

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de
organogénesis indirecta *in vitro* de
Anthurium andraeanum L.**

Tesis presentada como requisito parcial para
optar al título de Ingeniero Agrónomo en
el grado académico de Licenciatura

Por:

Bertha Jeannet Ruiz Ruiz

Honduras: Diciembre, 2000.

Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L.

Presentado por

Bertha Jeannet Ruiz Ruiz

Aprobada

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesor Principal

Jorge Iván Restrepo, M.B.A
Coordinador de la Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

Dr. Alfredo Rueda
Asesor Secundario

Dr. Antonio Flores
Decano

Arq. Fernando Fuentes
Asesor Secundario

Dr. Keith L. Andrews
Director General

Dr. Odilo Duarte
Coordinador PIA

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Bertha Jeannet Ruiz Ruiz

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2000

DEDICATORIA.

A Dios y la Virgen por la fortaleza que me han brindado hasta hoy y por ser la luz que ilumina mi camino.

A mi familia por su apoyo total en la distancia, unidad y amor. Por ser el pilar fundamental de mi vida.

A Felipe Cortes por su amor, comprensión y confianza.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí, enseñarme a encontrar las cosas buenas que tiene la vida y darme el valor para continuar día a día.

A mis papás, Antonio Ruiz e Irma de Ruiz, por ser un ejemplo de lucha y superación, por su amor, paciencia y cariño. Gracias por estar siempre a mi lado.

A Felipe por su amor, respeto y fuerza. Gracias por llenar mi vida de alegría y estar a mi lado en los momentos más difíciles.

A Cesar por su dulzura y nobleza, a Teddy y Pablo por su cariño y a Anneliese por su ternura.

A Dinnie de Rueda, por la confianza que me brindo, por todos los consejos y ayuda para realizar este proyecto y por ser una excelente profesional.

A Alfredo Rueda por su paciencia y colaboración en el análisis estadístico.

A Ramiro Reinoso por su gran ayuda y colaboración en todo momento.

A Ericka Salgado y Zoila Sandoval por su alegría y cariño. Y por su colaboración en la realización de este trabajo.

Al Ingeniero Fernando Fuentes por las facilidades brindadas para la elaboración de este proyecto.

A Susan Ponce, Byron Salazar y Gaby Díaz por su eterna amistad, consejos, regaños y apoyo incondicional.

A Juan Luis Gómez por su confianza, sonrisas y por darme una mano cuando más lo necesitaba.

A Adolfo del Cid por todos los detalles que lo hacen un tan amigo especial.

A Miguel, Pietro, Diego, Cesar, Luis y Jorg por su linda amistad.

A mis amiguitos Miguel Angel y Juan Francisco por su cariño y buenas ideas.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A Deutsche Stiftung für Internationale Entwicklung (DSE), por confiar en mi y darme la oportunidad de ser una becaria de su proyecto, durante los tres años de agronomía.

A mis papás, por los esfuerzos que realizaron para financiarme el año de ingeniería y su ayuda durante los cuatro años de carrera.

RESUMEN

Ruiz, B. 2000. Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 36 p.

Anthurium andraeanum L. conocido comúnmente como anturio, es una planta tropical de alto valor comercial por los colores que presenta en su espata y larga duración después del corte. La mayor parte de productores comerciales utilizan plantas propagadas por cultivo de tejidos, ya que este método es rápido y permite obtener plantas sanas, libres de virus y enfermedades. El estudio se realizó con el propósito de determinar la concentración de los reguladores de crecimiento: auxina y citocinina, que debe tener el medio para obtener la mayor formación de callo. Se aplicaron 16 tratamientos preparados en base al medio Murashige & Skoog, con cuatro concentraciones de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) 0, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L y cuatro concentraciones de BAP (bencilaminopurina) 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L en combinación. Se utilizaron explantes provenientes de la vena central de hojas jóvenes y maduras. El 2,4-D a 0.2 mg/L, estimuló la mayor formación de callo, independiente de la dosis de BAP utilizada. Las dosis de 0.5 y 1.0 mg/L de BAP fueron las que mostraron mayor formación de callo, independiente de las dosis de 2,4-D utilizada, un aumento a 0.2 mg/L no mostró mayor estímulo en la formación de tejido calloso. La combinación de 0.05 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP en el medio tuvo mayor la formación de callo, siendo además la dosis de 0.5 mg/L de BAP la que redujo más la oxidación del explante. Para obtener más formación de callo es recomendable utilizar explantes de hojas jóvenes, agregando al medio un antioxidante que reducirá los problemas de liberación y síntesis de compuestos fenólicos del explante. Se deben evaluar concentraciones mayores de 0.2 mg/L de 2,4-D para determinar a que nivel se obtiene la mayor respuesta de formación de callo.

Palabras claves: Anturio, callo, cultivo de tejidos, micropropagación, oxidación.

Dr. Abelino Pitty

NOTA DE PRENSA

Propagación de Anturio *in vitro*: Una opción para el floricultor comercial

El reciente desarrollo de técnicas de micropropagación, ha abierto nuevas y prominentes expectativas para el cultivo, mejoramiento y propagación de un gran número de variedades de flores, en poco tiempo y libres de enfermedades.

El Anturio (*Anthurium andraeanum*), planta que se comercializa como flor de corte por los alegres colores de su inflorescencia (rojo, rosado, verde y naranja) y por su duración después de corte, es una especie que se beneficia de todas las formas de propagación. La regeneración *in vitro* se obtiene vía callos regenerados, a partir de tejidos de embriones, espata, espádice y vena central de la hoja.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación en Zamorano, se multiplica esta especie por medio de explantes provenientes de hojas jóvenes y maduras, y la combinación de los reguladores de crecimiento, tales como: Acido 2,4 diclorofenoxiacético(2,4-D) y Bencilaminopurina (BAP).

Una buena formación de callo se obtiene utilizando 0.2 mg/L del 2,4-D independiente de la dosis de BAP utilizada. Otras dosis efectivas son de 0.5 y 1.0 mg/L de BAP independiente de 2,4-D y la combinación de ambas en una proporción de 0.5 mg/L de BAP y 0.05 de 2,4-D.

Es recomendable utilizar explantes extraídos de hojas jóvenes, ya que estos tiene mayor capacidad de regeneración. Además, se debe añadir al medio un antioxidante, para prevenir la liberación y síntesis de compuestos fenólicos, por parte del explante. Ahora el productor comercial tiene una nueva opción para propagar plantas sanas y vigorosas en poco tiempo.

Lic. Sobeida Alvarez

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de Firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a Patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Nota de Prensa.....	viii
	Contenido.....	ix
	Indice de Cuadros.....	xi
	Indice de Figuras.....	xii
	Indice de Anexos.....	xiii
1.	INTRODUCCION.....	1
2.	REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1	PROPAGACION.....	3
2.1.1	Propagación generativa común.....	3
2.1.2	Propagación vegetativa convencional.....	3
2.2	PROPAGACION <i>IN VITRO</i>	4
2.2.1	Fases de la propagación <i>in vitro</i>	4
2.3	EXPLANTE.....	4
2.3.1	Edad de la planta.....	5
2.3.2	Edad del órgano o tejido.....	5
2.3.3	Tamaño del explante.....	5
2.3.4	Tipos de explante.....	5
2.4	ESTERILIZACION SUPERFICIAL DEL MATERIAL VEGETAL.....	6
2.5	MEDIO NUTRITIVO.....	7
2.5.1	Composición.....	8
2.5.1.1	Agua.....	8
2.5.1.2	Agar.....	8
2.5.1.3	Azúcar.....	8
2.5.1.4	Nutrición mineral.....	8
2.5.1.5	Reguladores de crecimiento.....	8
2.6	VÍAS DE REGENERACION EN CULTIVO DE TEJIDOS.....	10
2.6.1	Organogénesis indirecta.....	10
2.7	EFFECTOS GENOTIPIICOS EN REGENERACION.....	11
2.8	CONDICIONES FISICAS.....	11
3.	MATERIALES Y METODOS.....	13
3.1	UBICACION.....	13

3.2	MATERIAL VEGETAL.....	13
3.3	EXPLANTE.....	13
3.4	EQUIPO, CRISTALERIA E INSTRUMENTOS.....	14
3.4.1	Equipo.....	14
3.4.1.1	Cámara de flujo laminar.....	14
3.4.1.2	Autoclave.....	14
3.4.2	Cristalería.....	14
3.4.3	Instrumentos.....	14
3.5	MEDIO NUTRITIVO.....	14
3.5.1	Composición.....	14
3.5.2	Preparación del medio.....	16
3.6	DESINFECCION.....	17
3.6.1	Pruebas de desinfección previas.....	17
3.6.2	Desinfección química.....	17
3.7	SIEMBRA.....	18
3.8	CUARTO DE CRECIMIENTO.....	18
3.9	VARIABLES EVALUADAS.....	18
3.10	ANALISIS ESTADISTICO.....	19
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	20
4.1	RESPUESTA DE LAS VARIABLES.....	20
4.1.1	Formación de callo.....	20
4.1.1.1	Efecto del estado fisiológico del explante en la formación de callo.....	20
4.1.1.2	Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de callo....	20
4.1.1.3	Efecto de la concentración de BAP en la formación de callo.....	21
4.1.1.4	Efecto de la interacción de 2,4-D y BAP en la formación de callo.....	22
4.1.2	Oxidación.....	23
4.1.2.1	Efecto del estado fisiológico del explante en el control de la oxidación.....	23
4.1.2.2	Efecto de la concentración de BAP en el control de la oxidación.....	24
4.1.3	Días a formación de callo.....	25
4.1.4	Variables no significativas.....	25
5.	CONCLUSIONES.....	26
6.	RECOMENDACIONES.....	27
7.	BIBLIOGRAFIA.....	28

