

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISION DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

CULTIVO IN VITRO DE Anthurium andreaum

MONOGRAFIA
POR

ANA LUISA CABRERA CRUZ

Que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

INGENIERO AGRONOMO EN HORTICULTURA

APROBADA

Presidente del Jurado

ING. José Angel de la Cruz Bretón

Sinodal

Sinodal

ING. Rene A. De la Cruz R.
Flores

M.C. Carlos Suarez

Coordinador de la División de Agronomía

M.C Mariano Flores Dávila.

BUENAVISTA, SALTILLO; COAHUILA. DICIEMBRE DE 1998.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme la oportunidad de vivir, la capacidad para poder seguir adelante y alcanzar una de mis metas.

A mi ALMA TERRA MATER por haberme dado las facilidades y conocimientos para formarme como profesionista.

Al Ing. José A. De la Cruz Bretón por su amistad y apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

Al Ing. Rene A. de la Cruz R. por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al M.C Carlos Suarez F. por su apoyo brindado en el presente trabajo.

Al Ing. Mayela D. Vega Carrales por su linda amistad durante mi estancia en este lugar.

A la Familia Cabello Villarreal por su gran amistad y apoyo brindado durante mi estancia en esta Universidad.

DEDICATORIA

A mis padres.

Tomás Cabrera Pérez (+)
Aurora Cruz Hernández

Por su apoyo incondicional, su gran amor y cariño a lo largo de mi vida, en especial a mi madre por no haber desfallecido ante la adversidad y seguir adelante para que yo pudiera culminar esta meta, por todo esto recibe este humilde trabajo con mucho amor.

A mis hermanos.

César
Rafael
Amparo
Irineo
Leticia
María del Rosario

Por ser los mejores hermanos, por apoyarme para que culminara mi formación profesional, les agradezco infinitamente.

A Adrián.

Por su amor, cariño y confianza que me ha brindado siempre, mil gracias.

A mis sobrinas.

Ceci y Ana

Por la alegría que brindan y porque son la esperanza en el hogar.

A mis compañeros de la Generación LXXXVI de la especialidad de Horticultura segunda sección, por su amistad durante la carrera.

INDICE

4.1.1	OBJETO				PERSEGUIDO
	19				
4.1.2	LA ESPECIE	VEGETAL	QUE	SE	TRABAJA
	20				
4.2	DESINFECCION		DEL		EXPLANTE
	21				
4.3	FASES	DEL	CULTIVO	IN	VITRO
	22				
4.3.1	ESTABLECIMIENTO	DEL	CULTIVO		ASEPTICO
	23				
4.3.2	MULTIPLICACION	Y	CRECIMIENTO	DEL	INOCULO
	24				
4.3.3	ENRAIZAMIENTO		IN		VITRO
	24				
4.4	CUIDADO	DEL	MATERIAL		VEGETAL
	25				
4.5	ESTERILIZACION		DEL MATERIAL		VEGETAL
	26				
4.6	FASES	DEL	INOCULO	IN	VITRO
	28				
4.6.1	AISLAMIENTO				
	29				
4.6.2	INOCULACION				
	29				
4.6.3	REPICADO				
	30				
5.	ESTABLECIMIENTO	DEL	LABORATORIO	DE	CULTIVO
	31				
5.1	SALA		DE		LAVADO
	33				

5.2 SALA DE PREPARACIÓN DEL MEDIO Y MATERIAL VEGETATIVO	34
5.3 SALA DE SIEMBRA Y DISECCION	35
5.4 SALA DE INOCULACION	35
5.5 SALA DE DESARROLLO	37
5.6 INVERNADEROS	38
6. TECNICAS DE ESTERILIZACIÓN Y MANIPULACION ASEPTICA DEL MATERIAL DEL LABORATORIO	40
6.1 TECNICAS DE ASEPCIA	43
6.2 ESTERILIZACIÓN POR IRRADIACION	45
6.3 ESTERILIZACION POR FILTRACION	45
7. PRODUCCION DE PLANTAS LIBRES DE PATOGENOS	46
7.1 PLAGAS Y ENFERMEDADES MÁS COMUNES QUE ATACAN AL CULTIVO DE ANTHURIO	47
8. REGULADORES DE CRECIMIENTO	50
8.1 AUXINAS	51
8.2 CITOCININAS	51
8.3 GIBERELINAS	52

