro 4.3.3.1). Los explantes permanecieron en la fase de multiplicación por 49 días.

**Cuadro 4.3.3.1. Concentración de N6-bencilaminopurina (BAP) en la fase de multiplicación.**

Tratamiento	Concentración de BAP (ppm)	Referencia Bibliográfica
T <sub>1</sub>	0,50	Ruiz, 2000
T <sub>2</sub>	1,25	Com. Per. Vaca, 2010 <sup>2</sup>
T <sub>3</sub>	2,00	Montes <i>et al.</i> , 2004

Las variables medidas fueron: número de brotes por explante, formación de hojas, fenolización, porcentaje de contaminación fúngica, porcentaje de contaminación bacteriana y porcentaje de mortalidad. Se realizó una toma de datos cada 7 días, hasta completar 7 evaluaciones.

El ensayo se dispuso bajo un diseño completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento.

<sup>2</sup> Vaca, I. 2010. Multiplicación *in vitro* de anturio (entrevista). Selva alegre-Ecuador. Servicios Agrobiotecnológicos, AGROBIOTECH.

La unidad experimental fue un contenedor de plástico transparente de 8.5 cm de diámetro y 5.5 cm de alto, con diez explantes (vitroplantas), provenientes de la fase de brotación.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ij} = u + B_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = variable aleatoria

$u$  = media general

$B_i$  = efecto del  $i$ -ésimo del BAP

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental

#### **4.3.4. Difusión de la información generada en el proyecto de tesis.**

Con la información generada se está editando un artículo científico, que se impartirá a los interesados, a manera de boletín técnico.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN

Para determinar el protocolo de desinfección más adecuado se realizó el análisis de los datos obtenidos mediante la aplicación de cuatro protocolos seleccionados durante la investigación, bajo el criterio del análisis de varianza. La toma de datos se realizó a los 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días posteriores a la introducción de los explantes al medio de cultivo (Cuadro 5.1.1).

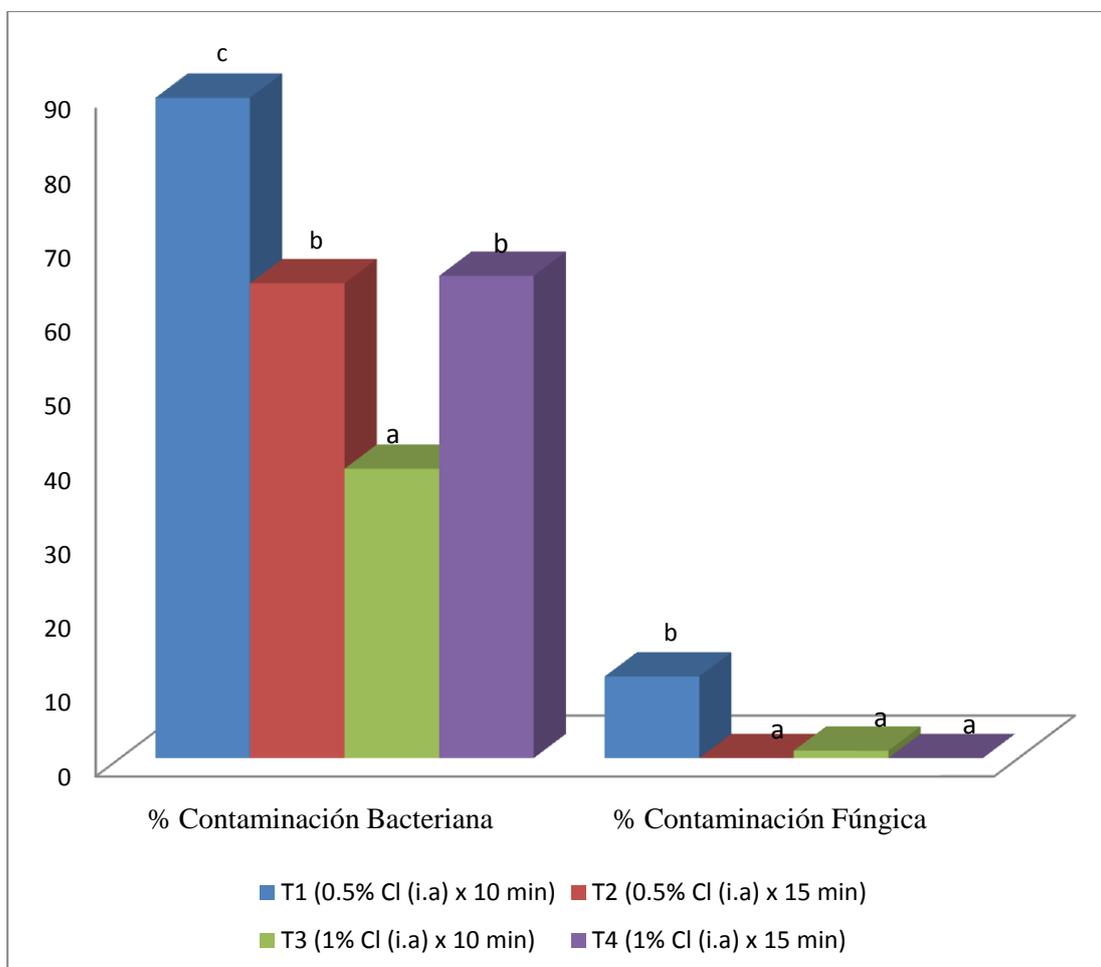
El análisis estadístico revela que el protocolo de desinfección T<sub>3</sub> (1% Cl (i.a) x 10 min), presentó contaminación bacteriana en menor grado, y los explantes sujetos a la aplicación de los protocolos T<sub>2</sub> (0.5% Cl (i.a) x 15 min) y T<sub>4</sub> (1% Cl (i.a) x 15 min) presentaron contaminación bacteriana de grado intermedio; sin embargo, menor que la observada en los explantes de anturio sujetos a la aplicación del protocolo T<sub>1</sub> (0.5% Cl (i.a) x 10 min).

Los diferentes productos afines que intervinieron en los protocolos de desinfección muy probablemente coadyuvaron en su eficacia, demostrando que la desinfección inicial con jabón líquido, tintura de yodo, Benlate 1 g L<sup>-1</sup>, peróxido de hidrógeno 3 ml L<sup>-1</sup> y ácido peracético 3 ml L<sup>-1</sup>; en el exterior de la cámara, más el protocolo T<sub>3</sub> (1% Cloro (i.a) x 10 min); en cámara de flujo laminar, fue el más adecuado para la introducción del material vegetativo de *Anthurium andreanum* L (Figura 5.1.1).

**Cuadro 5.1.1. Promedio  $\pm$  error estándar para contaminación bacteriana y contaminación fúngica en los explantes de *Anthurium andrea* L., sujetos a la aplicación de 4 tratamientos de desinfección.**

Trat.	% Cloro (i.a)	Tiempo de exposición (min.)	Cont. Bacteriana	Cont. Fúngica
T <sub>1</sub>	0,5	10	0,89 $\pm$ 0,02 c	0,11 $\pm$ 0,02 b
T <sub>2</sub>	0,5	15	0,64 $\pm$ 0,03 b	0,00 $\pm$ 0,00 a
T <sub>3</sub>	1	10	0,39 $\pm$ 0,03 a	0,01 $\pm$ 0,01 a
T <sub>4</sub>	1	15	0,65 $\pm$ 0,03 b	0,0042 $\pm$ 0,0042 a
<b>p-valor</b>			<0,0001	<0,0001

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

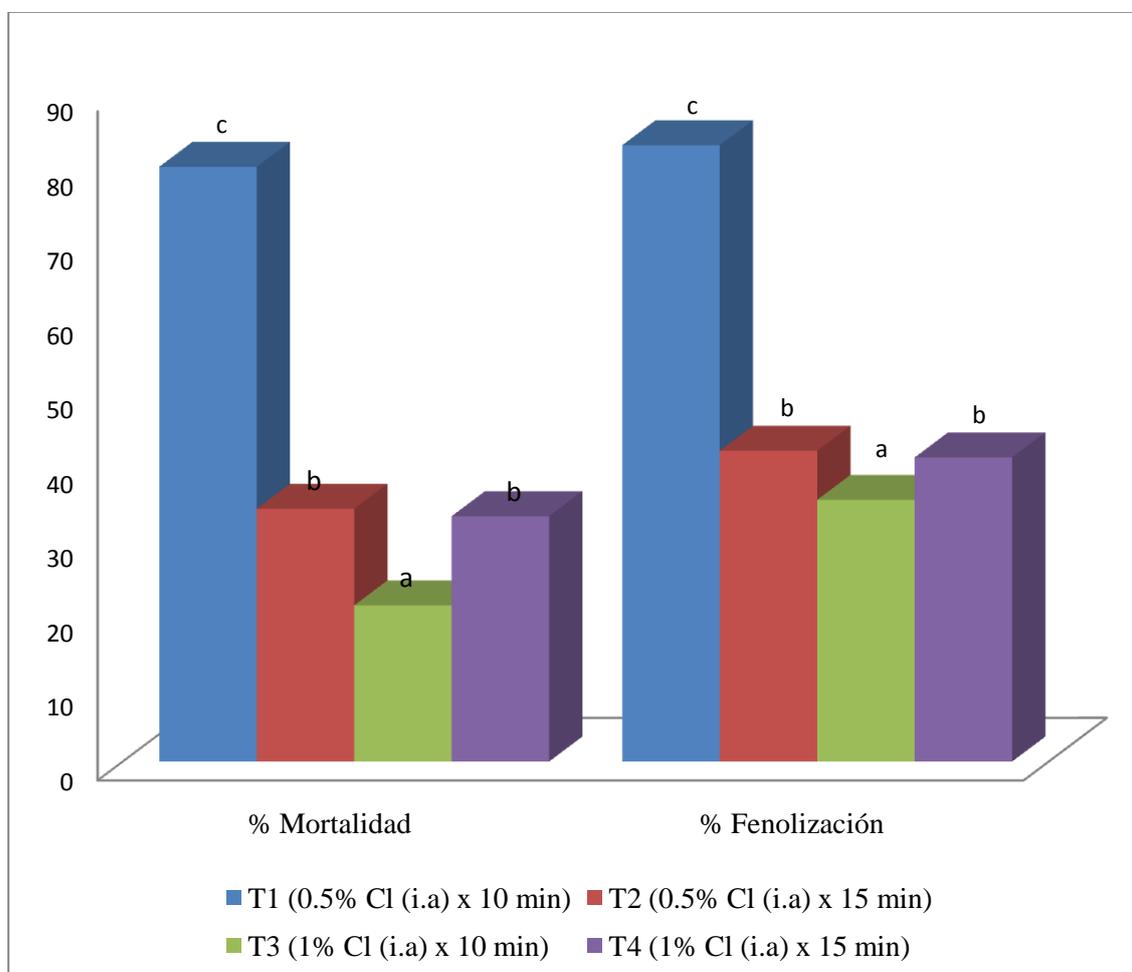


**Figura 5.1.1. Contaminación bacteriana y fúngica de los explantes de Anturio, sujetos a la aplicación de tratamientos de desinfección: T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>.**

**Cuadro 5.1.2. Promedio  $\pm$  error estándar para mortalidad y fenolización en los explantes de *Anthurium andreanum* L., sujetos a la aplicación de 4 tratamientos de desinfección.**

Trat.	% Cloro (i.a)	Tiempo de exposición (min.)	Mortalidad	Fenolización
T <sub>1</sub>	0,5	10	0,80 $\pm$ 0,02 c	8,29 $\pm$ 0,14 c
T <sub>2</sub>	0,5	15	0,34 $\pm$ 0,02 b	4,18 $\pm$ 0,21 b
T <sub>3</sub>	1	10	0,21 $\pm$ 0,03 a	3,52 $\pm$ 0,23 a
T <sub>4</sub>	1	15	0,33 $\pm$ 0,03 b	4,09 $\pm$ 0,25 b
<b>p-valor</b>			<0,0001	<0,0001

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )



**Figura 5.1.2. Mortalidad y fenolización de los explantes de Anturio, sujetos a la aplicación de tratamientos de desinfección: T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>.**

Estos resultados coinciden con los de Liendo y Mogollón (2009), quienes utilizaron un protocolo de desinfección que consistió en sumergir los explantes por 10 minutos en hipoclorito de sodio al 1%, obteniendo brotes para su posterior multiplicación clonal. También son comparativos a los resultados de Manzo y Sánchez (2000), Salgado (2007), y Atack y Celik (2009) en otros cultivares de anturio.