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP, utilizadas por diferentes autores en el medio de inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	9
2.	Composición del medio nutritivo para inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	15
3.	Combinación de concentraciones de BAP y 2,4-D, para inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	16
4.	Concentración y cantidad de soluciones madre utilizadas en la elaboración del medio de cultivo para la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	16
5.	Prueba de desinfección, para manejo de contaminación en la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	17
6.	Efecto del estado fisiológico del explante en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	20
7.	Efecto de la interacción de cuatro concentraciones de 2,4-D y BAP, en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	22
8.	Efecto del estado fisiológico del explante en la oxidación, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	23
9.	Efecto del operario en la contaminación total, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.	25

INDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Diseño de Parcelas Divididas, utilizado en la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.	19
2.	Efecto de cuatro concentraciones de 2,4-D en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	21
3.	Efecto de cuatro concentraciones de BAP en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	21
4.	Efecto de cuatro concentraciones de BAP sobre la oxidación, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	24

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Primera disección de vena central, realizada en la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	29
2.	Segunda disección de vena central, realizada en la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	29
3.	Formación de callo promedio en la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	30
4.	Contaminación por hongo observada durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	31
5.	Contaminación por bacteria observada durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	31
6.	Necrosis observada durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	32
7.	Oxidación observada durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	33
8.	Efecto de cuatro concentraciones de 2,4-D en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	34
9.	Efecto de cuatro concentraciones de BAP en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	34
10.	Efecto de cuatro concentraciones de BAP sobre la oxidación, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	34

11.	Análisis de varianza de los factores investigados en la formación de callo durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	34
12.	Análisis de varianza de los factores investigados en la oxidación promedio, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	35
13.	Porcentaje de las variables evaluadas, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , utilizando hojas jóvenes como explante, El Zamorano, Honduras, 200.....	35
14.	Porcentaje de las variables evaluadas, durante la inducción de organogénesis indirecta <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> , utilizando hojas maduras como explante, El Zamorano, Honduras, 2000.....	36

1. INTRODUCCION

El género *Anthurium*, con más de 600 especies distribuidas en los trópicos americanos, forma el grupo más amplio de la familia Araceae, misma que incluye numerosas plantas ornamentales como la *Dieffenbachia* y el *Philodendron*. Según Geier (1990) dentro del género *Anthurium*, la especie más popular y de mayor importancia económica es *A. andraeanum* Lind., aunque *A. Scherzerianum*, originaria de Guatemala y Costa Rica, también es comercializada como planta de interior en su mayoría para el mercado europeo.

Anthurium andraeanum L, conocido comúnmente como anturio, es una planta tropical originaria del norte de los Andes de América del Sur (Sur de Colombia y norte de Ecuador). Se distingue por su carnoso sistema radicular secundario, con raíces aéreas características de plantas epífitas capaces de resistir estrés hídrico. Sus hojas en forma de corazón son gruesas, coráceas y con un marcado sistema vascular. La inflorescencia está formada por una bráctea o espata con un espádice en el que se desarrollan las minúsculas flores. Su valor comercial está dado por los llamativos colores que presenta la espata (rojo, rosado, verde, bicolor y naranja) y por su duración después del corte. Además de comercializarse como flor de corte, el anturio también se comercializa como planta en maceta, aunque a menor escala.

Según Geier (1990), todas las formas de propagación pueden ser utilizadas para multiplicar el anturio, incluyendo la producción por acodo, la división e incluso la propagación sexual a partir de semilla. La propagación sexual es un proceso bastante lento, ya que el tiempo requerido de polinización a maduración de la semilla es de 6 a 7 meses. Las semillas no pueden ser almacenadas por lo que deben de ser sembradas inmediatamente, sometiendo las plantas resultantes a un proceso de evaluación y selección que puede durar dos a tres años, dando como resultado poblaciones no homogéneas.

El reciente desarrollo de técnicas de micropropagación ha abierto nuevas y prominentes expectativas al cultivo de *Anthurium andraeanum* así como a su mejoramiento. Según Geomar (2000), a nivel comercial, la mayor parte de productores utilizan plantas propagadas por cultivo de tejidos, ya que este método de propagación es rápido y permite propagar un gran número de nuevas variedades en poco tiempo. El cultivo de tejidos también permite obtener plantas libres de virus y enfermedades de tipo fungoso o bacteriano, además las plantas clonadas crecen más rápidamente.

De acuerdo a Geier (1986), la regeneración de anturio ha sido obtenida vía callos regenerados a partir de tejidos de embriones, pecíolo, inflorescencia del tallo, espata, espádice. También se han utilizado explantes de lámina de hoja siendo este tipo de material el que brinda mayor número de segmentos y permite una eficiente desinfección. El tipo de explante utilizado debe de obtenerse de material joven y aún blando.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general:

Establecer un protocolo para formación de tejido calloso en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L.

1.2.2 Objetivos específicos:

- Determinar el mejor método de desinfección que se debe de emplear para obtener bajos niveles de contaminación.
- Determinar la concentración de auxinas y citocininas que debe tener el medio para obtener mayor inducción y formación de callo, a partir de explantes foliares.
- Comparar la respuesta obtenida del cultivo de explantes obtenidos de hojas jóvenes contra la respuesta del cultivo de explantes de hojas maduras.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 PROPAGACION

Todas las formas de propagación comunes pueden ser utilizadas para multiplicar el anturio, como ser la propagación por acodo, la división e incluso la propagación sexual por semilla. A continuación se describen las dos formas de propagación comúnmente usadas según Geier (1986):

2.1.1 Propagación Generativa Común

Anthurium andraeanum L. es una especie de flores protoginas. Aunque las plantas son autocompatibles, la polinización cruzada en algunas plantas es preferida para producción comercial de semilla. Se realiza una selección de plantas "elite" por aspectos como tamaño, forma de la espata y color. Este proceso es muy lento, ya que el tiempo requerido de polinización a maduración de semillas puede durar de seis a siete meses, las plantas deben de ser evaluadas y las semillas seleccionadas se obtendrán en tres años después de sembradas. Por ésto no es sorprendente que el progreso en el mejoramiento de estas plantas sea muy lento y los cultivares de semilla propagada sean pobres en uniformidad. Según Kunisaki (1980), esto da una gran variación en la producción de flores, así como en todas las características del cultivo. Es común que más de un tercio de las plantas semilleras sean descartadas antes de florear.

Otro aspecto importante de esta forma de propagación es que las semillas no pueden ser almacenadas, y deben de ser sembradas inmediatamente. Sin duda se puede llegar a obtener pureza genética, con la selección individual de plantas polinizadas selectivamente, pero se tiene el problema de incesto en la plantación elite.

2.1.2 Propagación Vegetativa Convencional

Según Geier (1990), la propagación vegetativa por cortes terminales y secciones removidas de brotes dormantes, resulta en rangos de multiplicación claramente insuficientes de masas de propagación. Este método ha sido utilizado en una escala limitada, debido al daño físico que se causa a la planta, ya que se pierde la mayoría de veces.

El reciente desarrollo de técnicas de micropropagación ha abierto nuevas y prominentes expectativas al cultivo de *A. andraeanum* L., así como su mejoramiento. Los objetivos reproductivos difícilmente esperados en propagación por semilla, pueden realizarse en un periodo de tiempo razonable en clones micropropagados (Blessington, Clement y Reeser, 1999). Esta técnica ha ayudado a solucionar los problemas de uniformidad y a aumentar las expectativas de conseguir especies con

características mejoradas con respecto a: brotes tempranos, mayor floración y durante todo el año, tolerancia al frío, mejor adaptación a condiciones de luz y calor.

2.2 PROPAGACION *IN VITRO*

Según Pierik (1990), a nivel comercial la gran mayoría de productores utiliza plantas propagadas por cultivo de tejido. Ya que éste es un método de propagación rápido, que permite obtener un gran número de plantas en muy poco tiempo. Además permite obtener plantas libres de virus y enfermedades bacterianas o fungosas.

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos:

1. La constitución genética de la planta.
2. Nutrientes: Agua, macro y micro elementos, y azúcares.
3. Factores físicos que influyen sobre el crecimiento (luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂).
4. Algunas sustancias orgánicas: Reguladores de crecimiento, vitaminas, etc.

2.2.1 Fases de la propagación *in vitro*:

La propagación *in vitro* involucra cinco fases diferentes, que se describen a continuación (Pierik 1990):

Fase 0: Se refiere a lo que ocurre antes de que el cultivo *in vitro* comience: El pretratamiento del material inicial, manteniendo las plantas madre en la medida de lo posible, libre de enfermedades.

Fase 1: En ella se realiza el aislamiento estéril de los explantes. En esta fase se requiere una sola condición importante: Llevar a cabo un crecimiento y desarrollo sin contaminación para poder establecer el cultivo *in vitro*.