8.4 INHIBIDORES

52

9. PREPARACION Y COMPOSICION DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS

55

9.1 EQUIPO E INSTRUMENTAL REQUERIDO PARA LA

PREPARACION DEL MEDIO

56

9.2 REACTIVOS Y FORMULA QUE SE UTILIZAN PARA EL MEDIO

MS

58

9.2.1 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

59

10. TECNICAS DE PROPAGACION DEL Anthurium andreaum.

61

10.1 CULTIVO DE BROTES

62

10.2 CULTIVO DE CALLOS

63

11. ADAPTACION DE PLANTAS OBTENIDAS IN VITRO

66

11.1 FASE DE ACLIMATACION

66

11.2 FASE DE INVERNADERO

67

11.3 NECESIDADES NUTRITIVAS

68

11.4 FASE DE CAMPO

69

12. COSTO DE LA MICROPROPAGACION IN VITRO.

70

CONCLUSIONES

78

BIBLIOGRAFÍA

79

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

PAG.

TABLA 1. Historial de descubrimiento en las diferentes
8
técnicas de propagación.

TABLA 2. Reactivos para la preparación del MS
58

TABLA 3. Análisis hipotético del costo de un laboratorio de

micropropagación.

72

FIGURA 1. Diferentes tipos de invernaderos
39

FIGURA 2. Los principales métodos de micropropagación
61

FIGURA 3. Método más usado para la micropropagación de
Anthurium *andreaum*
62

INTRODUCCION.

Los métodos de propagación por forma asexual o propagación vegetativa, en el cultivo de *Anthurium* y algunas otras especies, son técnicas que a través de la historia nos marcan que desde aproximadamente 120 años se practican en la investigación.

En la actualidad con el gran avance de la Biotecnología vegetal y su optimismo por contribuir con cultivares nuevos e incluso de prescindir de la planta en su conjunto, es consecuencia del avance de las técnicas de cultivo de tejidos. Su expansión es el producto de varias disciplinas, antes consideradas independientes como: la biología molecular, el cultivo de tejidos, la ingeniería química, la patología vegetal y, cada vez más, la economía. En los últimos años sus avances significativos han trazado estrategias básicas para manipular genéticamente una planta. Se han obtenido diferentes técnicas para la micropropagación de diferentes especies, que muchas de las veces no pueden ser reproducidas sexualmente o que tiene que pasar un periodo de tiempo largo para obtener plantas a partir de ellas; a través de la micropropagación se obtienen muchas plantas en un corto periodo de tiempo.

Anthurium andreanum L a través del cultivo de tejidos in vitro se ha podido propagar con grandes éxitos, logrando con ello que sea más extensamente cultivada en nuestro país.

Por lo que el objetivo del presente trabajo es la obtención de bibliografía actualizada en la propagación del *Anthurio* bajo diferentes técnicas de micropropagación.

Así como que este documento sirva para estudiantes, profesionistas y/o personas interesadas en este tema.

1. REVISIÓN DE LITERATURA.

Haberlang en 1902 citado por Hurtado y Merino (1987) introducen el concepto de totipotencia celular, que se entiende como la capacidad que tiene toda célula vegetativa de regenerar un individuo completamente idéntico del que proviene.

Kotte y Robins (1922) observaron independientemente el crecimiento de puntas de raíces en soluciones minerales suplementados con azúcares.

Waldlaw (1965) La organización más actualizada y aceptada de ápices meristemáticos de acuerdo con la filotaxia, la simetría bilateral, la determinación de modelos vasculares en raíces y brotes, la dominancia y autodeterminación del meristemo en cuanto a control del desarrollo y la sugiere en 5 regiones que pueden ser comunes para ápices de todos los grupos:

- a) Región distal (meristemática)
- b) Región subsidial (primordios de hojas)
- c) Región inorgánica (tejido interno)
- d) Subapical (elongación de axis, diferenciación de tejido vascular, elongación de los entrenudos)
- e) Región de maduración (estabilización morfogenética)

Aunque en teoría se dice que es posible practicar el cultivo in-vitro de cualquier vegetal, en la práctica es diferente, pues cada especie tiene requerimientos muy específicos y antes es necesario hacer muchos estudios.