Por otra parte, difieren de lo encontrado por Montes *et al.* (2004) y Cuéllar (2008), quienes alcanzaron altos porcentajes de explantes sanos (94-96%), utilizando una concentración de 0.5% de hipoclorito de sodio y un tiempo de desinfección de 10 y 15 min respectivamente. Por su parte Trujillo *et al.* (2000) y Lee *et al.* (2003), obtuvieron buenos resultados con una concentración de 2% de NaOCl por 20 y 35 min individualmente.

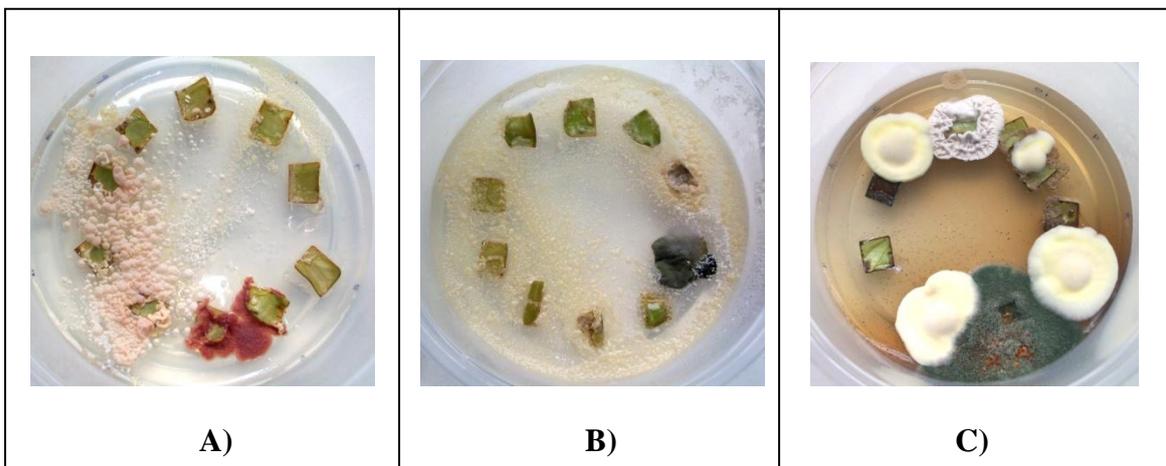
Los protocolos de desinfección demuestran un bajo porcentaje de contaminación causada por hongos. Estos resultados para anturio son de gran relevancia debido a que uno de sus principales problemas en el campo es la Antracnosis provocada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, evidenciada en circunstancias de exceso de humedad por manchas negras que se expanden en forma triangular o poligonal sobre la hoja (Murguía, 2007), lo que indica que los protocolos de desinfección T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> son eficientes para el control de hongos, ya que no existen diferencias significativas entre ellos. Resultados que coinciden con los de Rebolledo (1987), De Paoli *et al.* (1994) y Cuéllar (2008), que mencionan la utilización de hipoclorito de sodio de 0.5 a 3% por 10 a 15 minutos.

El protocolo T<sub>1</sub> presentó los mayores índices de mortalidad y fenolización, la muerte de los explantes pudo deberse a la contaminación bacteriana y fúngica, ya que a mayor contaminación se evidenció mayor mortalidad y fenolización, por otro lado los explantes

sujetos a la aplicación de los protocolos T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub> presentaron una mortalidad y fenolización intermedia, lo cual pudo ser ocasionado por el mayor tiempo de exposición al desinfectante (NaOCl), la naturaleza misma del explante y su manipulación excesiva por 15 minutos en ambos tratamientos.

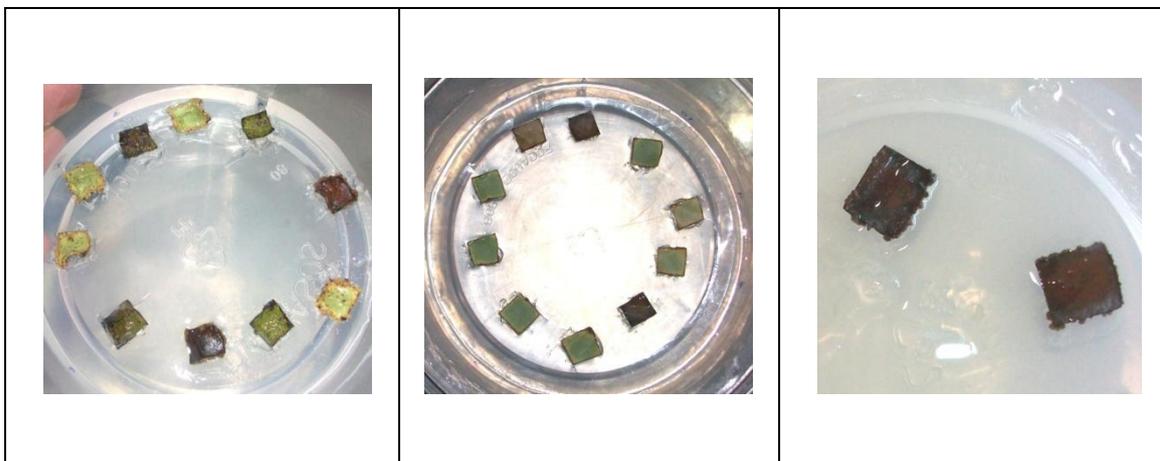
Se observa además que el protocolo T<sub>3</sub> siempre mantuvo un bajo índice de mortalidad y fenolización, mientras que los protocolos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub> a lo largo de las evaluaciones periódicas desarrollaban contaminación o fenolización en mayor grado. Otro factor de la baja fenolización pudo ser el menor tiempo de exposición de los explantes a una mayor concentración del hipoclorito de sodio como observó Núñez (2003).

En la Figura 5.1.3, se aprecia el grado de contaminación presente en el medio de cultivo en la introducción de los explantes de anturio.



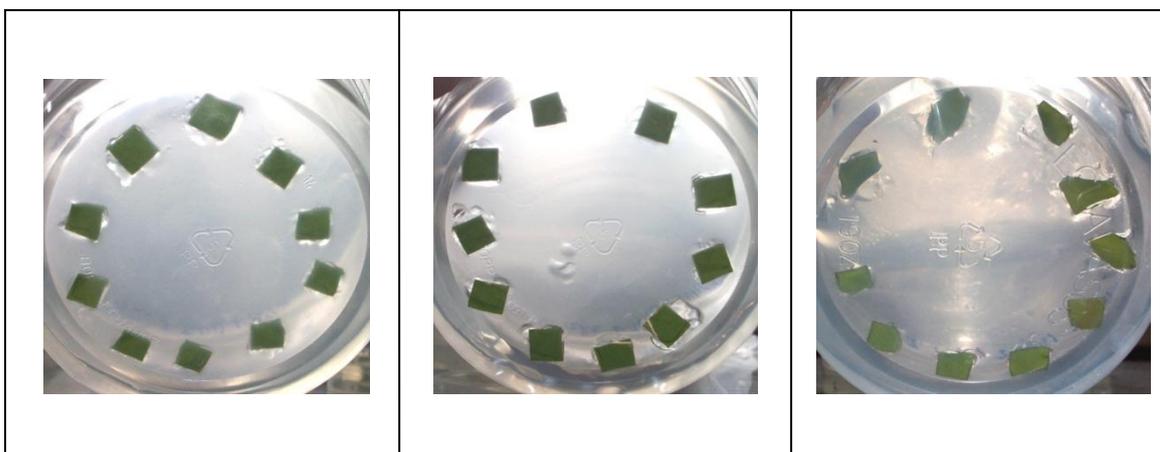
**Figura 5.1.3. Presencia de contaminación en el ensayo de los protocolos de desinfección A) T<sub>1</sub> (0.5% Cl (i.a) x 10 min), B) T<sub>2</sub> (0.5% Cl (i.a) x 15 min), y C) T<sub>4</sub> (1% Cl (i.a) x 15 min), de *Anthurium andrewianum* L.**

En la Figura 5.1.4, se observa la fenolización y mortalidad de las secciones de hoja introducidas en el medio de cultivo.



**Figura 5.1.4. Presencia de fenolización en las secciones de hoja de *Anthurium andrea* L., pertenecientes a T<sub>1</sub> (0.5% Cl (i.a) x 10 min).**

En la Figura 5.1.5, se observan a las secciones de hoja de anturio que no presentaron contaminación durante la fase de introducción.



**Figura 5.1.5. Secciones de hoja de *Anthurium andrea* L. sin contaminación a los 49 días de introducción, pertenecientes a T<sub>3</sub> (1% Cl (i.a) x 10 min).**

