

Protocolo para la micropropagación de *Anthurium cubense* Engler a partir de semilla botánica

Lourdes R García, Leonardo J Moreno-Bermúdez, Martha Pérez, Mariana La O, Yenny Padrón, Yanet Rodríguez, Leonardo Rivero

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: lourdes@ibp.co.cu; ljmoreno@ibp.co.cu

RESUMEN

La popularidad del *Anthurium cubense*, como planta de maceta, se incrementa cada día. Así mismo, se ha comenzado a extender la línea de productos cultivados para su empleo como follaje. Sin embargo, la propagación tradicional de esta planta no satisface toda la demanda que existe en el mercado. Se hace imprescindible el empleo del cultivo de tejidos para incrementar el número de plantas propagadas. En el presente trabajo se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de esta especie a partir de semilla botánica.

Palabras clave: anturio, cultivo de tejidos, propagación *in vitro*

Protocol for *Anthurium cubense* Engler micropropagation from botanic seed

ABSTRACT

The popularity of *Anthurium cubense*, like pot plant, every day it is increased. Likewise, it has begun to extend the line of cultivated products for their employment as foliage. However, the traditional propagation of this plant does not satisfy the whole demand that exists in the market. It becomes indispensable the use of tissue culture to increase the number of propagate plants. In this work, it was developed a protocol for the *in vitro* propagation of this specie from botanical seeds.

Keywords: anturio, *in vitro* propagation, tissue culture

INTRODUCCIÓN

Las características del follaje de algunas especies de anturios (*Anthurium* spp.) han resultado atractivas para la cosecha de hojas y el cultivo como planta en maceta (Matsumoto y Kuehnle, 1997). Las principales especies cultivadas para la producción de flor cortada o como ornamentales son: *Anthurium andreaeanum* Lind., *A. scherzerianum* Schott, *A. crystallinum* Lind & Andre, *A. cubense* Engler y *A. recusatum* Schott (*A. crassinervium*) (Hernández *et al.*, 2004).

Las especies de *Anthurium* spp. se propagan por semillas, por división, por esquejes y a través de cultivo de tejidos *in vitro* (Matsumoto y Kuehnle, 1997; Martin *et al.*, 2003; Hernández, 2004; Bakhsi-Khaniki *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012; Teixeira da Silva *et al.*, 2015).

A. cubense es una especie demandada por su bello follaje y hábito de crecimiento. La planta presenta hojas con pecíolo delgado de unos 10 cm de largo, el limbo es anchamente lanceolado de 0.5 a 1.5 m de longitud y delgado hacia la base. Posee inflorescencias colgantes, con espádices de hasta 25 cm de longitud y entre 3 y 5 cm de diámetro. Las raíces son fibrosas, profusas, con tendencia a crecer superficialmente. Esta especie tiene gran valor ornamental, puede ser empleada como planta de interior y exterior, cultivada en macetas o jardines directamente en el suelo. Es fácil de cultivar, crece en condiciones de 26-30 °C, humedad relativa de 79-90%, sombra media o densa y escasa circulación de aire (Hernández, 2004).

El cultivo *in vitro* de *A. cubense* ha sido informada por varios autores (Warner *et al.*, 1993; Montes *et al.*, 1999; Montes *et al.*, 2000). Sin embargo,

para la propagación masiva de la especie se requiere disponer de protocolos estandarizados que permitan obtener un elevado número de plantas con adecuadas características genéticas y fitosanitarias. Atendiendo a lo anterior este trabajo tuvo como objetivo presentar un protocolo para la propagación *in vitro* de *A. cubense* desarrollado en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas en Cuba.

PROCEDIMIENTOS

I. Fase 0. Selección y preparación del material vegetal de partida

Materiales

Material vegetal: inflorescencia y frutos de plantas adultas de *A. cubense*. Las plantas madre deben tener condiciones fisiológicas y fitosanitarias adecuadas, sin síntomas de carencias nutricionales o presencia de patógenos (Figura 1).