Roberto y Loyola (1985) mencionan el potencial del cultivo in-vitro de células, tejidos y órganos de plantas, siendo una rama de la Biotecnología de la que México puede obtener beneficios a corto y largo plazo, destacan que la

micropropagación es el área donde pueden obtenerse propagaciones a más corto plazo, pues su empleo es la multiplicación vegetativa y en la producción de cultivares económicamente importantes libres de patógenos, como son las plantas ornamentales, pueden tener repercusiones económicas muy importantes.

Quinteros (1985) dice que cualquier parte de una planta (hoja, tallo, meristemo, embrión, etc.) separado de ésta y desinfectada mediante un tratamiento leve para eliminar a los microorganismos que se encuentran en su superficie, es un explante del que se puede iniciar un cultivo dependiendo de las condiciones físicas (luz, temperatura, cultivo líquido o semisólido) y químicas (sales minerales, vitaminas, hormonas) el explante puede dar lugar a otro tipo de cultivo.

Puede desdiferenciarse en una masa amorfa de células denominada callo la cual, dependiendo siempre de las condiciones, puede continuar proliferando como callo o disgregarse en células aisladas o dividirse organizadamente para dar lugar a tallos y raíces (organogénesis) o a embriones (embriogénesis).

Quinteros (1985) menciona que la micropropagación es la multiplicación asexual in-vitro a partir de un explante, y es la metodología fundamental del cultivo de tejidos vegetales. La eficiencia de la micropropagación varía entre especies, desde unos cuantos brotes por explante hasta cientos (el cultivo de un segmento de la base de la hoja del narciso puede producir miles de bulbos en solo unos meses), pero las condiciones óptimas de nutrientes, reguladores, etc., deben de ser determinadas en cada caso.

Al cultivar in-vitro células vegetales es posible someterlas a condiciones controladas de estrés, inhibidores, toxinas, etc., poniendo de manifiesto características de adaptación.

Hurtado y Merino (1987) señalan que desde hace aproximadamente 120 años en la investigación de fisiología vegetal, se hicieron los primeros intentos en cultivo de tejidos, órganos y células cultivando en medios nutritivos artificiales adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios, embriones, segmentos de tallos y hoja, ovarios, anteras, meristemos y polen.

Jaramillo (1993) la propagación vegetativa o método de propagación asexual, asegura que la descendencia será idéntica al progenitor. La mayoría de los híbridos producidos in-vitro, variedades mejoradas y resistentes a través de métodos de ingeniería genética, cuyas características pueden fijarse en la descendencia con un mínimo de variación de tecnologías de propagación in-vitro a través de cultivo de tejidos.

Roberto y Loyola (1985) durante los últimos 15 años las técnicas para cultivar in vitro células, tejidos y órganos de plantas han tenido un enorme desarrollo que permite en la actualidad aplicarlas a prácticamente todas las especies vegetales, estas técnicas han producido un gran avance en el conocimiento básico de la biología de las plantas y han abierto también muchas nuevas posibilidades para la solución de problemas agrícolas y hortícolas así como para su explotación comercial esta metodología se ha convertido ya en una tecnología biológica de gran potencial económico con un auge enorme en todo el mundo. Estamos convencidos de que con una evolución y una planeación adecuada, México podría obtener grandes beneficios de esta tecnología debido a que posee una base de recursos humanos calificados y la infraestructura para iniciar su explotación.

La micropropagación, propagación por cultivos de tejidos y propagación in-vitro son sinónimos de un procedimiento para incrementar el número de individuos en condiciones artificiales y asépticas, con nutrición, luminosidad y temperaturas controladas. Generalmente en la multiplicación asexual de propagulos pequeños (desde micros hasta unos cuantos cm de longitud) aunque en algunos casos como orquídeas y helechos se realiza como materia de siembra esporas y semilla sexual o botánica.