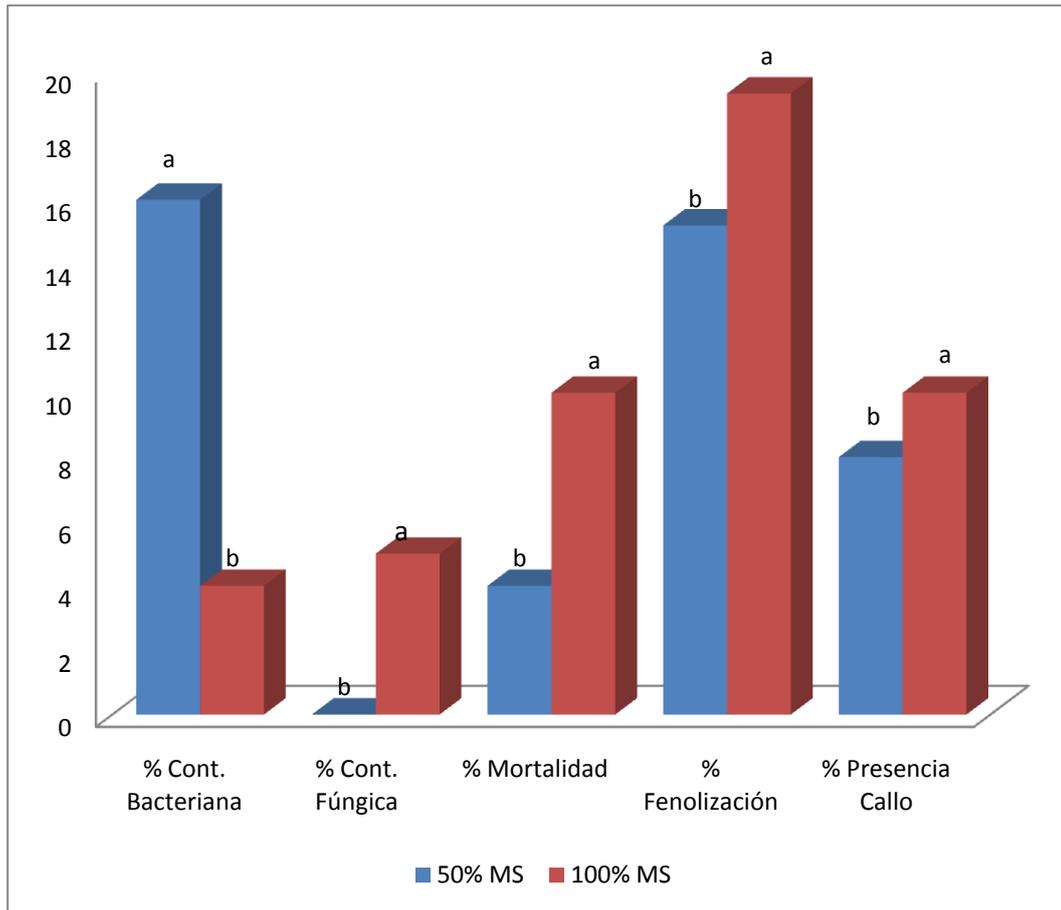
## 5.2. FASE DE INTRODUCCIÓN

### 5.2.1 Concentración de macronutrientes MS adecuado y la relación óptima de citocinina/auxina (BAP/2,4-D).

Para establecer el medio de introducción más adecuado para las secciones de hoja de anturio, se realizó el análisis de los datos obtenidos mediante el criterio del análisis de modelos mixtos, de seis tratamientos seleccionados durante la investigación, a fin de determinar la concentración de macronutrientes MS y relación óptima de citocinina/auxina. Las evaluaciones se realizaron a los 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días posteriores a la introducción de los explantes al medio de cultivo.

**Cuadro 5.2.1.1. Promedio  $\pm$  error estándar para contaminación bacteriana, contaminación fúngica, mortalidad, fenolización y presencia de callo en los explantes de *Anthurium andreanum* L. en el medio de introducción, bajo el efecto de la concentración de macronutrientes MS.**

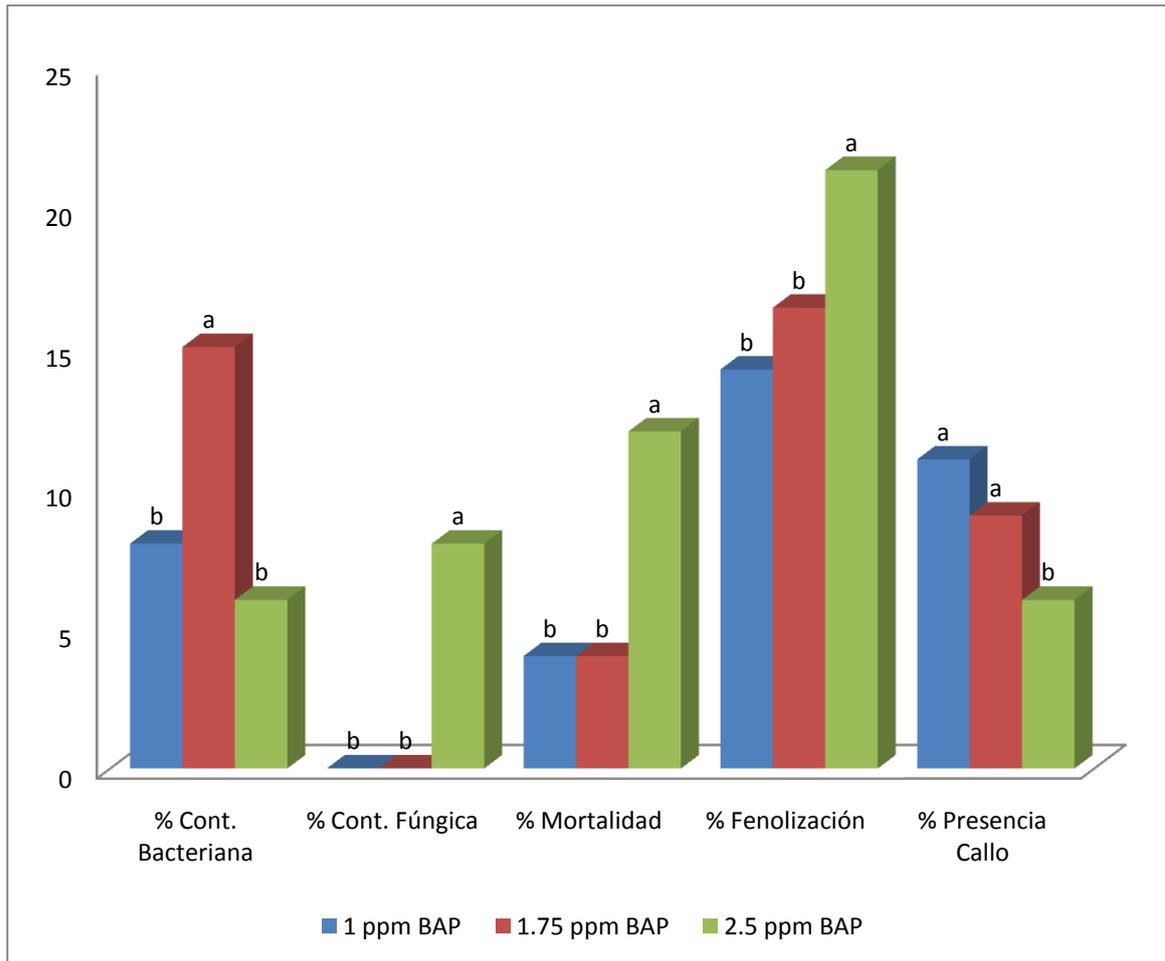
Macronut.	Cont. Bact.	Cont. Fung.	Mortalidad	Fenolización	P.C
<b>0,5</b>	0,16 $\pm$ 0,01 a	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,04 $\pm$ 0,01 b	1,52 $\pm$ 0,08 b	0,08 $\pm$ 0,01 b
<b>1</b>	0,04 $\pm$ 0,01 b	0,05 $\pm$ 0,01 a	0,10 $\pm$ 0,01 a	1,93 $\pm$ 0,08 a	0,10 $\pm$ 0,01 a



**Figura 5.2.1.1. Contaminación bacteriana, contaminación fúngica, mortalidad, fenolización y presencia de callo de los explantes de *Anthurium andreaeanum* L. sujetos a la aplicación de 2 concentraciones de macronutrientes MS: 50 y 100%.**

**Cuadro 5.2.1.2. Promedio  $\pm$  error estándar para contaminación bacteriana, contaminación fúngica, mortalidad, fenolización y presencia de callo en los explantes de *Anthurium andreaeanum* L. en el medio de introducción, bajo el efecto de las dosis de bencilaminopurina (BAP).**

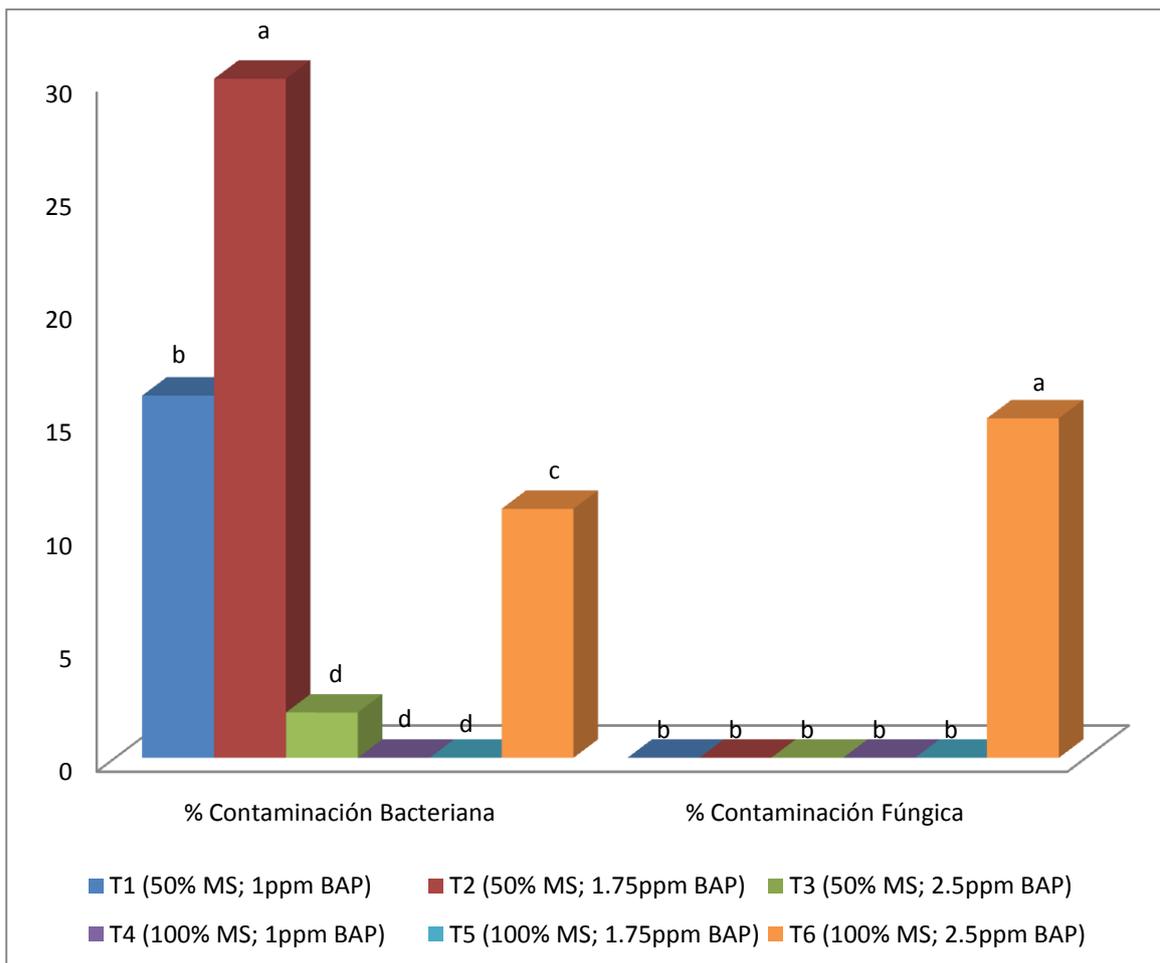
BAP (ppm)	Cont. Bact.	Cont. Fung.	Mortalidad	Fenolización	P.C
1	0,08 $\pm$ 0,01 b	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,04 $\pm$ 0,01 b	1,42 $\pm$ 0,09 b	0,11 $\pm$ 0,01 a
1,75	0,15 $\pm$ 0,01 a	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,04 $\pm$ 0,01 b	1,64 $\pm$ 0,09 b	0,09 $\pm$ 0,01 a
2,5	0,06 $\pm$ 0,01 b	0,08 $\pm$ 0,01 a	0,12 $\pm$ 0,01 a	2,13 $\pm$ 0,09 a	0,06 $\pm$ 0,01 b



**Figura 5.2.1.2. Contaminación bacteriana, contaminación fúngica, mortalidad, fenolización y presencia de callo de los explantes de *Anthurium andreanum* L. sujetos a la aplicación de 3 dosis de bencilaminopurina (BAP) 1, 1.75 y 2.5 ppm.**