Otros materiales: recipientes limpios para la colecta de frutos.

Precauciones y medidas de seguridad

Evitar el contacto directo de los frutos con el suelo. Emplear guantes. Lavarse las manos al concluir el ensayo.

Procedimiento

- Seleccionar la planta madre.
- Colectar los frutos maduros (son de color rojo brillante) directamente de la inflorescencia.
- Colocar estos frutos en frasco limpio con tapa y llevar al laboratorio.

II. Fase I. Establecimiento o iniciación del cultivo *in vitro*

Materiales

Material vegetal: frutos de *A. cubense* maduros.

Medio de cultivo de germinación: Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) 4.3 g l⁻¹, Vitaminas MS 10 ml l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹, agar 3.8 g l⁻¹, pH 5.8.

Otros materiales

- Agua corriente
- Agua destilada estéril
- Detergente comercial
- NaOCl
- Recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos)
- Recipientes de cultivo
- Vaso de precipitado de 500 o 1000 ml



Figura 1. Material vegetal de partida para la propagación *in vitro* de *Anthurium cubense* Engler a partir de semilla botánica. A. planta madre, B. inflorescencia y frutos.

Equipos e instrumental

- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas

Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel y la inhalación de vapores de las soluciones de hipoclorito de sodio que pueden causar quemaduras e irritación, respectivamente.

Procedimiento

- Colocar los frutos en recipientes (vaso de precipitado) con agua limpia y detergente.
- Nota:* el volumen de líquido será superior al de los frutos.
- Agitar por varios minutos de forma manual los recipientes para lavar los frutos y eliminar el polvo o la suciedad.
- Decantar el agua con detergente.
- Enjuagar los frutos con agua limpia tres veces.
- Eliminar el agua.
- Transferir los frutos a frascos estériles con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% (v/v) en agua desionizada estéril.
- Mantener los frascos en agitación durante 10 minutos en una zaranda giratoria.

- Colocar los frascos en la cabina de flujo laminar y decantar la solución desinfectante.
- Realizar tres enjuagues con agua desionizada estéril.
- Colocar los frutos desinfectados en los recipientes para la manipulación del material vegetal.
- Extraer la semilla con la ayuda de pinzas y bisturíes estériles.
- Colocar las semillas en frascos estériles con una solución de NaOCl al 1% (v/v) en agua desionizada estéril.
- Mantener en agitación durante 10 minutos en una zaranda giratoria.
- Colocar los frascos en la cabina de flujo laminar y decantar la solución desinfectante.
- Realizar tres enjuagues con agua desionizada estéril.
- Colocar las semillas en recipientes con medio de cultivo de germinación.
- Colocar los recipientes en cámara de crecimiento a 27 °C y luz solar.

Nota: A partir de los 7 días posteriores al establecimiento in vitro comienza a ocurrir la germinación. Transcurridos 20 días las plantas in vitro presentan un sistema radical y foliar desarrollados (Figura 2) y pueden ser transferidas a la fase de multiplicación.

III Fase II. Multiplicación *in vitro*

Materiales

Material vegetal: plantas *in vitro* de *A. cubense*.

Medio de cultivo: Sales MS 4.3 g l⁻¹, tiamina HCl 1.0 mg l⁻¹, mio-inositol 100 mg l⁻¹, 6-Bencilaminopurina (6-BAP) 4.0 mg l⁻¹, Ácido Indol Acético (AIA) 0.65 mg l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹, agar 3.8 g l⁻¹, pH 5.8.



Figura 2. Plantas *in vitro* de *Anturium cubense* Engler con 20 días de cultivo, obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*.

Otros materiales: recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos u otro).

Equipos e instrumental

- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas

Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel.

Procedimiento

- Eliminar de las plantas *in vitro* las raíces y los peciolo de las hojas (Figura 3 A,B)
- Colocar los explantes en medio de cultivo de multiplicación.
- Colocar los recipientes en cámara de crecimiento a 27 °C y luz solar.