En ningún otro renglón de la explotación de plantas se ha utilizado tan eficientemente la micropropagación como en los cultivos de flores y plantas ornamentales.

Pierik (1987) para evitar confusiones define el cultivo in-vitro, como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles de plantas, semillas,

embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores y las técnicas se caracterizan porque:

1. Ocurren a microescala, sobre una superficie relativamente pequeña.
2. Se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y hormonales.
3. Se excluyen todos los microorganismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nematodos).
4. Generalmente no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, resultando que un tejido aislado puede dar origen a un callo o puede desarrollarse de otras formas poco usuales (formación de órganos, embriogenesis somática).
5. La capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permiten manipulaciones que antes eran imposibles.
6. El nombre del cultivo in-vitro (que literalmente quiere decir en vidrio) se utilizó porque al menos inicialmente se usaron recipientes de vidrio para el cultivo.

2. LA HISTORIA Y LOS FUNDAMENTOS DEL CULTIVO IN VITRO.

Los primeros tentativos por mantener en vida los órganos vivientes aislados datan de más de 130 años, los primeros datos de cultivo in vitro, propiamente dicho y estudiado, fueron hechos por el alemán G Haberlandt en 1902, no obstante tardo

casi una década para conocer esta teoría. Futuros cultivos de planta ornamentales se estudiaron en relación a 1912 por Alexis Carrel resultando un cultivo indefinido debido a la estructura celular embrionaria, y en 1922 por nuevos experimentos aparentemente para la cultura de tejidos vegetales.

J P White en 1932 obtuvo la primera formula del cultivo indefinido de raíces, en prelavado de las raíces de tomate en un medio liquido (conteniendo seis minerales, extracto de levaduras y azúcar) (Bidwell 1979).

Los sucesos futuros sobre datos originales de reglas diferentes que se aportaron sobre el cultivo de tejidos vegetales. Desde 1934 R.J Cautheret obtuvo a partir de prelavado de tejido del cambium (tejidos meristemáticos) dos proliferaciones de tejidos mostraron un desarrollo acelerado de células.

Posteriormente esto en 1939 fue publicado como primeros resultados sobre el cultivo indefinido de tejidos de caroteno. Nobecourt sobre el mismo material y White en E.U sobre los tejidos de tabaco tumoral publicaron la misma nota de resultados análogos; el cultivo in vitro de tejidos vegetales ha variado mucho con el diario manejo y descubrimientos de nuevas técnicas como la hidroponía (no igualables pero semejantes en costos y reducción de gastos), una posterior etapa histórica es la obtención de plantas infectadas de millones de virus aparentes en el cultivo in vitro de meristemas.

En 1949 Limasset y Cornuet publicaron las observaciones sobre la formación de virus dentro de meristemas del tabaco G. Mores y C. Martín reflejaron la proliferación en observaciones del sistema del cultivo in vitro de meristemas de dalias y de plantas terrestres como las *pomaceas* bajo viveros infestados de millones de virus, a partir de células meristemáticas aisladas, in vitro en plantas de interiores que fueron realmente cultivadas normalmente y se obtuvieron magníficos resultados bajo un sumo control.

Hurtado (1988) cita a Skoog (1955) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco, en la actualidad, las sales

inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies.

Hurtado (1988) hace referencia de Melchers y David (1973) aprovechando los mutantes con efecto en el color de las hojas, los cuales pueden reconocerse rápidamente en cultivo de tejidos de callos pues bajo condiciones apropiadas de luz, sales minerales y reguladores de crecimiento pueden volverse verdes y con ello se pueden identificar los mutantes clorofilodeficientes.

Kocuss y Knouss (1979) sugirieron que uno de los problemas de mayores consecuencias en el cultivo de tejidos vegetales es la contaminación bacteriana que se presenta en las etapas de multiplicación y/o enraizamiento.

Hurtado (1988) en el periodo comprendido entre los años 1979 y 1983 la mayoría de los trabajos se enfocaron hacia estudios de mutagenesis, morfogénesis, citogenesis e histogenesis, además de ha dado una particular importancia a la detección, identificación, síntesis y producción de metabolitos secundarios, así como el uso de la técnica para la selección y mejoramiento de las plantas. Encontrando también trabajos de propagación, aunque en menor numero que en los años anteriores.