**Cuadro 5.2.1.3. Promedio  $\pm$  error estándar para contaminación bacteriana y contaminación fúngica en los explantes de *Anthurium andreanum* L. en el medio de introducción, bajo el efecto de la interacción macronutrientes MS y BAP (ppm).**

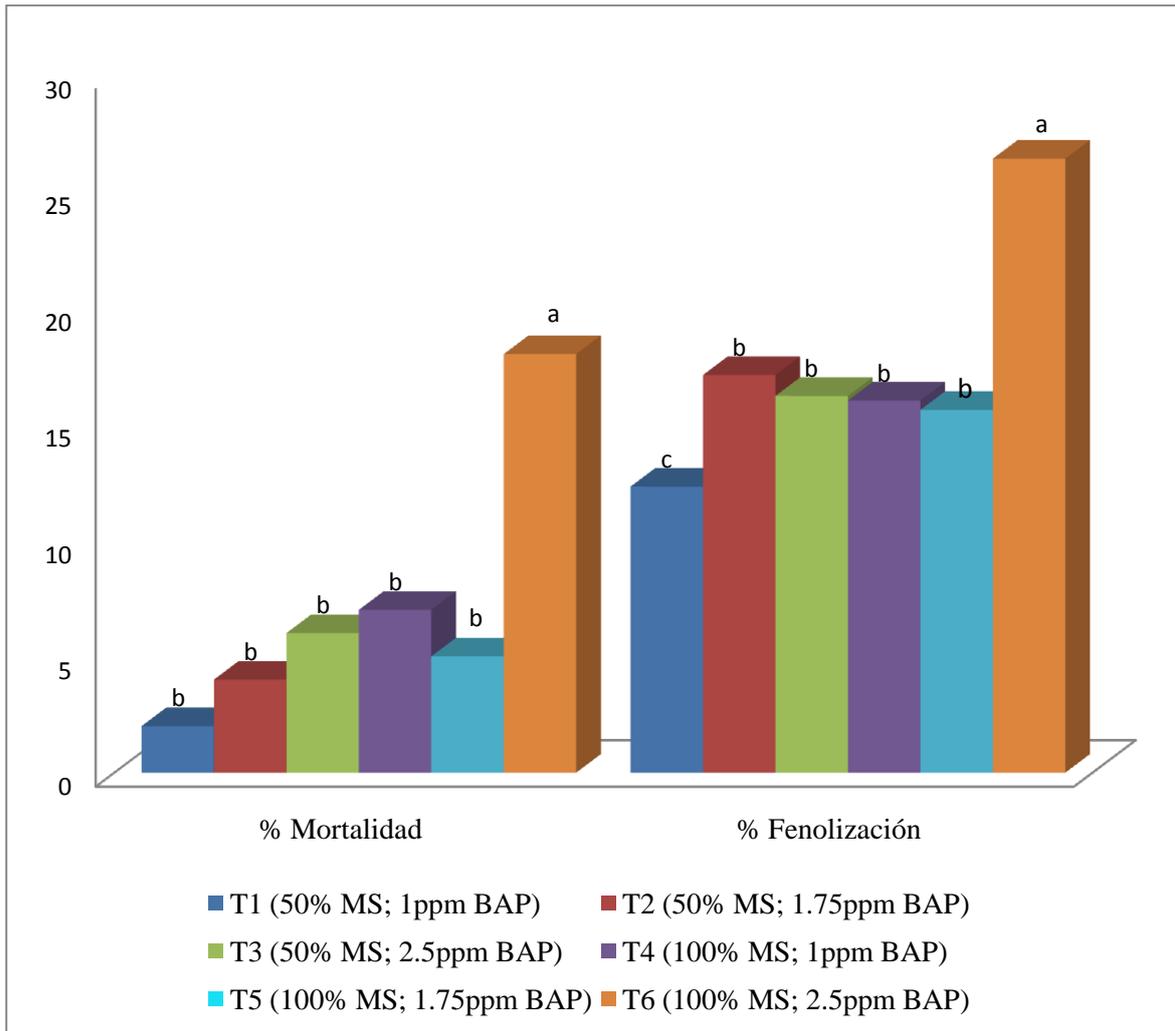
Trat.	Macronut.	BAP	Cont. Bact.	Cont. Fung.
T <sub>1</sub>	0,5	1	0,16 $\pm$ 0,02 b	0,00 $\pm$ 0,01 b
T <sub>2</sub>	0,5	1,75	0,30 $\pm$ 0,02 a	0,00 $\pm$ 0,01 b
T <sub>3</sub>	0,5	2,5	0,02 $\pm$ 0,02 d	0,00 $\pm$ 0,01 b
T <sub>4</sub>	1	1	0,00 $\pm$ 0,02 d	0,00 $\pm$ 0,01 b
T <sub>5</sub>	1	1,75	0,00 $\pm$ 0,02 d	0,00 $\pm$ 0,01 b
T <sub>6</sub>	1	2,5	0,11 $\pm$ 0,02 c	0,15 $\pm$ 0,01 a



**Figura 5.2.1.3. Contaminación bacteriana y contaminación fúngica de los explantes de *Anthurium andreanum* L. sujetos a la aplicación de 2 concentraciones de macronutrientes MS (50 y 100%) y 3 dosis de BAP (1, 1.75 y 2.5 ppm): T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>.**

**Cuadro.5.2.1.4. Promedio  $\pm$  error estándar para mortalidad y fenolización en los explantes de *Anthurium andreanum* L. en el medio de introducción, bajo el efecto de la interacción macronutrientes MS y BAP (ppm).**

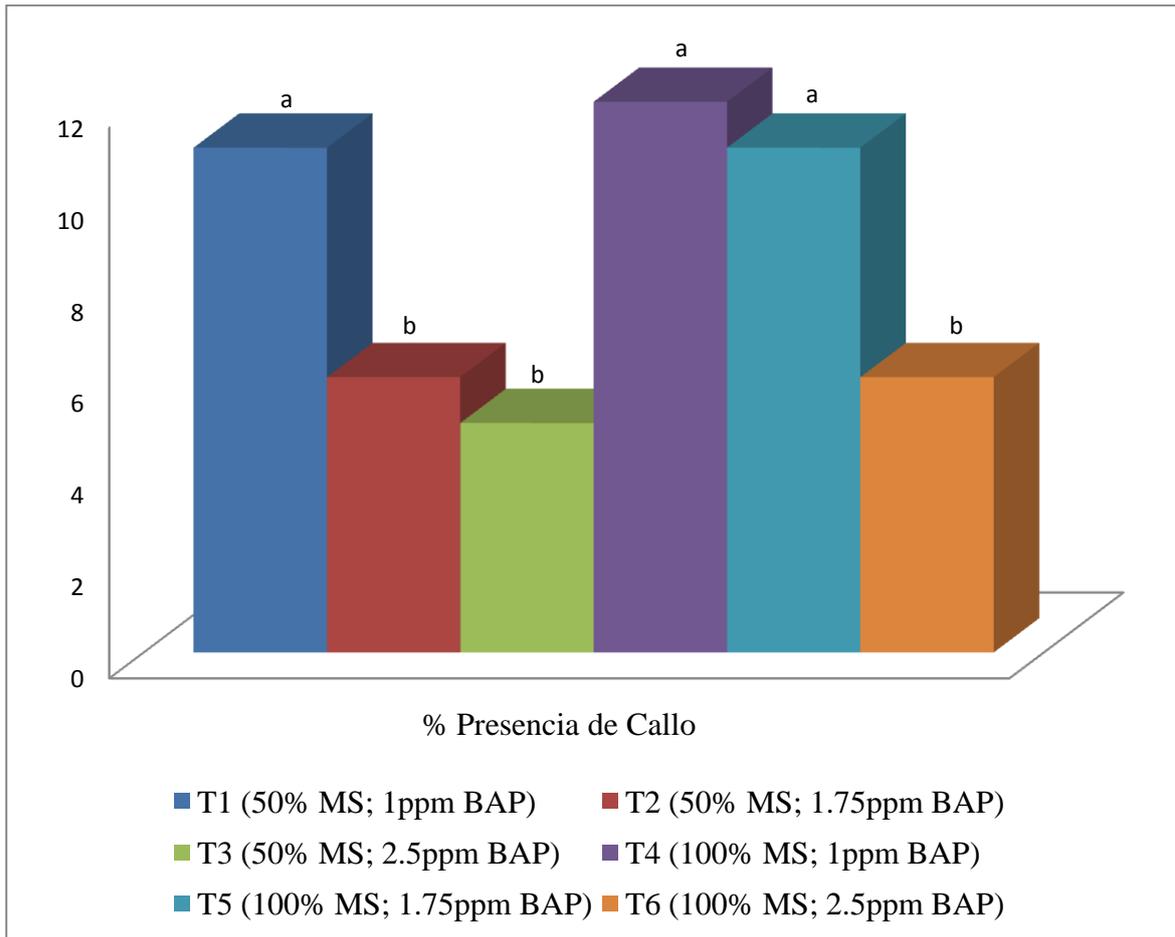
Tratamiento	Macronut.	BAP	Mortalidad	Fenolización
T <sub>1</sub>	0,5	1	0,02 $\pm$ 0,02 b	1,23 $\pm$ 0,13 c
T <sub>2</sub>	0,5	1,75	0,04 $\pm$ 0,02 b	1,71 $\pm$ 0,13 b
T <sub>3</sub>	0,5	2,5	0,06 $\pm$ 0,02 b	1,62 $\pm$ 0,13 b
T <sub>4</sub>	1	1	0,07 $\pm$ 0,02 b	1,60 $\pm$ 0,13 b
T <sub>5</sub>	1	1,75	0,05 $\pm$ 0,02 b	1,56 $\pm$ 0,13 b
T <sub>6</sub>	1	2,5	0,18 $\pm$ 0,02 a	2,64 $\pm$ 0,13 a



**Figura 5.2.1.4.** Mortalidad y fenolización de los explantes de *Anthurium andeanum* L. sujetos a la aplicación de 2 concentraciones de macronutrientes MS (50 y 100%) y 3 dosis de BAP (1, 1.75 y 2.5 ppm): T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>.

**Cuadro 5.2.1.5.** Promedio  $\pm$  error estándar para presencia de callo en los explantes de *Anthurium andeanum* L. en el medio de introducción, bajo el efecto de la interacción macronutrientes MS y BAP (ppm).

Tratamiento	Macronut.	BAP	P.C
T <sub>1</sub>	0,5	1	0,11 $\pm$ 0,02 a
T <sub>2</sub>	0,5	1,75	0,06 $\pm$ 0,02 b
T <sub>3</sub>	0,5	2,5	0,05 $\pm$ 0,02 b
T <sub>4</sub>	1	1	0,12 $\pm$ 0,02 a
T <sub>5</sub>	1	1,75	0,11 $\pm$ 0,02 a
T <sub>6</sub>	1	2,5	0,06 $\pm$ 0,02 b



**Figura 5.2.1.5. Presencia de callo de los explantes de *Anthurium andreaeanum* L. sujetos a la aplicación de 2 concentraciones de macronutrientes MS (50 y 100%) y 3 dosis de BAP (1, 1.75 y 2.5 ppm): T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>.**

El análisis estadístico revela que los medios de introducción T<sub>3</sub> (50% MS; 2.5 ppm BAP), T<sub>4</sub> (100% MS; 1 ppm BAP) y T<sub>5</sub> (100% MS; 1.75 ppm BAP), presentaron contaminación bacteriana en menor grado, sin diferencias significativas entre ellos. A diferencia de los explantes sujetos a la aplicación de los medios de introducción T<sub>6</sub> (100% MS; 2.5 ppm BAP), T<sub>1</sub> (50% MS; 1 ppm BAP) y T<sub>2</sub> (50% MS; 1.75 ppm BAP) quienes presentaron mayor contaminación bacteriana respectivamente (Cuadro 5.2.1.3). Esto puede deberse según Vargas *et al.* (2004), a que cuando se emplean explantes de plantas *in vivo*, se dificulta la aplicación de técnicas de cultivo y el establecimiento por los altos índices de contaminación bacteriana observados en esos cultivos.