Fase 2: Es la fase de multiplicación. El objetivo principal es conseguir la propagación masiva sin perder la estabilidad genética.

Fase 3: Incluye la preparación y enraizamiento de los vástagos y vitroplantas obtenidas en la fase 2, para ser transferidos al suelo.

Fase 4: Comprende la transferencia de las vitroplantas desde el tubo de ensayo al suelo y el establecimiento de las plántulas en el invernadero.

2.3 EXPLANTE

El explante es una porción de tejido escindida, u órgano tomado de la planta, para iniciar un cultivo. Para el establecimiento y desarrollo de cada cultivo se debe seleccionar el explante adecuado (Pierik, 1976). Según Geier (1990), al seleccionar el explante que se va a utilizar se debe de tomar en cuenta los siguientes factores:

2.3.1 Edad de la planta:

Conforme una planta envejece, su capacidad regenerativa suele disminuir, y por eso se tiende a utilizar material procedente de plantas juveniles, mejor que de plantas adultas, especialmente en el caso de árboles y arbustos. Una condición necesaria para la regeneración *in vitro* exitosa de *Anthurium andraeanum* L., es el uso de tejido joven, aún blando como material de explante; por ser una planta monocotiledona, al aumentar la dureza del tejido disminuye la capacidad de regeneración, perdiéndose finalmente (Geier, 1990).

2.3.2 Edad del órgano o tejido:

Los tejidos jóvenes, no lignificados, por lo general son mas apropiados para el cultivo que los tejidos viejos y leñosos, ya que los primeros tienen mayor capacidad de regeneración y número de divisiones celulares. En *Anthurium andraeanum* se pueden utilizar explantes de todos los órganos jóvenes que están en la parte aérea de la planta, preferiblemente de la vena central de la hoja (de la cual se obtienen mayor cantidad de explantes con más eficiente desinfección) y del espádice de la inflorescencia. No es muy conveniente utilizar explantes de los brotes axilares subterráneos, debido a la desinfección más rigurosa que necesitan y eventual destrucción de la planta madre. Los cultivos realizados por Pierik (1990), demuestran que para los explantes de hoja se deben de tomar de aquellas hojas jóvenes que tengan entre 50 y 70% del largo definitivo.

2.3.3 Tamaño del explante:

Se puede decir que es mucho más difícil inducir el crecimiento en estructuras muy pequeñas como células, que en estructuras más grandes, como explantes de hoja. Cada fracción aislada tiene su propia porción de reservas y hormonas, y es obvio que mientras mayor sea el fragmento vegetal, más fácil es inducir el crecimiento y la regeneración. Según Geier (1990), en el caso de las hojas el tamaño de explante utilizado es un cuadrado de 10-14 mm, conteniendo una porción de la vena central, lo que permite obtener un buen número de explantes de cada hoja.

2.3.4 Tipos de explante:

Reportes del cultivo *in vitro* de anturio realizados por Geier (1990), demuestran que se ha obtenido regeneración de la planta vía callo a partir de tejidos de embriones, explantes de lamina de hoja, peciolo, inflorescencia del tallo, espata y espádice. Se ha tenido éxito en la inducción de regeneración, primero con embriones y tejidos de semilla y después con partes del meristemo de plantas maduras.

Se considera problemática la utilización de explantes originados de brotes axilares, ya que la desinfección es más difícil y la planta madre se destruye eventualmente.

La propagación a través de segmentos de hoja es la más utilizada, ya que da la mayor cantidad de explantes y se desinfectan mas eficientemente que la espata o el espádice, por lo que la pérdida de material por ataque de microorganismos en este caso es mucho menor (Geier, 1986).

2.4 ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DEL MATERIAL VEGETAL

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

Los estudios realizados por Geier (1986) demuestran que la fase crítica para la propagación *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L. es la etapa de iniciación (establecimiento del cultivo). Para este cultivo existen diversos factores que intervienen en la formación de callos y brotes en el cultivo primario que en la actualidad no han podido ser manejados, como el método de desinfección a utilizar.

Las recomendaciones obtenidas a partir de pruebas realizadas por diferentes autores permiten conocer distintas formas de llevar a cabo la desinfección de los diferentes tipos de explantes utilizados. La mayoría incluyen soluciones que utilizan como ingrediente activo el hipoclorito de sodio (NaOCl). A continuación se presentan diversas formas de llevar a cabo la desinfección:

- Geier (1986), recomienda sumergir el material en alcohol al 70% por unos segundos, seguido por una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) que contenga 15gr/L de cloro activo y 0.5 ml de Tween por cada 100 ml de solución desinfectante durante 10-15 min. Finalmente enjuagar tres veces con agua destilada estéril durante 10, 30 y 60 min.
- Un estudio realizado por el Instituto Nacional de Aprendizaje INA (1994), recomienda lavar las hojas con agua y jabón líquido. Inmediato al ingreso del material al laboratorio. Después de este lavado, sumergir las hojas en una solución comercial de hipoclorito de sodio al 3% por 15 min. conteniendo tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución de cloro. Seguidamente hacer tres lavados de 2 min. cada uno con agua destilada estéril. Después se continua con la disección utilizando solamente la vena central, de la que se toma 3 cm de ancho y 8 cm de largo. Por segunda vez se sumerge el tejido en una solución de hipoclorito de sodio al 0.4% durante 5 min. , Seguido por 4 enjuagues de 2 min. cada uno con agua estéril destilada.
- Para el espádice, Geier (1986) recomienda sumergir la inflorescencia cerrada en alcohol al 70% por 5 seg. Luego colocar en una solución de hipoclorito de sodio (1.5%de cloro activo) por 15-25 min. Lavar tres veces con agua destilada estéril por 10, 30 y 60 min. Remover el espádice y sumergirlo nuevamente en una solución de NaOCl con una concentración de 1.5% de cloro activo y finalmente enjuagar tres veces con agua estéril destilada durante 10, 30 y 60 min.

CIAT (1991) recomienda que la esterilización química (erradicación de los microorganismos por medio de sustancia químicas), se debe realizar con los siguientes compuestos:

- Alcohol (ethanol); para material vegetal se utiliza alcohol al 70%, ya que el de 96% deshidrata demasiado. El alcohol no destruye todos los microorganismos, por

- lo que es necesario tratar los tejidos con una solución desinfectante conteniendo hipoclorito de sodio como ingrediente activo después del tratamiento con alcohol.
- Hipoclorito de sodio; generalmente viene en una concentración de 5.25% de ingrediente activo, por lo que se lleva a la concentración deseada mezclándolo con agua destilada.
 - -Tween 80; Agente mojante que disminuye la tensión superficial permitiendo un mejor contacto superficial del explante con la solución desinfectante.

Pierik (1990) indica que la elección de la concentración de hipoclorito de sodio y del tiempo de exposición a la solución desinfectante y depende de si la superficie del explante que se esteriliza se va a conservar (esterilización suave) o se va a cortar antes de la inoculación (esterilización vigorosa).

2.5 MEDIO NUTRITIVO

Según Pierik (1990) los medios nutritivos están compuestos de un gran número de sustancias o mezclas de sustancias. Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta; Sin agua y sin nutrientes minerales una planta no puede vivir *in vivo* ó *in vitro*. Estos factores intervienen en todo tipo de procesos como fotosíntesis, evaporación, absorción de agua, etc.

La elección de la formulación nutritiva a utilizar depende de muchos factores (Pierik, 1990) como ser:

- La especie con la que se trabaja.
- La edad de la planta.
- La edad del órgano o tejido.
- El tipo de órgano o tejido que se cultiva.
- El proceso *in vitro* que se esta llevando a cabo.

El cultivo *in vitro* de anturios utiliza básicamente el medio derivado de la formula de Murashige & Skoog (MS), empleándose la mitad de los macroelementos, el total de los microelementos y hierro, la sacarosa es reemplazada por glucosa y las hormonas BAP y 2,4-D son modificadas en cada etapa de crecimiento y desarrollo (Geier, 1990).

2.5.1 Composición

2.5.1.1 Agua. La calidad del agua utilizada es de gran importancia ya que constituye el 95% del medio nutritivo. Para los trabajos de investigación se recomienda que el agua utilizada haya sido bidestilada.

2.5.1.2 Agar. En el cultivo de *Anthurium andraeanum* el medio a utilizar debe ser sólido, para que haya crecimiento y diferenciación de órganos (Pierik, 1990). El agar es un derivado de algas marinas, que se usa como gelificante. El agar disuelto forma un gel que es capaz de retener el agua y adsorber compuestos. La concentración usual para el agar es de 0.6-0.8%, para que gelifique adecuadamente.

2.5.1.3 Azúcar. Es un componente esencial en cualquier medio nutritivo, para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis e incluso en la oscuridad. Los tejidos verdes *in vitro* no son suficientemente autotróficos (Pierik, 1990). Para el cultivo de anturio Liu (1993) recomienda utilizar glucosa, la concentración dependerá en gran parte del tipo y la edad del material vegetal.