En esta breve reseña histórica acerca de la aplicación de la técnica de cultivo de tejidos vegetales en diferentes áreas de la investigación, podemos observar desde los primeros ensayos tentativos, avances y logros en la obtención de los componentes más adecuados del medio de cultivo, condiciones ambientales y respuesta de los tejidos inoculados para la propagación de una determinada especie, lo cual, se enfoca especialmente a la obtención de plantas libres de patógenos y enfermedades, propagaciones masivas de algunas especies de interés económico y biológico, cultivo de diversos órganos y tejidos como meristemas, callo, óvulos, ovarios, anteras y protoplastos, así como la fusión de los últimos y la regeneración de plantas a partir de estos, lo cual nos permite realizar estudios de diferentes fenómenos morfogénicos, que por otros medios serian imposibles de realizar.

TABLA 1. Historial de descubrimiento en las diferentes tecnicas de propagación.

Pierik 1967	Inducción de la floración en <i>lunaria annua</i> por vernalización in vitro.
Bourgin y Nitsch 1967	Obtención de plantas haploides a partir de granos de polen de tabaco.
Sacriston y Melchers 1969	Análisis citológico de plantas regeneradas a partir de cultivo de callos de tabaco.
Eriksson y Jonassen 1969	Primer aislamiento de cloroplastos con éxito, a partir de un cultivo en suspensión de <i>haplopappus gracillis</i> .
Carlson 1970	Selección de mutaciones bioquímicas in vitro.
Kasha y Kao 1970	Se utilizó el cultivo de embriones en la producción de monoploides en cebada.
Power 1970	Consiguió la primera fusión de protoplastos.
Takebe 1971	Primeras plantas regeneradas a partir de protoplastos.
Carlson 1972	Hibridación interespecífica, por fusión de protoplastos en dos especies de <i>nicotina</i> .
Pierik 1973	Demostró la capacidad de la citoquinina para romper la dormancia de explantes de capitulo de gerbera.
Binding 1974	Regeneración de plantas haploides de petunia híbrida a partir de protoplastos.
Melchers y Labilo 1974	Obtuvieron híbridos por fusión de protoplastos haploides.
Reinhard 1974	Biotransformación en cultivo de tejidos vegetales.
Zaenen, Larebeke 1974	Descubrió que el plasmidio <i>ti</i> es el principio y ducto de tumores de agrobacterium.
Seibert 1976	Iniciación del vástago a partir de ápices crioconservadores de clavel.
Chilton 1977	Integración con éxito del DNA del plasmidio <i>ti</i> de <i>agrobacterium tumefaciens</i> en plantas.
Marton 1979	Se desarrollo un procedimiento de co-cultivo para transformación de protoplastos de plantas con agrobacterium.
Alfermenn 1980	Utilización de células completas inmovilizadas para la

		biotransformación de la digitoxina en digoxina.
Larkin Scowcroft 1981	y	Introducción del termino variación somaclonal.
Krens 1982		Se consigue la incorporación de DNA desnudo por los protoplastos: en consecuencia se hace posible la transformación con DNA aislado.
Zimmermann 1982		Fusión de protoplastos por estimulo eléctrico.
Paszkowsky 1984		Transformación de células vegetales con DNA plasmódico.

3. *Anthurium andreanum L.*

3.1 DESCRIPCION BOTANICA.

Higaki T. Et-al (1984) describieron a la planta de Anturio como perenne con una vida productiva de varios años, es herbácea, epífita y monocotiledónea.

Raíz. La raíz es fibrosa, cilíndrica de consistencia carnosa, que no llega a profundizar mucho, blanca y con producción de raíces adventicias en todas las especies, formando la mayoría de las trepadoras y epífitas dos tipos de raíces: unas absorbentes que crecen abajo en dirección al suelo y otras no influidas por la gravedad, que crecen en dirección a la luz, agarrándose firmemente a la corteza de los árboles soportantes. En algunas especies (philodendron) las semillas pueden ser secretadas por los pájaros en las ramas superiores del árbol donde pueden germinar produciendo primero raíces sustentadoras y más tarde raíces aéreas no ramificadas, que cuelgan en el aire mientras crecen hasta tocar el suelo; muchas raíces áreas desarrollan un tejido externo absorbente de agua semejante al volumen de las orquídeas. Algunas especies de Anthurium (agracile) aunque producen ambos tipos de raíces, no llegan a establecer conexión con el suelo, obteniendo el agua y las sales minerales a partir del humus que se deposita en el tronco del árbol sobre el cual crecen.