En relación con la contaminación fungosa se observa que no existe una diferencia significativa para el porcentaje de contaminación total obtenido entre los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> con un 0%, pero si una alta diferencia significativa en relación a T<sub>6</sub> con un 15%.

El porcentaje de mortalidad del tratamiento T<sub>6</sub> posee alta diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos, es el mayor con un 18% del total de los explantes (Cuadro 5.2.1.4).

El tratamiento T<sub>1</sub> exhibe el menor porcentaje de fenolización con un 12.3%, diferente significativamente al resto de tratamientos.

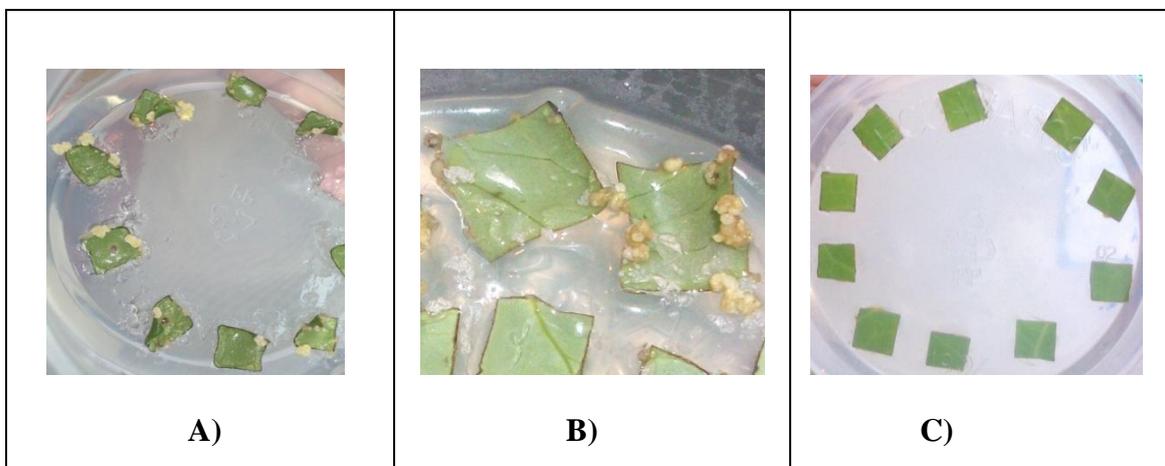
La presencia de callo se observó a partir de los primeros 45 días, con la aparición de estructuras nodulares en los bordes de los segmentos de hojas, que continuaron su crecimiento hasta cubrir casi la mitad del explante inicial, al cabo de los 90 días.

En la Figura 5.2.1.5, se grafican los resultados de los diferentes tratamientos con relación a la formación de callos. Al analizarlos se observa que los mayores valores correspondieron a los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>5</sub> con un 11%, y T<sub>4</sub> con 12% de explantes que formaron callo, no obstante no presentaron diferencias significativas entre ellos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Trujillo *et al.* (2000), quienes utilizaron medios de cultivo con BAP, como regulador de crecimiento. Los valores más bajos correspondieron a los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>6</sub> con un 6%, y T<sub>3</sub> con 5% de explantes que formaron callo, sin diferencias significativas entre ellos.

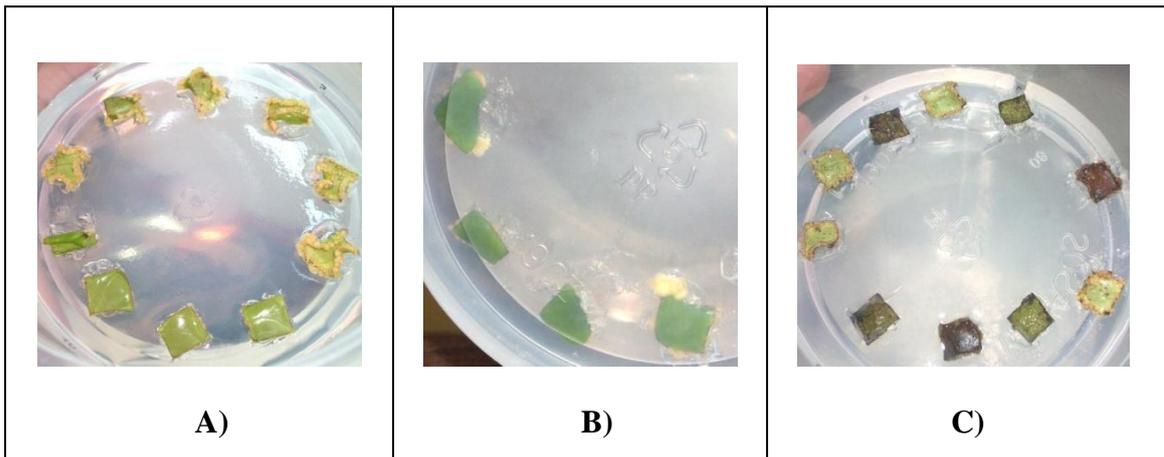
Por otro lado se determinó que los mejores resultados se lograron con la combinación de 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.08 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, verificándose alta coincidencia con los resultados obtenidos Pierik (1979). Esto puede deberse al empleo de 2,4-D por cuanto promueve la desdiferenciación y rediferenciación celular como propuso Rivero *et al.* (2006). Adicionalmente, las heridas realizadas a los segmentos foliares producen efectos de estrés, lo que conduce a una rápida acidificación del medio de cultivo (Fehér *et al.*, 2002) y la generación de divisiones celulares que permiten la formación de callos (Raghavan, 2004).

En cuanto al medio de cultivo utilizado, según Neumann (1995), existe una selectividad preferencial de las células por el nitrógeno en forma amino en las sales inorgánicas MS. El nutriente, particularmente la fuente de nitrógeno afecta la formación de los callos en monocotiledóneas (Leifert *et al.*, 1995).

En las Figuras 5.2.1.6 y 5.2.1.7, se aprecia el efecto de las dos concentraciones de macronutrientes MS (50 y 100%) y tres dosis de BAP (1, 1.75 y 2.5 ppm), sobre los explantes de anturio en cuanto al crecimiento y desarrollo del callo.



**Figura 5.2.1.6. Callos de *Anthurium andreanum* a los 90 días de introducción en medios de cultivo con 50% de macronutrientes MS y A) 1 ppm BAP, B) 1.75 ppm BAP, y C) 2.5 ppm BAP.**



**Figura 5.2.1.7. Callos de *Anthurium andreaeanum* L. a los 90 días de introducción en medios de cultivo con 100% de macronutrientes MS y A) 1 ppm BAP, B) 1.75 ppm BAP, y C) 2.5 ppm BAP.**

### 5.3. FASE DE BROTAÇÃO

Los explantes provenientes de la fase de Introducción y que se encontraban en oscuridad, fueron pasados al medio de Brotación, el cual estuvo constituido por los componentes del tratamiento T<sub>1</sub> (1 ppm BAP), seleccionado en la fase anterior, en ausencia de 2,4-D.

Cada unidad experimental (U.E) que contenía cinco explantes con callo, fue transferida a un ambiente con luz. En esta fase permanecieron 49 días, y las evaluaciones se realizaron cada 7 días, bajo el criterio del análisis de varianza, con el fin de determinar el número de brotes, hojas y raíces formados durante esta fase. Posteriormente el material experimental fue trasferido a la fase de multiplicación (Cuadro 5.3.1).

**Cuadro 5.3.1. Promedio  $\pm$  del error estándar para número de brotes, número de hojas, número de raíces y fenolización en los explantes con callo de *Anthurium andreanum* L. por unidad experimental (U.E), en el medio de brotación, bajo el efecto de 1 ppm BAP y en ausencia de 2,4-D.**

U.E	Número de Brotes	Número de Hojas	Número de Raíces	Fenolización
1	5,11 $\pm$ 1,29 abcde	1,69 $\pm$ 0,43 abc	0,80 $\pm$ 0,19 abc	1,00 $\pm$ 0,00 a
2	15,69 $\pm$ 2,30 hij	5,34 $\pm$ 0,85 gh	2,74 $\pm$ 0,44 efg	1,34 $\pm$ 0,13 ab
3	3,23 $\pm$ 0,65 abcd	1,37 $\pm$ 0,38 ab	0,43 $\pm$ 0,15 ab	2,14 $\pm$ 0,31 abc
4	5,66 $\pm$ 0,87 abcdef	2,40 $\pm$ 0,42 abcdef	1,46 $\pm$ 0,23 bcdef	2,20 $\pm$ 0,32 bc
5	14,83 $\pm$ 1,94 ghij	5,60 $\pm$ 0,72 h	2,80 $\pm$ 0,33 fg	2,09 $\pm$ 0,15 abc
6	0,57 $\pm$ 0,24 ab	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	7,49 $\pm$ 0,58 d
7	8,54 $\pm$ 1,12 cdefg	1,94 $\pm$ 0,39 abcde	0,49 $\pm$ 0,12 ab	1,00 $\pm$ 0,00 a
8	12,26 $\pm$ 2,10 fghij	4,66 $\pm$ 0,79 defgh	1,00 $\pm$ 0,17 abc	1,00 $\pm$ 0,00 a
9	2,34 $\pm$ 0,37 abc	1,09 $\pm$ 0,25 ab	0,46 $\pm$ 0,17 ab	1,00 $\pm$ 0,00 a
10	11,03 $\pm$ 1,65 efghi	5,97 $\pm$ 0,63 h	1,74 $\pm$ 0,22 bcdef	1,86 $\pm$ 0,06 abc
11	18,94 $\pm$ 2,46 j	4,83 $\pm$ 0,82 efgh	1,57 $\pm$ 0,26 bcdef	1,00 $\pm$ 0,00 a
12	6,60 $\pm$ 1,46 abcdef	2,57 $\pm$ 0,78 abcdefg	0,94 $\pm$ 0,25 abc	1,00 $\pm$ 0,00 a
13	16,94 $\pm$ 2,00 ij	5,23 $\pm$ 0,78 fgh	2,71 $\pm$ 0,33 defg	1,00 $\pm$ 0,00 a
14	4,94 $\pm$ 0,54 abcde	2,57 $\pm$ 0,38 abcdefg	1,31 $\pm$ 0,21 abcde	2,71 $\pm$ 0,35 c
15	4,63 $\pm$ 0,62 abcde	2,63 $\pm$ 0,41 abcdefg	1,94 $\pm$ 0,28 cdefg	1,00 $\pm$ 0,00 a
16	9,60 $\pm$ 1,16 defgh	3,86 $\pm$ 0,57 bcdefgh	3,37 $\pm$ 0,43 g	1,00 $\pm$ 0,00 a
17	6,14 $\pm$ 1,06 abcdef	1,91 $\pm$ 0,32 abcd	1,11 $\pm$ 0,15 abc	1,00 $\pm$ 0,00 a
18	7,17 $\pm$ 1,37 bcdef	4,40 $\pm$ 0,97 cdefgh	3,31 $\pm$ 0,68 g	1,86 $\pm$ 0,06 abc
19	9,31 $\pm$ 1,47 cdefgh	1,03 $\pm$ 0,18 ab	1,29 $\pm$ 0,22 abcd	2,20 $\pm$ 0,29 bc
<b>p</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

En la variable número de brotes se observó la formación de un máximo de 18.94 brotes promedio por explante en la unidad experimental 11, sin embargo, no se evidenció diferencias significativas con las U.E 13, 2, 5 y 8 con 16.94, 15.69, 14.83 y 12.26 brotes promedio respectivamente. Los valores intermedios de 11.03, 9.60, 9.31, 8.54, 7.17, 6.60, 6.14, 5.66, 5.11, 4.94 y 4.63 brotes promedio por explante, correspondió a las U.E 10, 16, 19, 7, 18, 12, 17, 4, 1, 14 y 15 respectivamente; no obstante, no difirieron estadísticamente entre si. Por otro lado las U.E 3, 9 y 6 restantes compartieron el mismo rango de significación, siendo bajo el número de brotes promedio logrados (3.23, 2.34 y 0.57), respectivamente.