2.5.1.4 Nutrición mineral. Después de los azúcares, los minerales constituyen el grupo de sustancias nutritivas más importantes en el medio de cultivo *in vitro*. Los nutrientes inorgánicos son aquellos requeridos normalmente por la planta se dividen en macro y microelementos. Los macroelementos son esenciales para la planta y son requeridos en concentraciones milimolares, entre éstos tenemos: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre y magnesio. Los microelementos son nutrientes esenciales requeridos en concentraciones micromolares, como lo son: magnesio, zinc, boro, cobre cobalto, cloro, yodo y molibdeno. Como fuente de hierro se utiliza la sal monosódica de hierro NaFeEDTA, que lo hace más disponible a la planta por ser una molécula quelatada (Pierik, 1990).

Existe una gran cantidades de mezclas de macro y microelementos. La mezcla más utilizada en el cultivo de anturio, se deriva de una modificación de la formula de Murashige & Skoog, que consiste en el uso de los macroelementos al 50% y el hierro y los microelementos al 100% (Liu, 1993).

La concentración de nitrato de amonio (NH_4NO_3) MS en el medio de cultivo es uno de los factores que se encuentra directamente relacionado con la formación de callo y la inducción de brotes adventicios en *Anthurium andraeanum*. Según Kunisaki (1980) esta concentración debe ser la mitad de la utilizada en un medio normal de Murashige & Skoog, o sea de 825 mg/L.

2.5.1.5 Reguladores de crecimiento. Según Pierik (1990) este grupo de componentes representa un conjunto de productos sintéticos que tienen una actividad semejante a las hormonas. Son responsables, en primer lugar de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza, además de determinar el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta.

En el cultivo *in vitro*, los reguladores, especialmente las auxinas y citocininas, juegan un papel muy importante. Se puede decir que el cultivo de tejidos *in vitro*, es casi imposible sin reguladores. Los reportes de Geier (1990) sobre inducción de callo demuestran que el cultivo en *Anthurium andraeanum*, en ausencia de hormonas no muestra formación de callo.

Los reguladores utilizados en el cultivo de anturio son principalmente auxinas y citocininas.

Las auxinas sintéticas y relativamente más activas tales como el ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido α -naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias. A bajas concentraciones predomina la formación de raíces adventicias y a altas concentraciones se da la formación de callo en lugar de raíces (Pierik, 1990).

Las citocininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, siendo las más comunes: Kinetina, 6-bencilaminopurina (BAP), 6-(γ,γ -dimetilamino) purina (2iP) y el 6-(bencilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl)-9H-purina (PBA). Las citocininas estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. Estos compuestos promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical; También retardan el envejecimiento.

Según Kunisaki (1980) la adición de las hormonas (auxinas y citocininas) es esencial para la inducción y formación de callo, y crecimiento del cultivo. A continuación se presentan las diferentes concentraciones de auxinas y citocininas utilizadas por diferentes autores en sus cultivos (Cuadro 1):

Cuadro 1. Diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP, utilizadas por diferentes autores en el medio de inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Hormona	Dosis (mg/L)	Autor	Año
BAP	0.5	Geier	1990
	1.0	Pierik	1990
	1.5	Kunisaki	1991
2,4-D	0.10	Geier	1990
	0.08	Pierik	1990
	0.02	Kunisaki	1991

2.6 Vías de Regeneración en Cultivo de Tejidos

Los diferentes métodos de propagación vegetativa *in vitro* incluyen: Esquejes de segmentos nodales, ramas axilares, generación de órganos adventicios (raíces o vástagos) sobre explantes, formación de órganos adventicios y embriones somáticos sobre callo, y regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares y protoplastos (Pierik, 1990).

Existen dos procesos en la formación de órganos adventicios, conocidos como 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.

La regeneración de órganos a partir de callo ú organogénesis indirecta, es un proceso bastante complejo, ya que las correlaciones existentes deben de ser rotas, antes de establecer otras nuevas que conduzcan a la regeneración de órganos. Este proceso consta de las siguientes etapas:

- Desdiferenciación de células diferenciadas.
- División celular, generalmente seguida por formación de callo; cuando se dirige la división celular, puede comenzar la iniciación de órganos.
- Iniciación de órganos (formación).
- Desarrollo de órganos (Pierik, 1990).

2.6.1 Organogénesis indirecta

Un callo es un tejido tumoral, mas o menos organizado, que surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. Se llama 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 desdiferenciación, 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 desdiferenciación, las células se empiezan a dividir rápidamente bajo la influencia de reguladores de crecimiento, lo que da lugar al callo (Pierik, 1990).

Geier (1990) indica que cualquier tipo de 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 iniciar la formación de callos a partir de un explante es necesario agregar reguladores exógenos al medio de cultivo. El 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 mas 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.

Se considera 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 al padre en la medida que sea posible.

2.7 EFECTOS GENOTIPIICOS EN REGENERACION

Según Geier (1990), el factor más crítico en el cultivo de tejidos de anturio es el genotipo, ya que las respuestas que se han obtenido muestran diferencias en el rango de crecimiento de clones de tejidos obtenidos de los callos. Dependiendo del genotipo utilizado se han observado un gran número de diferencias genéticas en plantas de la misma especie, encontrando una estrecha correlación entre la habilidad de formar callo y el crecimiento de los cultivos. La proliferación a partir de callos no es conveniente, ya que se van a dar muchas más variaciones genéticas (poliploidía, mutaciones cromosómicas y genéticas) en las plantas obtenidas a partir de callo que en aquéllas obtenidas directamente del meristemo del ápice del brote.

La variación en el tamaño de la planta, grado de ramificación y otras características observadas en las plantas provenientes de cultivo *in vitro*, es probablemente debida a factores como la diferencia en el tamaño del explante y la continua acción de hormonas que se utilizan (Kyte y Kleien, 1996).

2.8 CONDICIONES FISICAS

La inducción, desarrollo y formación de callo se da cuando el material *in vitro* se tiene a una temperatura de 25°C y condiciones de continua oscuridad. Según Kyte y Kleien (1996), antes de que los brotes etiolados sean colocados a la luz, se debe realizar una aclimatación a 23°C, bajo condiciones de luz fluorescente continua cuatro semanas; durante este período se da la formación y desarrollo de hojas.

La formación de callo del cultivo ha mostrado ser dependiente de la posición de la hoja cuando el explante ha sido extraído. Para la siembra se debe realizar de forma polar, es decir colocando el lado basal del explante sobre el medio, en el caso de anturio se debe colocar el envés de la hoja en contacto directo con el medio de cultivo.

La duración total del ciclo desde el establecimiento del explante de hoja hasta la inducción y formación de callo es de aproximadamente 3 meses, más aproximadamente 10 meses adicionales hasta tener terminada la planta, ya aclimatada bajo condiciones de invernadero (Pierik, 1990).

3.MATERIALES Y METODOS

3.1 UBICACION

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de El Zamorano, ubicado en el Departamento de Francisco Morazán, Honduras.

3.2 MATERIAL VEGETAL

La plantación de *Anthurium andraeanum*, con espádice y espata de color rosado, se encuentra ubicada en el sombreadero del departamento de Horticultura. El material vegetal utilizado fueron hojas jóvenes con la lamina recién extendida y hojas maduras, procedentes de plantas que se encontraban sin tratamiento fitosanitario adecuado y deficiente nutrición, por lo que la plantación fue sometida a aplicaciones semanales de fertilizante foliar Bayfolan[®] (75 ml/bomba de 21 litros), con el fin de obtener material vigoroso, así como aplicaciones quincenales del bactericida Agrymicin[®] 16.5 WP (3gr/l). Los fungicidas preventivos y curativos Mancozeb[®] 80 PM (3.5gr/l) y Ridomil CT[®] 60 WP (3gr/l) respectivamente, fueron intercalados semanalmente para su aplicación.

3.3 EXPLANTE

La recolección del material a utilizar se llevó a cabo en horas de la mañana, tomando en cuenta el tamaño de la hoja y la apariencia que presentaba. Las hojas eran cortadas con una tijera de podar, dejando una porción de pecíolo de aproximadamente 3.0 cm de longitud. Luego el material fue trasladado al laboratorio, envuelto en papel toalla previamente humedecido y en bolsas plásticas. El mismo día de la siembra se realizaba el corte y selección del material a utilizar, el excedente se descartaba.

Cuando el material, previamente desinfectado, se encontraba en la cámara de flujo laminar, se realizaba la primera disección, utilizando un bisturí y pinzas estériles sobre un plato Petri, cortando la vena central y descartando los dos extremos de ésta, quedando un explante de aproximadamente 8 cm de largo y 3 cm de ancho (Anexo 1).

La segunda disección se realizaba sobre este explante, cortando porciones de 1cm de ancho y 1 cm de largo de la misma vena central (Anexo 2).

3.4 EQUIPO, CRISTALERIA E INSTRUMENTOS.

3.4.1 Equipo

3.4.1.1 Cámara de flujo laminar: Lugar en el que se lleva a cabo la preparación y separación de los explantes. Es una cámara en la cual el aire que es tomado del exterior, se hace pasar a través de un filtro de poro muy fino HEPA, antes de que llegue a la mesa de la cámara de inoculación, asegurando que el flujo de aire sobre la mesa es completamente estéril. Consta además de tubos fluorescentes para su iluminación.

3.4.1.2 Autoclave: Aparato que esteriliza por medio de vapor a presión medios nutritivos, cristalería e instrumentos de trabajo. Tiene un rango de temperaturas entre 115 y 135 ° C. La esterilización, depende de: Tiempo, presión, temperatura y volumen del objeto que se va a esterilizar (Pierik, 1990).