Tallo. Es caulinar, monopódico, simple, herbáceo cuando es joven y semileñoso cuando adulto, llegando a crecer hasta 1.5 m.

Hojas. Son grandes anuales de 30 cm de longitud por 20 cm de ancho de peciolo largo cuya base es una vaina membranosa y color verde brillante el cual está inserto en el tallo , las hojas son simples o compuestas, básales o nacidas en los tallos aéreos, limbo expandido, nervios paralelos, pinados o palmeados.

Inflorescencia. Consiste en una gran espata (bractea), a menudo conspicua y petalordea sosteniendo y a veces envolviendo un espádice .

Flores. Están agrupadas en una inflorescencia en forma de espádice, éste es de unos 9.5 cm de longitud aproximadamente, grueso de colores amarillo, blanco, verde, rojizo, con aproximadamente 300 florecillas diminutas, las cuales son blancas, hermafroditas, con un ovario, dos carpelos y cuatro anteras. El perianto consiste de cuatro pétalos carnosos; cuando la flor madura el estigma aparece con una protuberancia redonda en el espádice cuando están listos para ser polinizados aparecen húmedos y brillantes.

Iwata R.Y., Tang y Kamemoto H. (1985) determinaron que el color de la espata en gran parte esta influenciada por una relativa concentración de antocianinas.

Higaki T. Y Watson D.P (1972), la planta produce flores todo el año, la secuencia de hoja, flor y nueva hoja se mantiene a través de toda la vida de la planta y los intervalos entre cada nacimiento de una nueva hoja se acorta o alarga con los cambios en las condiciones ambientales. Durante la primavera y el verano cuando las condiciones son favorables para el crecimiento, se esperan mas flores por planta que durante los meses cuando las temperaturas son mas bajas y hay mas luz. La espata y el espádice se encuentran en el extremo superior de un largo pedúnculo que comienza en la axila de la hoja.

3.2 CLASIFICACION TAXONOMICA.

Croat T.B. (1983) clasificó a los anturios de la siguiente, manera:

División..... Magnoliophyta

Clase Liliopsida (monocotiledonea)

Subclase Arecidae
Orden Arales
Familia Araceas
Genero Anthurium

Este género cuenta con más de 700 especies distribuidas desde el Norte de México y las Grandes Antillas, hasta el Sur de Brasil, Norte de Argentina y Paraguay; tan solo en México y Centro de América en forma silvestre hay aproximadamente 219 especies del genero anthurium.

Dentro del género Anthurium se encuentran entre otras las especies más importantes:

andreaeanum: Es la especie más importante desde el punto de vista económico y es donde están la mayoría de las variedades comerciales; tienen espatas o bracteas grandes.

sherzerianum: Segunda especie más importante económicamente, se caracteriza por tener hojas más pequeñas, no son acorazonadas, tienen rojo-naranja o blancas con manchas rojo-naranja y espádice largo y helicoidal.

Crystallium: De hojas grandes, acorazonadas y rayado blanco, son plantas bellas por su follaje.

Clarinervium: Similar al anterior.

Magnificum: Similar a las dos anteriores.

Forgetti: Similar a las tres anteriores.

Warocqueanum: Hojas grandes, alargadas y rayado blanco.

3.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA.

Gallaga (1995) Las aráceas es una gran familia de plantas monocotiledóneas principalmente herbáceas, con gran variedad en su parte vegetativa, esencialmente, se trata de plantas herbáceas con tallos aéreos y tubérculos subterráneos o rizomas; algunos miembros son leñosos, la familia incluye unas cuantas trepadoras y epífitas, así como acuáticas flotantes (pistia).