En cuanto al número de hojas, se pudo apreciar que las U.E 10, 2, 11, 8, 18 y 16 lograron los mejores resultados con 5.97, 5.34, 4.83, 4.66, 4.40 y 3.86 hojas promedio, respectivamente.

La respuesta para el número de raíces en los explantes de hoja, tuvo resultados favorables con 3.37, 3.31, 2.80, 2.74, 2.71 y 1.94 raíces promedio, correspondientes a las U.E 16, 18, 5, 2, 13 y 15 respectivamente, las cuales no difirieron significativamente.

Por último, no hubo diferencia estadística significativa al comparar los valores de fenolización, debido a la baja susceptibilidad de los explantes al problema. Esto pudo deberse a que el medio se encontró libre de 2,4-D; al respecto, de acuerdo a Ruiz (2000), altas concentraciones de auxinas se asocian con una mayor tasa de oxidación. Además las citocininas (BAP) pueden inhibir, hasta cierto punto, la oxidación de auxinas, reduciendo de esta manera la cantidad de fenoles producidos (Paz, 2000).

En la figura 5.3.1, se aprecia la generación de brotes a partir de los callos de anturio, transferidos a un ambiente con luz durante la fase de brotación, aquí se observa su crecimiento y desarrollo.



**Figura 5.3.1. Brotes en los callos de los explantes de *Anthurium andreaeanum* L. durante la fase de brotación (49 días), en ausencia de 2,4-D.**

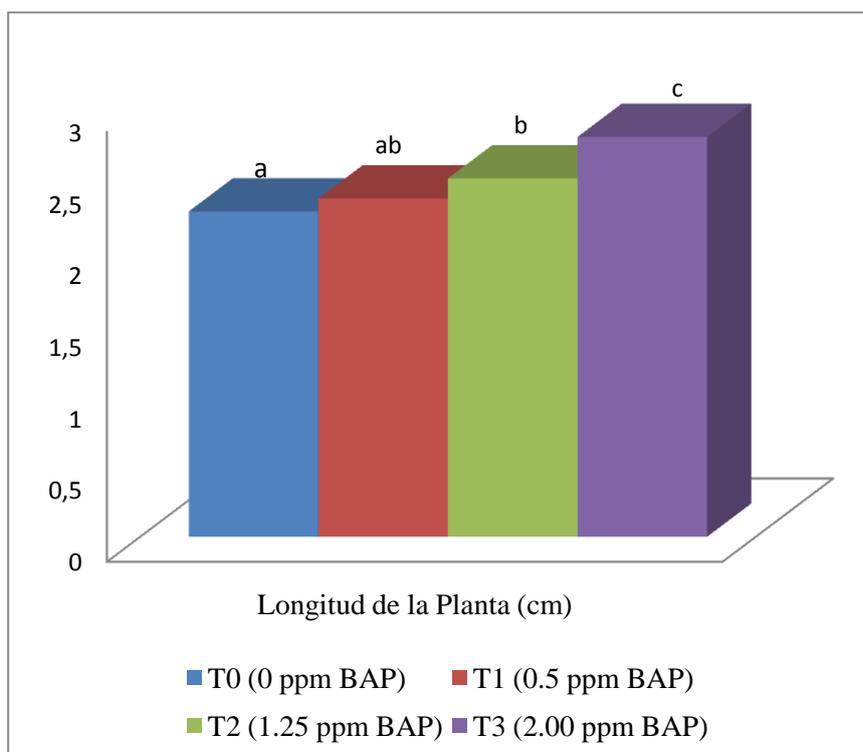
## 5.4. FASE DE MULTIPLICACIÓN

### 5.4.1. Concentración óptima de N6-bencilaminopurina (BAP).

**Cuadro 5.4.1.1. Promedio  $\pm$  error estándar para longitud de la plantas de *Anthurium andreanum* L. cultivadas *in vitro*, en el medio de multiplicación, bajo el efecto de 4 dosis de BAP (ppm).**

Tratamiento	BAP (ppm)	Longitud de la Planta
T <sub>0</sub>	0	2,27 $\pm$ 0,04 a
T <sub>1</sub>	0,5	2,36 $\pm$ 0,05 ab
T <sub>2</sub>	1,25	2,50 $\pm$ 0,06 b
T <sub>3</sub>	2,00	2,79 $\pm$ 0,07 c
<b>p-valor</b>		0,0321

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

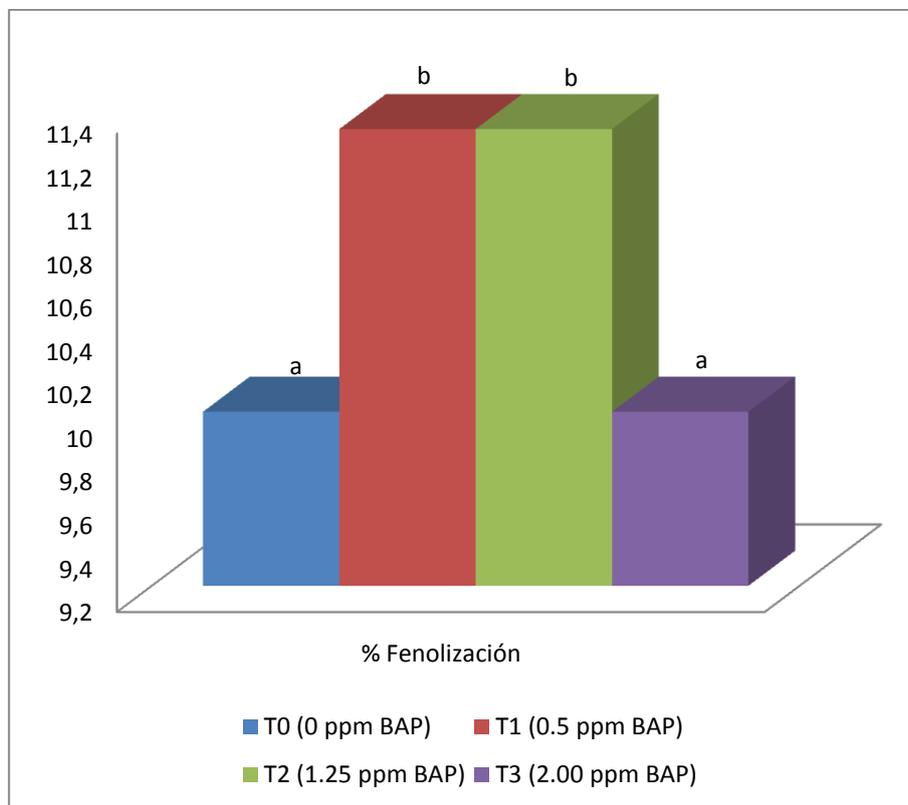


**Figura 5.4.1.1. Longitud de las plantas de *Anthurium andreanum* L. cultivadas *in vitro*, a diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) 0, 0.5, 1.25 y 2.00 ppm en la fase de multiplicación.**

**Cuadro 5.4.1.2. Promedio  $\pm$  error estándar para fenolización de las plantas de *Anthurium andreanum* L. cultivadas *in vitro*, en el medio de multiplicación, bajo el efecto de 4 dosis de BAP (ppm).**

Tratamiento	BAP (ppm)	Fenolización
T <sub>0</sub>	0	1,00 $\pm$ 0,00 a
T <sub>1</sub>	0,5	1,13 $\pm$ 0,02 b
T <sub>2</sub>	1,25	1,13 $\pm$ 0,02 b
T <sub>3</sub>	2,00	1,00 $\pm$ 0,00 a
<b>p-valor</b>		<0,0001

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

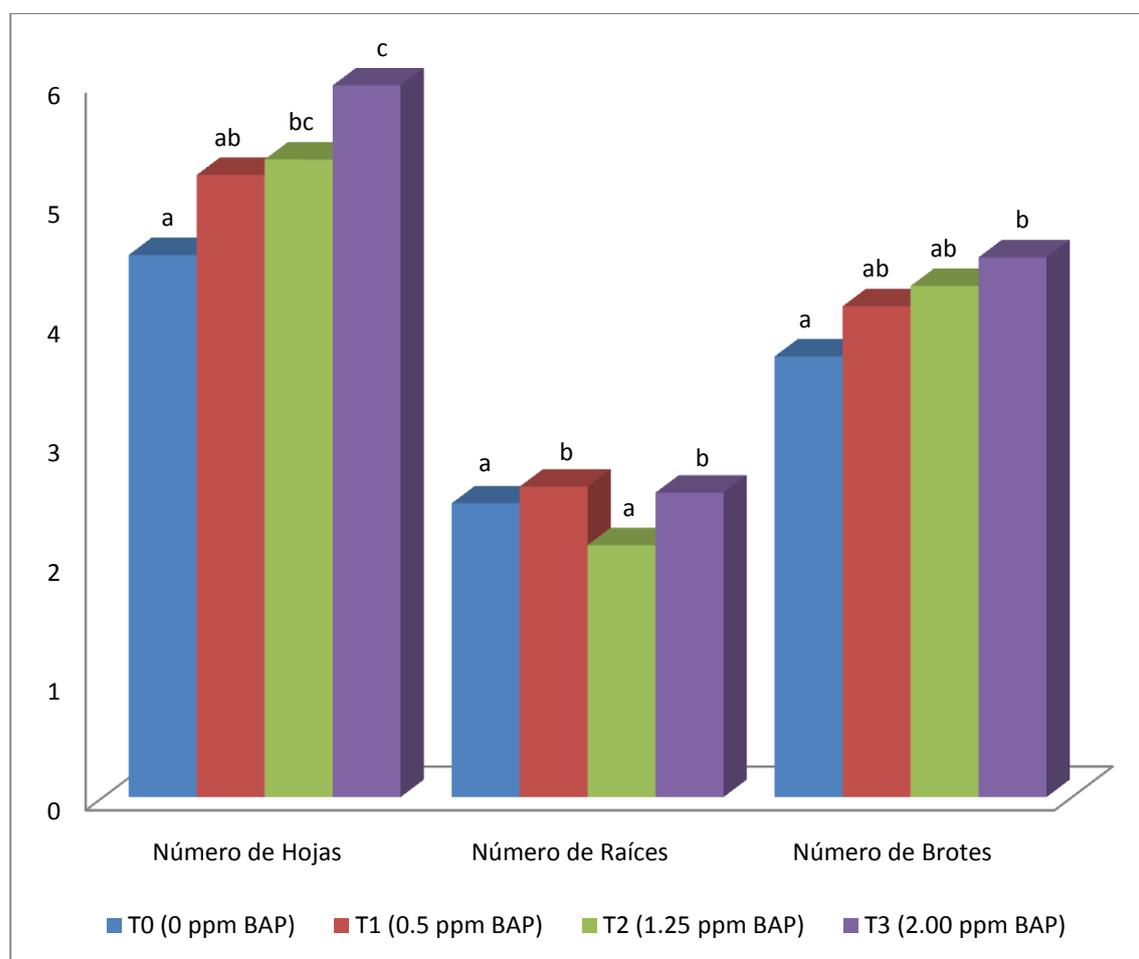


**Figura 5.4.1.2. Fenolización de las plantas de *Anthurium andreanum* L. cultivadas *in vitro*, a diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) 0, 0.5, 1.25 y 2.00 ppm en la fase de multiplicación.**