Realizar subcultivos cada 30 días, y para ello individualizar los explantes (Figura 3 E). *Nota: se pueden realizar varios subcultivos de multiplicación según los intereses de los propagadores.*

IV Fase III. Enraizamiento *in vitro*

Materiales

Material vegetal: plantas *in vitro* de *A. cubense* procedentes de la fase de multiplicación.

Medio de cultivo: sales MS 4.3 g l⁻¹, tiamina HCl 1.0 mg l⁻¹, mio-inositol 100 mg l⁻¹, Ácido Indol Acético (AIA) 1.3 mg l⁻¹, sacarosa 40 g l⁻¹, agar 3.8 g l⁻¹, pH 5.8.

Otros materiales: Recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos u otros).

Equipos e instrumental

- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas

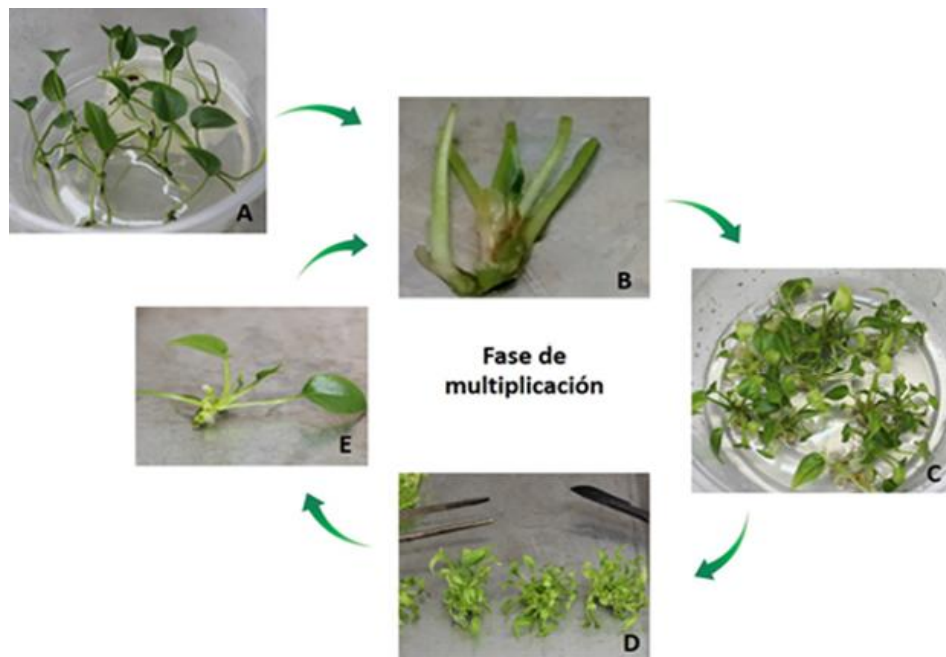


Figura 3. Esquema de la fase de multiplicación de *Anturium cubense* Engler. A: plantas *in vitro* con 30 días de cultivo, obtenidas a partir de semillas germinadas, B: manejo realizado a las plantas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* para pasar a la fase de multiplicación, C y D: brotes *in vitro* en fase de multiplicación, E: brote *in vitro* proveniente de la fase de multiplicación, individualizado para el siguiente subcultivo de multiplicación.

Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel.

Procedimiento

- Individualizar los brotes procedentes del medio de cultivo multiplicación.
- Colocar los explantes en medio de cultivo de enraizamiento.
- Colocar los recipientes en cámara de crecimiento a 27 °C y luz solar durante 30 días.
- Transferir a condiciones *ex vitro* las plantas crecidas con un sistema radical bien desarrollado y de tres a cuatro hojas (Figura 4).

Nota: el período desde la extracción de las plantas in vitro de los frascos de cultivo hasta la plantación en la fase de aclimatización, no debe ser superior a 48 horas. Inmediatamente después de efectuada la extracción de las plantas de los frascos de cultivo, deben ser ubicadas en bandejas con agua limpia. El agua debe cubrir las raíces para evitar la deshidratación.