Gallaga (1995) menciona que su distribución es pentropical con unas cuantas especies templadas; algunas viven en lugares encharcados; se reconocen como centros de diversidad y distribución en Asia y América, siendo un centro importante de diversidad las zonas subtropicales y calientes de Sudamérica, se reconocen 2500 especies aproximadamente para la familia y de estas unas 1350, aproximadamente la mitad de ellas son del género *Anthurium*.

Este mismo autor también menciona que desde México NE de Argentina y Paraguay la gran diversidad de especies se encuentra a elevaciones medias y bajas del NE de Sudamérica, Panamá y Costa Rica con centros menos importantes en las montañas del Se de México, mientras que en los bosques del alto del Amazonas de Bolivia y especialmente Perú, Ecuador y Colombia son ricos en especies. El bajo Amazonas es realmente pobre en especies, pero México, América Central y Costa Rica se reconocen 65 especies, sólo para México se reconocen 41 con 26 de ellas endémicas, siendo un género neotropical, con algo más de 700 especies y pertenecientes a la subfamilia potrhoideae que contiene 10 géneros, pero sólo *Anthurium* y *Heteropsis* se encuentran en los trópicos americanos.

El Anturio es nativo de Colombia, introducido a Hawaii procedente de Londres en 1889, cumpliendo 100 años de cultivo e hibridación en Hawaii, al principio su propagación fue por semilla y diseminación lenta en su cultivo, a principio se obtuvieron bajo naranjos y helechos arborescentes y en suelos orgánicos.

Se cree que fueron introducidos a México posiblemente entre 1900 y 1940, cultivándose a nivel de traspatio en Fortín Veracruz; actualmente se produce bajo sistemas de propagación in vitro, cultivado bajo malla sombra y en sustrato inerte por sistema hidropónico y fertirrigación.

3.4 FISILOGIA DEL ANTURIO.

Gallaga (1995). Dice, que el tallo principal del Anturio produce de 3 a 8 hojas por año dependiendo de su nutrición; las yemas laterales de la base de la planta se desarrollan en brotes, incrementando la productividad de la planta y proporcionando propágulos o hijuelos. Los Anturios propagados por semilla, aparentemente producen solo yemas vegetativas en la axila de la hoja hasta rebasar la fase juvenil, después la yema lateral que desarrolla es vegetativa y un meristemo lateral vegetativo se desarrolla sólo después de que ha ocurrido la floración.

La época de diferenciación floral no se ha determinado, pero el alargamiento del tallo floral comienza alrededor de un mes después de la expansión de la hoja contenida en la axila. El ciclo de emergencia de hoja y flor varía con las estaciones siendo mejores durante los períodos primavera-verano. Una yema floral de 5 mm se encuentra en las axilas de las hojas y aún después de que ocurra la elongación significativa de esto se reporta un período de latencia por la yema floral después de que pasa por el período juvenil en que no hay floración la planta comienza a florecer por cada hoja con un potencial de 3 a 8 flores por tallo por año.

Jaramillo (1993). La iniciación floral y el desarrollo comienzan a temperaturas de 18 °C y por arriba de éstas con una óptima reportada de 20 °C y aún más alto. La temperatura puede influenciar el período de latencia del desarrollo floral y seguramente afecta la alargación del eje del pedúnculo, pero este factor no ha sido estudiado; el enfriamiento de la hoja se ha reportado como acelerador de la producción floral del Anturio de las condiciones de alta intensidad lumínica. Los pecíolos largos y las espatas anchas, representan la más alta calidad, en un experimento se obtuvieron con temperaturas del aire.

3.5 REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS.

Según Criley R.A. (1985), la iniciación floral y el desarrollo empiezan a temperaturas de 18 °C, siendo la óptima de 20 °C y una máxima de 30 °C. La temperatura puede influir en el período de latencia del desarrollo floral y afecta la elongación del eje del pedúnculo floral. Los pedúnculos largos y la espatas anchas representativas de la más alta calidad se han obtenido a temperaturas de 19-22 °C en el aire, esto puede ser variable con el cultivar.