**Cuadro 5.4.1.3. Promedio  $\pm$  error estándar para número de hojas, número de raíces y número de brotes de las plantas de *Anthurium andreaeanum* L. cultivadas *in vitro*, en el medio de multiplicación, bajo el efecto de 4 dosis de BAP (ppm).**

Trat.	BAP (ppm)	Número de Hojas	Número de Raíces	Número de Brotes
T <sub>0</sub>	0	4,54 $\pm$ 0,15 a	2,46 $\pm$ 0,10 a	3,69 $\pm$ 0,20 a
T <sub>1</sub>	0,5	5,21 $\pm$ 0,18 ab	2,60 $\pm$ 0,12 b	4,11 $\pm$ 0,19 ab
T <sub>2</sub>	1,25	5,34 $\pm$ 0,19 bc	2,11 $\pm$ 0,08 a	4,28 $\pm$ 0,19 ab
T <sub>3</sub>	2,00	5,96 $\pm$ 0,24 c	2,55 $\pm$ 0,09 b	4,52 $\pm$ 0,23 b
<b>p-valor</b>		<0,0001	<0,0001	0,0016

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )



**Figura 5.4.1.3. Número de hojas, número de raíces y número de brotes de las plantas de *Anthurium andreaeanum* L. cultivadas *in vitro*, a diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) 0, 0.5, 1.25 y 2.00 ppm en la fase de multiplicación.**

Luego de siete semanas de introducción de las plántulas de anturio, al medio de multiplicación se observó que bajo la dosificación 0 ppm de BAP ( $T_0$ ), no hubo diferencias significativas para la variable longitud, en comparación con las plántulas desarrolladas en 0.50 ppm de BAP ( $T_1$ ). Las plántulas sujetas a los tratamientos con 0.50 y 1.25 ppm de BAP ( $T_2$ ), mostraron similar longitud. Sin embargo, la longitud de las plántulas bajo el efecto de la dosis de 2.00 ppm de BAP ( $T_3$ ) fue mayor con relación al desarrollo de las plántulas expuestas al resto de dosificaciones; en consecuencia, presentó diferencia significativa con los otros tratamientos (Cuadro 5.4.1.1).

Para el número de hojas por planta, las dosis de citocinina establecieron diferencias significativas entre los tratamientos  $T_0$  y  $T_2$ , al igual que entre los tratamientos  $T_1$  y  $T_3$ , pero similares entre los  $T_1$  y  $T_2$ , al igual que entre  $T_2$  y  $T_3$ , siendo el valor más alto en número de hojas promedio por planta, la concentración de 2.00 ppm de BAP ( $T_3$ ).

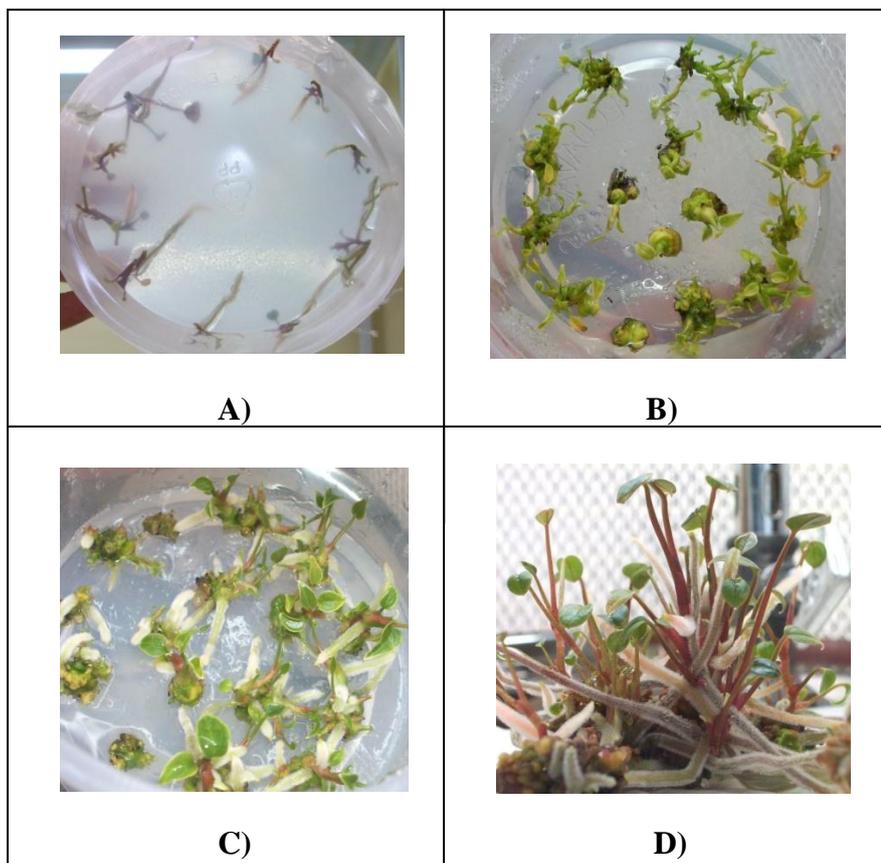
Por otro lado en todos los tratamientos las plántulas formaron raíces, sin embargo en cuanto al número de raíces los mayores valores se obtuvieron en los medios de cultivo que contenían 0.50 y 2.00 ppm de BAP correspondientes a los tratamientos  $T_1$  y  $T_3$ .

De forma general se puede señalar que el número de brotes promedio fue mayor a la concentración de 2.00 ppm de BAP, aunque es estadísticamente fue igual a los tratamientos  $T_1$  y  $T_2$  con 0.5 y 1.25 ppm de BAP, respectivamente (Figura 5.4.1.3).

Por último el grado de fenolización encontrado durante la fase de multiplicación fue menor en los tratamientos  $T_0$  y  $T_3$  siendo éstos estadísticamente iguales. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la concentración de BAP en el medio no tuvo influencia en la

producción de compuestos fenólicos, por lo que la baja oxidación presente en las plantas, pudo ser ocasionada por la manipulación del operario al realizar la siembra, conforme fue verificado por Ruiz (2000).

En la Figura 5.4.1.4, se observan las vitroplantas de anturio en la fase de multiplicación.



**Figura 5.4.1.4. Plantas de *Anthurium andreanum* L. cultivadas *in vitro* en la fase de multiplicación, a diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP): A) T<sub>0</sub>: 0 ppm BAP, B) T<sub>1</sub>: 0.50 ppm BAP, C) T<sub>2</sub>: 1.25 ppm BAP, y D) T<sub>3</sub>: 2.00 ppm BAP.**

## 5.5. DIFUSIÓN DE LA INFORMACIÓN

La información generada en esta investigación será distribuida a personas interesadas mediante la edición de un boletín técnico.

## VI. CONCLUSIONES

El protocolo de desinfección con el que se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación, tanto fúngica como bacteriana, al igual que el menor porcentaje de mortalidad y fenolización, fue el T<sub>3</sub> (1% Cl (i.a) x 10 min), el cual presentó además mejor calidad en cuanto a coloración y vigor de los explantes.

Los diferentes productos afines que intervinieron en los protocolos de desinfección muy probablemente coadyuvaron en su eficacia, demostrando que la desinfección inicial con jabón líquido, tintura de yodo, Benlate 1 g L<sup>-1</sup>, peróxido de hidrógeno 3 ml L<sup>-1</sup> y ácido peracético 3 ml L<sup>-1</sup>; en el exterior de la cámara, más el protocolo T<sub>3</sub> (1% Cloro (i.a) x 10 min); en cámara de flujo laminar, fue el más adecuado para la introducción del material vegetativo de *Anthurium andreanum* L.

El medio MS con una concentración de macronutrientes al 50%, en conjunto con una dosis de 1 ppm (BAP), fue el más adecuado para la introducción de los segmentos de hoja de anturio, con respecto a los comparados; debido a que presentó mejor calidad de tejido calloso en los bordes del explante con un 11% de formación, obteniéndose apenas 2% de mortalidad, sin continuación fúngica y una fenolización inferior a los demás tratamientos.

Los tratamientos T<sub>1</sub> (50% MS; 1ppm BAP) y T<sub>4</sub> (100%; 1ppm BAP), presentaron mayor formación de callo, 11 y 12% respectivamente sin diferencias significativas. Por lo que se concluye que la dosis óptima de citocinina BAP es de 1ppm en la fase de introducción, independientemente de la concentración de macronutrientes MS.

De las cuatro dosis de citocinina (BAP) probadas en la fase de multiplicación se deduce que la dosificación 2.00 ppm fue la más indicada para la obtención de un mayor número de brotes viables, hojas y raíces.

El BAP, a razón de 2.00 ppm en la fase de multiplicación, estimuló una longitud por planta superior a los demás tratamientos y una fenolización mínima de 1%, sin contaminación, ni mortalidad.

## VII. RECOMENDACIONES

Para el proceso de desinfección de anturio se recomienda usar el protocolo de desinfección T<sub>3</sub> (1% Cl (i.a) x 10 min) que mostró mejores resultados en el proceso de desinfección de secciones de hoja previa a la introducción de las mismas en el medio de cultivo.

Para mejores resultados se recomienda la introducción de las secciones de hoja de anturio en medio MS (Murashige-Skoog) con 1 ppm (BAP), del cual se obtendrán un 11 a 12% de formación de callo por cada explante introducido.

Utilizar una dosis de 2.00 ppm BAP para la fase de multiplicación, para la obtener mayor longitud por planta, y mejor calidad de brotes, hojas y raíces.

Se recomienda además continuar con estudios de propagación *in vitro* de anturio con el fin de obtener plantas completas adaptadas a campo.

### VIII. BIBLIOGRAFÍA.

ANTHURA, 2007. Directrices para el cultivo del Anthurium en maceta (en línea). Países Bajos. Consultado el 10 abr. 2010. Disponible en: <http://www.anthura.nl/uploads/downloads/manuals/es/Manual%20Anthurium%20pot%20plants%20SPA.pdf>

Atak, C. y Celik, Ö. 2009. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants (en ingles). Departamento de Biología molecular y genetic. Universidad Istanbul Kultur. Turquía. Rev.: Pak. J. Bot., 41(3): 1155-1161.