La esterilización de herramientas previamente empacadas en papel aluminio y estraza, así como del medio de cultivo preparado y dispensado en sus tubos, se realizó en un autoclave a una temperatura de 120°C, con una presión de 15 psi durante 20 minutos.

3.4.2 Cristalería

Para la preparación del medio se utilizo material de vidrio diverso, entre estos bikers, probetas, pipetas, embudos, balones, tubos de ensayo de 25 x 150 mm y jeringas automáticas dosificadoras. En la cámara de flujo laminar se utilizaron platos Petri, tubos de ensayo, mecheros y bikers.

Toda la cristalería era lavada con detergente, recibiendo un primer enjuague con agua de llave y el segundo con agua bidestilada. El secado de platos Petri y bikers se realizaba a una temperatura de 120 ° C en un horno, durante cuatro horas.

Los platos Petri eran envueltos en papel aluminio y estraza antes de esterilizarlos en el autoclave.

3.4.3 Instrumentos

Para realizar las divisiones y siembra del material, se utilizaron bisturíes y pinzas que recibían un lavado con detergente y jabón, secado al aire y se envolvían en papeles aluminio y estraza para su posterior esterilización en el autoclave.

3.5 MEDIO NUTRITIVO

3.5.1 Composición

El medio nutritivo utilizado para el establecimiento de anturio, consistió en una modificación del medio original de Murashige & Skoog (MS), que se describe en el cuadro 2. Se utilizó la mitad de los macroelementos recomendados en el medio MS, debido a que una alta concentración de nitrato de amonio (NH_4NO_3) no permite la

regeneración de brotes adventicios en los tejidos de los callos (Pierik, 1990); tanto los microelementos y NaFeEDTA fueron utilizados como lo indica la receta original. El pH se ajustó a 5.7 con ayuda de un pH-metro.

Cuadro 2. Composición del medio nutritivo para la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Compuestos	mg/L
Macroelementos (1/2 MS)	
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	825.00
Nitrato de potasio (KNO ₃)	950.00
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .H ₂ O)	220.00
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	185.00
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	85.00
Microelementos (MS)	
Acido bórico (H ₃ BO ₄)	6.20
Sulfato de manganeso, monohidratado (MnSO ₄ .H ₂ O)	16.90
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8.60
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Molibdato de sodio (NaMoO ₄ .2H ₂ O)	0.25
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .H ₂ O)	0.025
Cloruro cobáltico (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0.025
NaFeEDTA	50.00
Vitaminas	
Acido nicotínico	0.50
Tiamina HCl	0.40
Piridoxina HCl	0.50
Inositol	100.00
Aminoácido	
Glicina	2.00
Azúcar	
Glucosa	30000.00
Phytigel pH = 5.7	3.00

Se realizaron 16 combinaciones diferentes de los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) a concentraciones de 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L, con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a concentraciones de 0, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L, para un total de 16 tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Combinación de concentraciones de BAP y 2,4 -D, para la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

	BAP (mg/L)			
	0	0.5	1.0	2.0
2,4 -D (mg/L)				
0	1*	2	3	4
0.05	5	6	7	8
0.1	9	10	11	12
0.2	13	14	15	16

* Número de tratamiento.

3.5.2 Preparación del Medio

Para la elaboración del medio se utilizaron soluciones madres concentradas de macroelementos, microelementos y NaFeEDTA. Para los macroelementos se utilizó una solución madre concentrada 10 veces, utilizando 50 ml por litro de medio. Para los microelementos se utilizó una solución concentrada 1000 veces, utilizando 1 ml por litro. Para suplir el hierro se utilizó una solución concentrada 200 veces, a una cantidad de 5 ml por litro (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración y cantidad de soluciones madre utilizadas en la elaboración del medio de cultivo para la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Solución	Concentración	Cantidad (ml/l)
Macroelementos	10x	50.00
Microelementos	1000x	1.00
NaFeEDTA	200x	5.00

La mezcla de los compuestos se realizaba en un biker al que se agregaban 100 ml de agua bidestilada que se mantenía en constante agitación por medio de un plato agitador. Se inició con la adición de las soluciones de los macroelementos, microelementos y hierro respectivamente, los compuestos orgánicos (vitaminas, glicina y glucosa) se prepararon en soluciones madres diluidas de 1:1, y se agregaron uno por uno a la mezcla.

Se continuó con la aforación del medio a 2400 ml y se ajustó el pH a 5.7 con el uso de KOH y HCl. El medio se dividió en 16 partes iguales, en bikers de 250 ml etiquetados con su respectivo tratamiento, para agregarles la concentración de los reguladores de crecimiento respectivo, (Cuadro 3). Se prosiguió con la adición de Phytigel a cada medio, llevándoles a calor en un microondas, para que el phytigel se disolviera y obtener la consistencia deseada. Luego se distribuyó cada medio en los tubos de ensayo a razón de 10 ml/ tubo, previamente marcados con su número de tratamiento y repetición. Se taparon con tapones plásticos y se llevaron al autoclave para esterilización a una temperatura de 120 ° C y una presión de 15 psi durante 20 minutos. Obteniéndose así los 16 tratamientos, con 15 repeticiones (tubos) por tratamiento.

3.6 DESINFECCION

3.6.1 Pruebas de desinfección previas.

Debido a los problemas de contaminación elevados que presenta este cultivo, se realizaron pruebas preliminares de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCL) y tiempos de desinfección (Cuadro 5). El ensayo se realizó a nivel de cámara de flujo laminar y utilizando medio de iniciación de Murashige & Skoog (Cuadro 2) como base y agregando 1.5 ml/l de BAP y 0.20 ml/l de 2,4-D. Sembrándose 10 tubos por tratamiento. Con los resultados obtenidos, se tomo la decisión de iniciar con el experimento, ya que el nivel de contaminación fue considerablemente bajo.

Cuadro 5. Prueba de desinfección, para manejo de contaminación en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tiempo de Exposición (min)	Concentración de Hipoclorito de Sodio (% de ingrediente activo)			
	0	1.5	3.0	4.5
0	10 ¹	10	10	10
10	3	3	3	3
15	3	2	3	3
30	3	3	3	3

¹ Número de tubos contaminados, de 10 tubos sembrados por tratamiento.

3.6.2 Desinfección química

Después de la recolección de las hojas, éstas fueron transportadas al laboratorio donde se lavaron con agua y jabón líquido, tratando de no dañar el tejido. Luego se secaron cuidadosamente con papel toalla y se colocaron en bandejas plásticas para su introducción al cuarto de transplantes.

A nivel de cámara de flujo laminar, las hojas previamente lavadas se introdujeron en ethanol al 70% por 5 segundos, lo que elimina las burbujas de aire permitiendo a la solución desinfectante un mejor contacto con el material vegetal. Se continuó con la inmersión en la solución desinfectante a base de hipoclorito de sodio al 3% de ingrediente activo para las hojas jóvenes y al 4.5% de ingrediente activo para las hojas maduras, más tres gotas de Tween 80 (nombre comercial del agente mojante) por cada 100 ml de solución desinfectante. Las hojas se mantuvieron en la solución desinfectante durante 15 minutos, en constante agitación. Finalmente se realizaron dos enjuagues con agua bidestilada estéril de tres minutos cada uno.

3.7 SIEMBRA

La siembra fue realizada por tres operarios, con el propósito de disminuir el error experimental que se podría dar por contaminación y forma de siembra. Cada operario tenían a su cargo los dieciséis tratamientos con cinco repeticiones de cada uno, el número de repetición por tratamiento fue escogido al azar previo a la siembra.

Se realizaron dos siembras del mismo cultivar en fechas distintas, la primera siembra para las hojas jóvenes y la segunda para las hojas adultas.

Después de realizar el lavado de las hojas y la desinfección química de éstas, se procedió a cortar las hojas al tamaño deseado. Con la ayuda de pinzas largas previamente esterilizadas se sacaron las hojas del enjuague final, se colocaron en un plato Petri. Con un bisturí # 21 y pinzas pequeñas previamente flameadas se realizó el corte de la vena central y de ésta se sacaron los explantes del tamaño deseado (1 cm × 1 cm). La siembra del material se realizó colocando el explante de manera que todo el envés de la hoja hiciera contacto con el medio. Para evitar contaminación cada tubo de ensayo era flameado inmediatamente al abrirlo para introducir él explante y antes de cerrarlo.

Al final de la siembra, cada tubo se selló con parafilm y se marcó con la fecha y nombre de la operario que realizó la siembra. Después las bandejas con los tubos fueron trasladadas al cuarto de crecimiento.

3.8 CUARTO DE CRECIMIENTO

Después de la siembra, las bandejas con los tubos fueron trasladadas al cuarto de crecimiento, mismo que se mantiene a una temperatura de 25 °C, una irradiancia de 36 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz, usando tubos fluorescentes de tipo blanco frío. Debido al requerimiento de total oscuridad del cultivo para la inducción de callo, las bandejas con los tubos se colocaron en cajas de cartón limpias y previamente desinfectadas con alcohol al 70%, cubriéndolas con telas oscuras para evitar la entrada de luz.