V Fase IV: Aclimatización

Materiales

Material vegetal: plantas *in vitro* de *A. cubense* procedentes de la fase de enraizamiento.

Sustrato: materia orgánica (compost, humus de lombriz) y zeolita con una proporción 80: 20 (materia orgánica: zeolita).

Otros materiales: Agua corriente, bandejas de polipropileno.

Equipos e instrumental

- Sistema de riego por aspersión

Precauciones y medidas de seguridad

El sustrato a utilizar debe estar libre de semillas de plantas de otras especies y de microorganismos dañinos como pueden ser nemátodos, bacterias y hongos patógenos para la planta. Se debe emplear guantes. Lavarse bien las manos al concluir el ensayo.

Procedimiento

- Las plantas deben ser clasificadas de acuerdo con sus dimensiones para lograr uniformidad cuando se coloquen en la bandeja.
 - Llenar las bandejas con el sustrato.
 - Colocar las bandejas en casas de cultivo con regulación de la luz solar a un 80% a través de un cobertor plástico y malla oscura o sarán.
 - Regar el sustrato con agua corriente hasta que se encuentre bien humedecido.
 - Colocar las plantas en el sustrato y asegurarse de que el sistema radical quede completamente introducido.
- Nota: el riego de las plantas, recién sembradas, debe efectuarse dos veces al día,*



Figura 4. Planta de *Anthurium cubense* Engler a los 30 días de cultivo en fase de enraizamiento.



Figura 5. Plantas de *Anthurium cubense* Engler aclimatizadas en casa de cultivo a los 45 días de plantadas.

cada uno con una duración de 15 minutos. Los horarios de riego deben ser: el primer riego entre las 9:00 y 10:00 am y el segundo posterior a las 4:00 pm. La duración de esta fase es de 90-120 días. Los porcentajes de supervivencia alcanzan el 95% (Figura 5).

CONCLUSIONES

El protocolo desarrollado es aplicable para la propagación masiva de *A. cubense* y para estudios de mejoramiento genético. El empleo de la biotecnología para la propagación masiva de *A. cubense* es un aspecto de gran importancia, ya que puede contribuir a su comercialización como planta para maceta, jardín, o para el empleo de sus hojas en arreglos florales.

Conflictos de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

REFERENCIAS

Bakhsi-Khaniki G, Ghasemi M, Bairamzadeh E (2011) Study of micropropagation of *Anthurium* using tissue culture. *New Cell Mol Biotechnol J* 1(4): 79–87

Gu A, Liu W, Ma C, Cui J, Henny R J, Chen J (2012) Regeneration of *Anthurium andraeanum* from leaf explants and evaluation of microcutting rooting and growth under different light qualities. *HortScience* 47(1): 88–92

Hernández L (2004) El cultivo del *Anthurium*. *Cultivos tropicales* 25(4): 41-51

Martin KP, Joseph D, Madasser J, Philip VJ (2003) Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 39: 500; doi: 10.1079/IVP2003460

Matsumoto TK, Kuehnle AR (1997) Micropropagation of *Anthurium*. En: Bajaj YPS (eds). *High-Tech and Micropropagation VI, Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol 40, pp. 14-29. Springer, Berlin; doi: 10.1007/978-3-662-03354-8_2

Montes S, Hernández MM, Varela M (1999) Organogénesis en *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales* 20(1): 51-54

Montes S, Aldaz JP, Cevallos M, Cabrera JC, López M (2000) Uso del biorregulador PECTIMORF en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales* 21(3): 29-31

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Teixeira da Silva JA, Dobránszkib J, Winarto B, Zeng S (2015) *Anthurium in vitro*: a review. *Sci Hortic* 186:266–298; doi: 10.1016/j.scienta.2014.11.024

Warner J, Herrera J, Guevara E (1993) Morphogenesis *in vitro* de *Anthurium cubense* (Araceae). *Rev Biol Trop* 41(3): 455–460

Recibido: 04-06-2018

Aceptado: 17-07-2018