Benedictis, K. Correa, A. y Donoso R. 2001. Propuestas para la Mejora de la Competitividad del Sector Exportador de Flores Cortadas en el Ecuador (en línea). Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Consultado el 10 abr. 2010. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3636/1/6163.pdf>

Cañizares, D. 1998. Regeneración de Caricaceas (*Carica pentagona*) por métodos de micropropagación. Tesis. Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias -IASA de la Escuela Politécnica del Ejercito. 13-15, 27p

Castellanos, O. Rodríguez, A. Rodríguez, J. Rodríguez, B. 2006. Organogénesis Indirecta y Enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata* (en línea). Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. Consultado el 10 abr. 2010. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/730/73000415.pdf>

Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una tecnología que nos acompaña hace mucho tiempo (en línea). Unidad de Biotecnología de INIA, Estación Experimental “Las Brujas”, Uruguay. Consultado el 30 mar. 2010. Disponible en: [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf)

Celis, T. 2010. Crean marca para vender flores en mercado de EE.UU (en línea). La República. Cali, Colombia. Consultado el 10 abr. 2010. Disponible en: [http://www.laopinion.com.co/noticias/index.php?option=com\\_content&task=view&id=33070&Itemid=33](http://www.laopinion.com.co/noticias/index.php?option=com_content&task=view&id=33070&Itemid=33).

Cuéllar, J. 2008. El cultivo *in vitro* del corazón chino, *Anthurium andreanum* (en línea). Revista virtual de la Universidad Católica de Occidente Santa Ana, El Salvador, Centro América. Consultado el 26 ene. 2010. Disponible en: <http://www.catolica.edu.sv/investiga/frames/revista32007/corazonchino-18.pdf>

De Paoli, G. Rozzi, V. Scozzoli, A. 1994. Micropropagazione delle piante horttofruticole. Edeagrícola edizione agrícola- Bologna. Pp 182-183.

Fehér, A. Pasternak, T. Otvös, K. Mis kolczi, P. Dudits, D. 2002. Induction of embryogenic competente in somatic plant cells: a review. *Biology* 57:5-12

Folgozo, A. Condés, L. Vicente, F. 2004. Cultivo del *Anthurium* para flor cortada en la región de Murcia (en línea). Oficina Comarcal Agraria. Cartagena, Colombia. Consultado el 25 mar. 2010. Disponible en: <http://www.infoagro.com/flores/flores/Anthurium.htm>

Fundación ALTROPICO. 2005. Estudio de Mercado Local para Flores Tropicales con Potencial Comercial y Productivo desde la Zona de Chical (en línea). Conservación en Áreas Indígenas Manejadas. Ecuador. Consultado el 10 abr. 2010. Disponible en: [http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PNADE069.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADE069.pdf)

FLORES ORGASMIC. 2010. El cultivo de Anturios (*Anthurium andreanum*) (en línea). Consultado el 29 mar. 2010. Disponible en: [http://floresorgasmic.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=48&Itemid=27](http://floresorgasmic.com/index.php?option=com_content&view=article&id=48&Itemid=27)

García, F. 2000. Reguladores del crecimiento (en línea). Unidad Docente de Botánica. Consultado el 21 mar 2010. Disponible en: <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas%20PDF/Tema%2014a%20Reguladores%20del%20Crecimiento.%20Auxinas.pdf>

Geir, T. 1986. *Anthurium scherzerianum* und gewebekulture: Genetische, methodische und okonomische aspekte. VERMEHRUNG. (Alemania) 25 (43): 2030-2033 p.

Geir, T. 1990. *Anthurium*. In Handbook of plant cell culture. McGraw-Hill Publishing Company, New York. p. 228-251 p.

Gonzalez, A. Raisman, J. Aguirre, M. 1999. Hormonas de las plantas (en línea). UNNE. Facultad de Agroindustrias. Consultado el 21 sep 2010. Disponible en: <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>

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.

Jiménez, B. 1996. Propagación clonal *in vitro* de anturio (*Anthurium andreanum* L.) a partir de secciones de hoja joven (en línea). Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales INA. Consultado el 25 mar 2010. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/congreso\\_agronomico\\_X/a50-2388-I\\_301.pdf](http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_X/a50-2388-I_301.pdf)

Krikorian, A. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Department of Biochemistry, State University of New York at Stony Brook (SUNY), Nueva York, E. U. 44-49 p.

Lee, H. Cruz, J. y García, B. 2003. Proliferación de Brotes Múltiples y Aclimatización de Anturio (*Anthurium andreanum* L.) “Midori” y “Kalapana” cultivados *in vitro* (en línea). Revista Fitotécnica Mexicana. Consultado el 26 mar 2010. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/610/61026412.pdf>

Leifert, C. Murphy, KD. Lumsden, PJ. 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. Crit. Rev. Plant Sci. 14:83-109

Liendo, M. Mogollón, N. 2009. Multiplicación clonal *in vitro* del anturio (*Anthurium andreanum* Lind. cv. Nicoya) (en línea). Redalyc, Sistema de Información Científica, vol. 21. Consultado el 26 mar 2010. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=85714207005>

Litz, R. Jarret, R. 1991. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Homestead, Florida, E. U. 152-154 p.

Lucas, E. 2002. Auxinas (en línea). Monografías. Consultado el 21 mar 2010. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos10/auxinas/auxinas.shtml>

Manzo, G. Sánchez, S. 2000. Propagación *in vitro* de Anturio (*Anthurium andreanum* Lind.) (en línea). Fitotecnia UACH. Consultado el 26 mar. 2010. Disponible en: <http://www.soloanthurium.com>

Martínez, C. 2001. Proyecto de exportación de flores tropicales procesadas enmalladas de bambú para el mercado americano (en línea). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas. Ecuador. Consultado el 10 abr 2010. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/53975454/Proyecto-de-Exportacion-de-Anturios>

Montes, S. Morales, C. y Bell, E. 2004. Regeneración de Plantas de *Anthurium andreanum* Lind mediante el empleo del Cultivo *in vitro* (en línea). Cultivos Tropicales, vol.25. Consultado el 26 mar. 2010. Disponible en: [http://www.inca.edu.cu/otras\\_web/revista/pdf/2008/3/CT29315.pdf](http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/pdf/2008/3/CT29315.pdf)

Murashige T, F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantar.* 15: 437-497.

Murguía, J. 2007. Producción de Orquídea, Anturio, Gardenia y Ave del paraíso (en línea). Curso de capacitación, Fundación Produce Veracruz A.C., Universidad Veracruzana. Consultado el 5 abr 2010. Disponible en: <http://www.funprover.org/formatos/cursos/Manual%20de%20Produccion%20de%20Orquideas-Anturio-Gardenia-Ave%20del%20P.pdf>

Neumann, KH (1995) Pflanzliche Zell-und Gewebekulturen. Ulmer, Stuttgart 91(11): 1743-1756

Núñez, L. 2003. Uso de termoterapia y control biológico para el control de *Fusarium oxysporum* en babaco. Tesis. Master en Ciencias de fitoprotección. Sangolquí - Ecuador. Dirección de Postgrado de la Escuela Politécnica del Ejército.

Paz, M. 2000. Ensayo Agronómico para el establecimiento de *Rosa multiflora* Thund. *in vitro*. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 61 p.

Pierik, R. L. M. 1974. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andreanum* Lind. Scientia Hortic. 2: 193-198.

Pierik, R. L. M. 1976. *Anthurium andreanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. Physiol, Plant. (Netherlands) 37 (1): 80-82.

Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Trad. por Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. 3 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 326 p.

Raghavan, V. 2004. Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *American Journal of Botany* 91(11): 1743-1756.

Rebolledo, M. 1987. Factores que afectan la micropropagación *in vitro* del cerezo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán.

Rivero, N. Agramonte, D. Barbón, R. Camacho, W. Collado, R. Jiménez, F. Pérez, M. y Gutiérrez, O. 2008. Embriogénesis Somática en (*Anthurium andreanum* Lind.) variedad “Lambada” (en línea). *Revista Ra Ximbai* Vol.4. Número 1. Consultado el 29 mar. 2010. Disponible en: <http://www.uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-10articulosPDF/Art%5B1%5D%208%20Embriogenesis.pdf>

Roca, W. y Mroginski, L.1991a. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura. Cali, Colombia. 3-9 p.

Roca, W. y Mroginski, L.1991b. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura. Cali, Colombia. 22-35 p.

Ruiz, B. 2000. Efectos del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andreanum* L (en línea). El Zamorano, Honduras. Consultado el 30 mar. 2010. Disponible en: [http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis\\_infolib/2000/T1220.pdf](http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2000/T1220.pdf)

Salgado, J. 2007. Cultivo *in vitro* de *Anthurium andreanum* (en línea). Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología Química, Venezuela. Consultado el 25 mar. 2010. Disponible en: <http://biblioteca.utp.edu.co/tesisdigitales/texto/5810724S164.pdf>

Seemann y Barriga. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. Avances en producción y sanidad vegetal. Cultivos no tradicionales. Ed Universitaria. 230 p.

Soberón, J. Quiroga, E. Sampietro, A. Vattuone, M. 2005. Citocininas (en línea). Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, San Miguel de Tucumán, Argentina. Consultado el 5 mar 2010. Disponible en: [http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores\\_vegetales\\_2005/Citocinas.htm](http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/Citocinas.htm)

Toro, M. 2004. Establecimiento de protocolos para regeneración *in vitro* de cerezo dulce (*Prunus avium*) var. Lambert. Tesis. Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile. 17 - 26.

Trujillo, R. Concepción, O. Daquinta, M. Nápoles, L. Balmaseda, M. 2000. Propagación *in vitro* de *Anthurium andreanum* Lind. variedad "Sonate" (en línea). Universidad de Ciego de Avila, Cuba. Consultado el 14 may. 2010. Disponible en: [http://www.inca.edu.cu/otras\\_web/revista/pdf/2000/3/CT21306.pdf](http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/pdf/2000/3/CT21306.pdf)

Vaca, I. 2008. Incremento del número de brotes de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv BABACO) *In Vitro* mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas. Tesis. Ingeniero Agropecuario. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador.

Vargas, T. Mejías, A. Oropeza, M. y De García, E. 2004. Plant regeneration of *Anthurium andreanum* cv. Rubrun. Electron. J. Biotechnol. 7(3): 10-11.

Yáñez, L. 2011. Establecimiento de Protocolos de Regeneración *In Vitro* de Pumamaqui *Oreopanax ecuadorensis* mediante Cultivo de Tejidos. Tesis. Ingeniero Agropecuario. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Politécnica del Ejercito. Sangolquí, Ecuador.

## **BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR DEL PROYECTO DE GRADO**

**Nombre:** Mirian Belén Oscullo Avila

**Fecha de Nacimiento:** 18 de Agosto de 1986

**Lugar de Nacimiento:** Pichincha/Rumiñahui/Sangolquí

**Instrucción Pre-escolar:**

Colegio “La Inmaculada” (Sangolquí Octubre 1991- 6 de Julio, 1992)

**Instrucción Primaria:**

Colegio “Giovanni Antonio Farina” (San Rafael Noviembre 1992- 15 de Julio, 1998)

**Instrucción Secundaria:**

Colegio “Giovanni Antonio Farina” (San Rafael Noviembre 1998- 3 de Julio, 2004)

**Instrucción Universitaria:**

Escuela Politécnica Superior del Ejército (E.S.P.E), Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias (Septiembre 2004- Marzo 2010).

**Títulos obtenidos:**

- Bachiller en Ciencias. Especialización Químico Biológicas (San Rafael 3 de Julio, 2004).

**Honores obtenidos:**

- Diploma de Honor conferido por: Grupo Santillana (Quito 31 de mayo, 1999).

## **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Mirian Belén Oscullo Avila

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

---

Ing. Patricia Falconí

**DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO**

---

Abg. Carlos Orozco

Sangolquí, 19 de Diciembre del 2011