3.9 VARIABLES EVALUADAS

Una semana después de la siembra se inició con la revisión de los tubos de ensayo. La toma de datos se inició 8 semanas después de la siembra. Las variables que se midieron fueron:

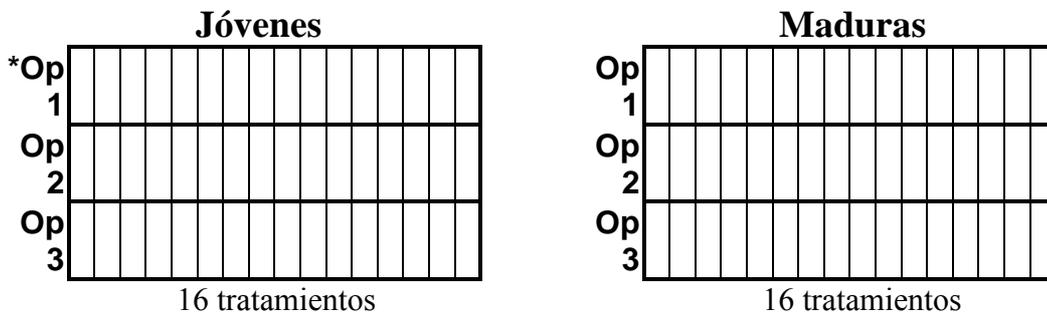
1. Formación de callo: se revisó sí había o no-formación de callo en los explantes (Anexo 3).
2. Días a formación de callo: Se consideraba que había iniciado la formación de callo al observar pequeñas protuberancias alrededor del explante.

3. Contaminación: Los tubos contaminados eran desechados y se clasificaba según el tipo de contaminación por hongo o bacteria (Anexo 4 y 5).
4. Necrosis: si el explante mostraba tejido muerto necrotizado (Anexo 6).
5. Oxidación: Todo explante que mostró un exudado café se consideró como oxidado (Anexo 7).

ANALISIS ESTADISTICO

Las variables analizadas fueron distribuidas en un diseño de Parcelas Subdivididas. La parcela principal la determinó el tipo de explante utilizado, una parcela principal de explantes de hojas jóvenes y otra parcela principal de explantes de hojas maduras. Cada parcela principal se dividió en sub-parcelas de acuerdo al operario que realizó la siembra, y cada sub-parcela se subdividió en sub-sub-parcelas según los tratamientos de las hormonas 2,4-D y BAP (Figura 1). Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico MINITAB Release 12®, por medio de un análisis de varianza y separación de medias.

Figura 1. Diseño de Parcelas Subdivididas, utilizado en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.



* Operario.

Se utilizaron valores promedios de los 8 tubos sembrados por cada operario por tratamiento, para realizar el análisis de varianza y separación de medias. El análisis de varianza se realizó para todas las variables evaluadas y el análisis de separación de medias (prueba DMS), para todas las variables que tuvieran un valor P(F) menor de 0.05

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESPUESTA DE LAS VARIABLES

4.1.1 Formación de callo

La presencia de callo se analizó en base a los factores más influyentes como son: Estado fisiológico del explante, la concentración de las hormonas 2,4-D y BAP (Anexo 8 y 9) y la interacción de estas por cada tratamiento.

4.1.1.1 Efecto del estado fisiológico del explante en la formación de callo.

La edad de la hoja mostró tener un efecto positivo en la formación de callo en el explante, ya que se observó mayor respuesta a formación de callo en los explantes obtenidos de hojas jóvenes que en los explantes obtenidos de hojas maduras (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto del estado fisiológico del explante en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Edad	FPC ¹	GL	P(F)
Hojas Jóvenes	3.333 ^a	1	0.018
Hojas Maduras	1.667 ^b		

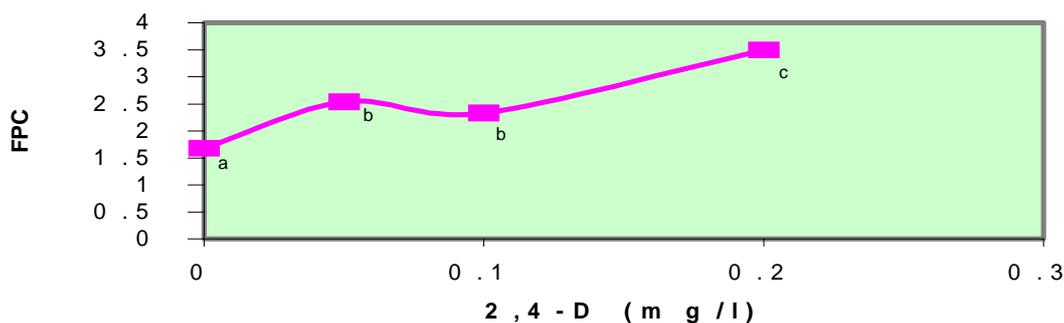
^a y ^b Medidas con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$, usando prueba Tukey.

¹ Formación promedio de callo.

Según Pierik (1990), la capacidad regenerativa de los órganos o tejidos de una planta disminuye a medida que van estos van madurando, siendo los tejidos jóvenes los más apropiados para el cultivo de tejidos.

4.1.1.2 Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de callo.

El 2,4-D, auxina utilizada para estimular la formación de callo, indujo una mejor respuesta al ser utilizada en la concentración más alta (0.2 mg/L). La menor formación de callo se obtuvo cuando no se agregó 2,4-D al medio. Las concentraciones intermedias 0.05 y 0.1 mg/L, no mostraron ser significativamente diferentes, obteniéndose promedios similares, pero mayores que al no agregar la auxina en la formación de callo (Figura 2, Anexo 8).



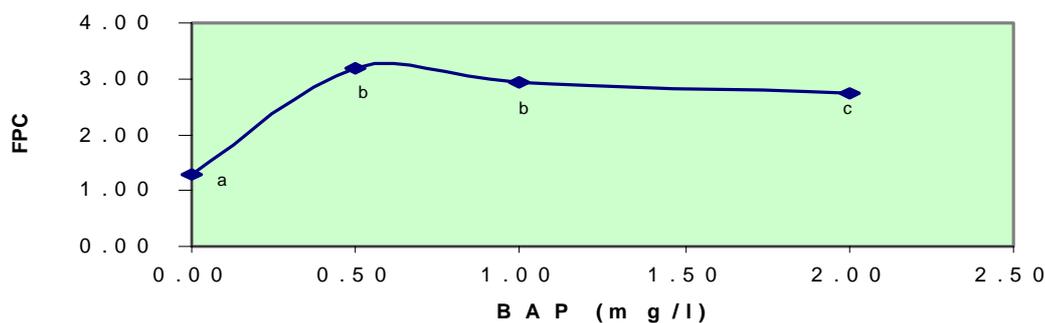
a, b y c Medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$, usando prueba Tukey.
FPC Formación promedio de callo.

Figura 2. Efecto de cuatro concentraciones de 2,4-D en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Pierik (1990), recomienda utilizar concentraciones altas de auxinas al medio para estimular la formación de callo. Reportes realizados por Geier (1990), indican que en la ausencia de auxinas muy pocos explantes forman callo, por lo que es necesario añadir esta hormona si se desean obtener altos porcentajes de respuesta del explante en cuanto a formación de callo.

4.1.1.3 Efecto de la concentración de BAP en la formación de callo.

La citocinina BAP, utilizada en el establecimiento de anturio, estimuló una formación de callo mayor al utilizarse en las concentraciones intermedias de 0.5 y 1.0 mg/L. Se observó una disminución en la formación de callo a una concentración de 2.0 mg/L de BAP. El no añadir BAP al medio de cultivo indujo la respuesta más baja de formación de callo (Figura 3, Anexo 9).



a, b y c Medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$, usando prueba Tukey.
FPC Formación promedio de callo.

Figura 3. Efecto de cuatro concentraciones de BAP en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Geier (1990), recomienda la adición de BAP al medio de cultivo para anturio, ya que resulta en una formación de callo más persistente. Además ha reemplazado el PBA, ya que el BAP es más disponible, más barato y generalmente muestra los mismos resultados. Estudios realizados por Kunisaki (1980), demuestran que los mejores resultados para formación promedio de callo se han obtenido con concentraciones medias de 0.6 a 1.0 mg/L de BAP, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

4.1.1.4 Efecto de la interacción de 2,4-D y BAP en la formación de callo.

El efecto de la interacción de la auxina 2,4 -D y la citocinina BAP, muestra que el mejor promedio de formación de callo se obtuvo utilizando 0.05 mg/L de 2,4 - D y 0.5 mg/L de BAP. Con igual nivel de significancia se obtuvo formación de callo en los tratamientos en que se utilizó 0.2 mg/L de 2,4-D con 1 mg/L de BAP, y 0.2 mg/L de 2,4-D con 2.0 mg/L de BAP, siendo estos tratamientos los que contenían la mayor concentración de 2,4 -D y las dos concentraciones mayores de BAP. Los tratamientos que no contenían 2,4 - D ó BAP, ó que tenían 0 mg/L de BAP en combinación con las dosis más bajas de 2,4-D (tratamientos 9,5 y 1) fueron los que presentaron las respuestas significativamente más deficientes en cuanto a formación de callo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de la interacción de cuatro niveles de 2,4-D y BAP, en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tratamiento	2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	FPC ¹	GL	P(F)
6	0.05	0.50	4.000 a		
15	0.20	1.00	3.665 ab		
16	0.20	2.00	3.665 ab		
14	0.20	0.50	3.500 ab		
7	0.05	1.00	3.333 ab		
13	0.20	0.00	3.167 ab		
12	0.10	2.00	3.165 ab	9	0.000
11	0.10	1.00	2.665 abc		
2	0.00	0.50	2.333 abcd		
10	0.10	0.50	2.167 abcd		
3	0.00	1.00	2.166 abcd		
8	0.05	2.00	2.167 abcd		
4	0.00	2.00	2.000 abcd		
9	0.10	0.00	1.335 bcd		
5	0.05	0.00	0.665 cd		
1	0.00	0.00	0.000 d		

a, b y c Letras diferentes indican diferencia significativa a $P < 0.05$, usando prueba Tukey.

¹ Formación promedio de callo.

Se observó que a un nivel medio de 0.05 mg/L de 2,4 -D se obtiene una buena respuesta por parte del explante, y que al aumentar los niveles de esta auxina, la formación de callo no mejora significativamente. Igual tendencia se observó con el

BAP, ya que a una concentración media de 0.5 mg/L se obtuvo una mayor formación de callo y al aumentar esta concentración de citocinina no se estimula significativamente la mayor formación de callo.

Lo anterior demuestra que es necesaria la interacción de auxinas y citocininas en concentraciones medias para estimular la formación y desarrollo de callo en el explante.

Estudios realizados por Geier (1990), explican que en la ausencia de hormonas, muy pocos explantes foliares forman callo. Las auxinas generalmente inducen la división celular (formación de callo), expansión de tejidos y formación de raíces adventicias. La citocinina es también esencial para la formación de callo en explantes de hoja. Pierik (1990), indica que suplementar el medio con auxinas y citocininas induce la formación de callo y crecimiento del cultivo.

Sin embargo los resultados obtenidos demuestran que añadir al medio una dosis alta de 2,4-D sin BAP al medio ó al agregar 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L de BAP sin 2,4-D, se obtienen resultados con promedios significativamente iguales a los mostrados en los tratamientos en que se mezclaron las dos hormonas para la inducción de callo. Lo que indica que cualquiera de las dos puede ser utilizada y añadida al medio individualmente para inducir formación de callo.

4.1.2 Oxidación:

El grado de oxidación encontrado durante el proceso de inducción de organogénesis indirecta se debe al efecto del estado fisiológico del explante y la concentración de BAP (Anexo 10). Factores como el operario que realiza la siembra, la concentración de 2,4-D y la interacción de 2,4-D y BAP, no mostraron tener influencia significativa en la oxidación del explante (Anexo 11).

4.1.2.1 Efecto del estado fisiológico del explante en el control de la oxidación.

La mejor respuesta en el control de la oxidación se obtuvo en los explantes extraídos de hojas viejas ya que estos mostraron significativamente menor oxidación que las los explantes extraídos de hojas jóvenes (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto del estado fisiológico del explante en la oxidación, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Edad	NPEO ¹	GL	P(F)
Hojas Jóvenes	1.35 a	1	0.049
Hojas Maduras	0.66 b		

^a y ^b Medidas con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$, usando prueba Tukey.

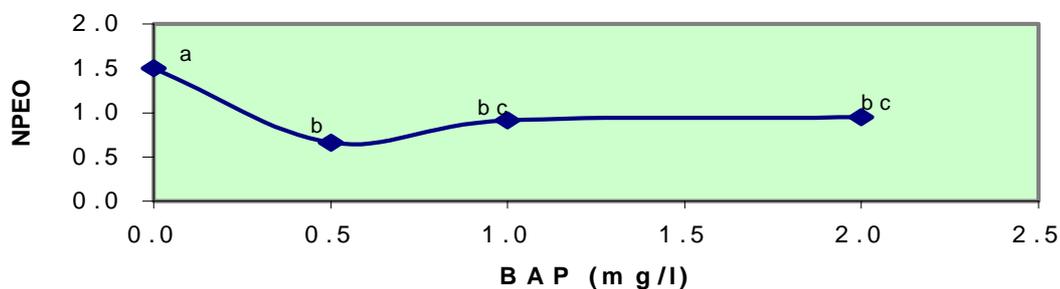
¹ Número promedio de explantes oxidados.

Los estudios realizados no muestran a la oxidación como un factor limitante en el establecimiento *in vitro* de anturio. La oxidación del explante en el medio de cultivo es atribuida a la producción de sustancias fenólicas por parte del explante cuando los

tejidos son lastimados o senescentes (Pérez, 1998). Para el caso de anturio, no se ha encontrado información que indique que este problema sea menor utilizando tejidos de hojas maduras, tal y como se ha observado en esta investigación.

4.1.2.1 Efecto de la concentración de BAP en el control de la oxidación.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la concentración de BAP en el medio de cultivo tuvo influencia en la producción de compuestos fenólicos en la base del explante, obteniéndose un mejor control de la oxidación a una concentración media de BAP de 0.5 mg/L. No se encontró diferencia significativa al aumentar la concentración de BAP en el medio de cultivo, aunque a mayores dosis se obtiene un promedio más alto de oxidación. Los explantes sembrados en medio sin BAP mostraron mayor oxidación promedio (Figura 4), (Anexo 10).



a, b y c Medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$, usando prueba Tukey.
NPEO Número promedio de explantes oxidados.

Figura 4. Efecto de cuatro concentraciones de BAP en la oxidación, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

La oxidación del explante depende de la tasa de crecimiento de los tejidos cultivados y de los niveles de auxinas y citocininas utilizados. Según Paz (2000), altas concentraciones de estas hormonas provocan un aumento en la oxidación de los tejidos cultivados. Esto explica que una concentración media de BAP haya mostrado mayor control de la oxidación.

Para realizar un buen control de la oxidación es necesario suplir el medio con una concentración media de BAP en combinación con una dosis media de la auxina 2,4-D, ya que altas concentraciones de auxinas se asocian con una mayor tasa de oxidación. Las citocininas pueden inhibir, hasta cierto punto, la oxidación de algunos compuestos, incluyendo la oxidación de las auxinas, reduciendo así la cantidad de fenoles producidos (Paz, 2000).

4.1.3 Días a formación de callo

La formación de callo se inició 60 días después de la siembra de los explantes, tanto en explantes de hoja madura como de hoja joven. Geier (1990), indica que la fase de inducción de formación de callo tiene una duración de 2 a 3 meses. En este estudio se

obtuvieron resultados a los dos meses. Los tubos que no mostraron respuesta se dejaron en oscuridad, para permitir al explante el desarrollo de tejido calloso.

4.1.4 Variables no significativas

Los resultados del análisis de varianza indican que las variables necrosis, contaminación por bacterias y contaminación por hongos, no muestran significancia estadística. Por lo que los resultados obtenidos de estas variables no están influenciados por la edad de la hoja, la operario que realizó la siembra, los cuatro niveles de la auxina (2,4-D), los cuatro niveles de la citocinina (BAP), ni por la interacción de estos factores (Anexo 12).

Los porcentajes de contaminación totales son de 18.75% para explantes extraídos de hojas jóvenes, y de 17.45% para hojas adultas, siendo mayor la contaminación causada por hongos, que la contaminación causada por bacteria (Anexos 13 y 14). Por lo que es necesario mejorar el tratamiento fitosanitario que recibe la planta madre, así como las condiciones asépticas en el laboratorio.

Las variables contaminación por hongo y contaminación por bacteria no mostraron ser significativas al operario que realizó la siembra, al realizar el análisis de varianza individualmente, siendo diferente el resultado que se obtuvo al realizar el análisis de varianza de la contaminación total, ya que se observó que el operario si tiene influencia en el total de los tubos contaminados (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto del operario en la contaminación total, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Fuente	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P*
Operario	2	5.77	5.77	2.88	39.57	0.025
Edad	1	0.26	0.26	0.26	3.57	0.19
Error I	2	0.14	0.14	0.07		
BAP	3	3.19	3.19	1.06	1.73	0.16
2,4-D	3	3.36	3.36	1.12	1.82	0.15
2,4-D* BAP	9	6.67	6.67	0.74	1.20	0.30
Error II	75	46.32	46.32	0.61		
Total	95	65.73				

* Con una $P < 0.05$

Pierik (1990), indica que una de las cuatro fuentes de infección importantes en el establecimiento de un cultivo es el operario, si se ha realizado una buena esterilización química del material vegetal y se producen infecciones.

5. CONCLUSIONES

1. El material vegetativo utilizado debe provenir de una plantación madre que ha recibido manejo fitosanitario, nutrición y condiciones físicas adecuadas, ya que esto facilita el establecimiento del cultivo en el laboratorio y se reducen los niveles de contaminación.
2. Para la desinfección superficial de las hojas jóvenes, se debe utilizar una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% de i.a. durante 15 minutos.
3. Para la desinfección superficial de las hojas maduras, se debe utilizar una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 4.5% de i.a. durante 15 minutos.
4. Explantes extraídos de hojas jóvenes presentaron mayor promedio de formación de callo que las hojas maduras, aunque mostraron el nivel más alto de oxidación.
5. El 2,4-D, a razón de 0.2 mg/L, estimuló una mayor formación de callo, independientemente de la dosis utilizada de BAP.
6. El BAP, en concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/L, estimuló formación de callo, independientemente de la dosis utilizada de 2,4-D.
7. La combinación de 2,4-D a 0.05 mg/L y BAP a 0.5 mg/L de 2,4-D, en el medio de cultivo rindió el mejor promedio en cuanto a formación de callo y menor promedio de tubos oxidados.
8. La contaminación total (contaminación por hongo y contaminación por bacteria) varía significativamente dependiendo del operario que realiza la siembra.

6. RECOMENDACIONES

1. Evaluar concentraciones mayores de 0.2 mg/L de la auxina 2,4-D en el medio de cultivo, para determinar a que nivel se obtiene una mejor respuesta de formación de callo y a que nivel empieza a declinar su acción.
2. Añadir al medio de nutritivo sustancias antioxidantes como ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína, polivinipirrolidona (PVP), ó utilizar estas sustancias durante el proceso de preparación del explante.
3. Realizar pruebas de establecimiento con otros tipos de explante como espata, espádice o peciolo, con el fin de definir que tipo de explante presenta mejor respuesta dependiendo del genotipo utilizado.
4. Utilizar otros tipos de auxinas y citocininas para determinar cuales son las más efectivas en la inducción y formación de callo con esta especie, ya que con el sistema actual solo se obtiene un 31.25% de explantes formando callo.
5. Aumentar la cantidad y la calidad de plantas madres en el invernadero, para contar con suficiente material vegetativo en futuros proyectos.

7. BIBLIOGRAFIA

- BLESSINGTON, T.; CLEMENT, D.; REESER, R. 1999. *Anthurium*. <http://www.agnr.umd.edu/users/ipmnet/5-4art5.htm> (22 de mayo de 2000).
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura; Fundamentos y aplicaciones. Ed. Roca, W.N.; Mroginski, L.A.. Cali, Colombia. 379 p.
- GEIER, T. 1986. *Anthurium scherzerianum* und gewebekulture: Genetische, methodische und okonomische aspekte. VERMEHRUNG. (Alemania) 25(43):2030-2033.
- GEIER, T. 1990. *Anthurium*. In Handbook of plant cell culture. McGraw-Hill Publishing Company, New York. p. 228-251.
- GEOMAR (GUATEMALA). 2000. Ficha de producto *Anthurium sp.* Guatemala, Guatemala. s.n.t. 10p.
- INA (COSTA RICA). 1994. Propagación clonal *in vitro* de anturio (*Anthurium andraeanum*) a partir de secciones de hoja. s.n.t. San Jose, Costa Rica. 7p.
- KUNISAKI, J. 1980. *In vitro* propagation of *Anthurium andraeanum* Lind. HortScience. (Hawaii) 15 (4):508-509.
- KYTE, L.; KLEIEN, J. 1996. Plants from test tubes: An introduction to micropropagation. 3 ed. Portland, Oregon, Timber Press, Inc. 174 p.
- LIU, L.J. 1993. Ornamental plants. In Tropical plant cell and tissue culture. Rio Piedras, Puerto Rico. s.n.t. p. 90-92.
- PAZ CASTILLO, M. P. 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. 1976. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. Physiol, Plant. (Netherlands) 37(1):80-82.
- PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. por Luis Ayerbe Mateo- Sagasta. 3 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 326 p.
- PEREZ, J.N. 1998. Propagación y mejora genética de las plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba. GEO. 391 p.

Anexo 8. Efecto de cuatro concentraciones de 2,4-D en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

2,4-D (mg/L)	FPC ¹	GL	P(F)
0	1.68 ^a	3	0.001
0.05	2.54 ^b		
0.1	2.33 ^b		
0.2	3.50 ^c		

¹ Formación promedio de callo.

^a y ^b Medidas con diferente letra difieren estadísticamente.

Anexo 9. Efecto de cuatro concentraciones de BAP en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

BAP (mg/L)	FPC ¹	GL	P(F)
0	1.29 ^a	3	0.000
0.5	3.20 ^b		
1.0	2.95 ^b		
2.0	2.75 ^c		

¹ Formación promedio de callo.

^a, ^b y ^c Medidas con diferente letra difieren estadísticamente.

Anexo 10. Efecto de cuatro concentraciones de BAP sobre la oxidación, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

BAP (mg/L)	NPEO ¹	GL	P(F)
0	1.50 ^a	3	0.000
0.5	0.66 ^b		
1.0	0.91 ^{bc}		
2.0	0.95 ^{bc}		

¹ Número promedio de explantes oxidados.

^a, ^b y ^c Medidas con diferente letra difieren estadísticamente.

Anexo 11. Análisis de varianzas de los factores investigados en la formación de callo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Fuente	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Operario	2	0.438	0.437	0.219	0.17	0.852
Edad	1	66.667	66.667	66.667	52.89	0.018
Error I	2	2.521	2.521	1.260		
BAP	3	47.583	47.583	15.861	11.51	0.000
2, 4-D	3	43.083	43.083	14.361	10.42	0.000
BAP x 2,4-D	9	24.333	24.333	2.704	1.96	0.050
Error II	75	103.375	103.375	1.378		
Total	95	288.000				

Anexo 12. Análisis de varianzas de los factores investigados en la oxidación promedio, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Fuente	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Operario	2	0.1458	0.1458	0.0729	0.12	0.891
Edad	1	11.3437	11.3437	11.3437	19.11	0.049
Error I	2	1.1875	1.1875	0.5938		
BAP	3	8.8646	8.8646	2.9549	7.19	0.000
2, 4-D	3	1.8646	1.8646	0.6215	1.51	0.218
BAP x 2,4-D	9	8.7604	8.7604	0.9734	2.37	0.020
Error II	75	30.8229	30.8229	0.4110		
Total	95	62.9896				

Anexo 13. Porcentaje de las variables evaluadas utilizando hojas jóvenes como material vegetativo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Porcentaje de Variables Evaluadas (%)								
2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	Sin Callo	Sin Callo	Necrosis	Oxidación	Cont.* Hongo	Cont.* Bacteria	Cont.* Total
0.00	0.00	0.00	41.67	8.33	20.83	25.00	4.17	29.16
0.00	0.50	41.67	12.50	16.67	16.67	16.67	0.00	16.67
0.00	1.00	37.50	8.33	8.33	25.00	16.67	4.17	20.83
0.00	2.00	37.50	12.50	20.83	20.83	16.67	0.00	16.67
0.05	0.00	16.67	50.00	12.50	29.17	4.17	8.33	12.50
0.05	0.50	62.50	0.00	12.50	4.17	8.33	4.17	12.50
0.05	1.00	41.67	12.50	8.33	20.82	16.67	8.33	25.00
0.05	2.00	33.33	54.17	8.33	12.50	12.50	4.17	16.67
0.10	0.00	33.33	50.00	8.33	12.50	16.67	0.00	16.67
0.10	0.50	45.83	16.67	4.17	16.67	12.50	8.33	20.83
0.10	1.00	50.00	16.67	16.67	8.33	12.50	0.00	12.50
0.10	2.00	50.00	33.33	12.50	20.83	12.50	4.17	16.67
0.20	0.00	58.83	8.33	8.33	16.67	20.83	8.33	29.17
0.20	0.50	45.83	37.50	12.50	12.50	16.67	4.17	20.83
0.20	1.00	62.50	20.83	16.67	16.67	12.50	4.17	16.67
0.20	2.00	50.00	41.67	20.83	16.67	12.50	4.17	16.67
Promedio		41.67	26.04	12.24	16.93	14.58	4.17	18.75

* Contaminación.

Anexo 14. Porcentaje de las variables evaluadas utilizando hojas maduras como material vegetativo, durante la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Porcentaje de Variables Evaluadas (%)								
2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	Callo	Sin Callo	Necrosis	Oxidación	Cont.* Hongo	Cont.* Bacteria	Cont.* Total
0.00	0.00	0.00	37.50	20.83	16.67	12.50	12.50	25.00
0.00	0.50	16.67	62.50	8.33	8.33	12.50	4.17	16.67
0.00	1.00	16.67	54.17	16.67	4.17	8.33	8.33	8.33
0.00	2.00	12.50	45.83	25.00	4.17	12.50	8.33	20.83
0.05	0.00	0.00	58.33	8.33	29.17	16.67	4.17	20.83
0.05	0.50	37.50	33.33	4.17	4.17	16.67	8.33	25.00
0.05	1.00	41.67	37.50	4.17	8.33	16.67	4.17	20.83
0.05	2.00	20.83	37.50	16.67	4.17	12.50	12.50	25.00
0.10	0.00	0.00	50.00	20.83	16.67	8.33	4.17	12.50
0.10	0.50	8.33	70.83	8.33	4.17	4.17	4.17	8.33
0.10	1.00	16.67	62.50	16.67	4.17	4.17	0.00	4.17
0.10	2.00	29.17	50.00	0.00	8.33	16.67	4.17	20.83
0.20	0.00	20.83	37.50	20.83	8.33	20.83	4.17	25.00
0.20	0.50	41.67	50.00	0.00	0.00	16.67	0.00	16.67
0.20	1.00	29.17	58.33	4.17	4.17	8.33	4.17	12.50
0.20	2.00	41.67	33.33	8.33	8.33	8.33	8.33	16.67
Promedio		20.83	48.70	11.46	8.33	12.24	5.73	17.45

* Contaminación.