Los anturios se consideran plantas de sombra; las intensidades de luz varían en las diferentes áreas donde puedan cultivarse. El rango usado actualmente varía de 50 a 90 % de luz del sol, según la variedad.

3.6 PROPAGACIÓN.

Esta puede ser sexual o vegetativa:

- ❖ Sexual: por semilla.
- ❖ Vegetativa: por hijuelos, división del tallo, cultivo de tejidos.

Propagación por semilla.

La propagación por semilla es un proceso lento, ya que, desde que aparece la floración pasan de 6 a 7 meses para que formen los frutos maduros y se les obtenga la semilla. El tiempo de 2 a 3 años para que den su primera flor.

☑ Propagación por hijuelos.

Es más rápida y práctica, los hijuelos brotan del tallo de 1 a 8 por año dependiendo de la variedad y el manejo que se le de a la planta, se esperan que den su primera flor en 8 a 10 meses y en ese momento se separan de la planta con mucho cuidado; éste método es el más utilizado por los productores de México.

☑ Propagación por tallo.

La propagación por división del tallo es simplemente seccionando las plantas adultas cuyo tallo es de más de 40 cm de altura, es importante que éstas queden por lo menos con 5 nudos; posteriormente se siembran en un sustrato poroso esterilizado; en un corto tiempo emergerán las raíces de las estacas, cuando las primeras hojas broten, se transplantarán al lugar definitivo.

☑ Propagación por cultivo de tejidos.

Por medio de esta técnica se aumentan el número de plantas propagadas, para tal efecto se pueden utilizar fragmentos de la inflorescencia en espádice, secciones de hoja o ápices. (Geir T.B. 1982)

4. PROPAGACION IN VITRO DE ANTHURIO.

La propagación vegetativa, o método de propagación asexual, asegura que la descendencia es idéntica al progenitor, (Gallaga 1995).

Un método común de incrementar un cultivo particular es crecer la planta hasta que se desarrollen algunas raíces en la parte alta del tallo cerca de la punta. La punta con raíces se corta para producir una nueva planta, el resto de la planta con

raíces desarrollara entonces dos o más brotes laterales (chupones, repitiendo este procedimiento se puede propagar plantas por año, de una planta original.

Gallaga (1995). La tendencia de una planta a producir “chupones” no solo es inherente al cultivar, sino, también a las condiciones de desarrollo. Los tallos deben colocarse a un lado, en un lugar húmedo con un buen sustrato que retenga igualmente suficiente humedad, como medio de propagación para estimular la producción de nuevos brotes laterales. La propagación clonal a través de cultivo in vitro de tejidos, es un proceso alternativo para la propagación clonal y rápida de Anthurios e involucran técnicas que han sido desarrolladas especialmente para este fin.

A través de esta moderna técnica, resulta posible propagar estas bellísimas plantas, sobre todo de manera clonal, es decir, con la obtención de cultivos idénticos de planta original, además de que a través de esta tecnología se puede “sanear” el material vegetal, y confiere ventajosa ayuda en el mejoramiento genético la obtención de variedades nuevas y resistentes a través de técnicas elaboradas de ingeniería genética.(Jaramillo 1993).

La mayoría de ellos son híbridos producidos por cultivo in vitro, variedades mejoradas y resistentes a través de ingeniería genética, cuyas características pueden fijarse en la descendencia con un mínimo de variación solamente mediante la aplicación de tecnologías de propagación in vitro a través de cultivo de tejidos.

4.1 OBTENCIÓN DEL EXPLANTE.

Gallaga 1995 y Jaramillo 1993, hacen mención que el primer paso para la obtención de un cultivo es la elección de un explante apropiado, lo cual esta determinado por dos circunstancias:

- * El objeto perseguido y

- * La especie vegetal que se trabaja.

4.1.1 EL OBJETO PERSEGUIDO:

Si el objetivo es la obtención de callo, se pueden utilizar una amplia gama de explantes “cualquier explante que contenga células nucleadas vivas” tales como:

- * Apices o meristemos caulinares,
- * Hojas,
- * Entrenudos
- * Cotiledones
- * Raíces
- * Anteras
- * Frutos
- * Células y protoplastos (técnicas que implican la utilización de medios de cultivo más elaborados)

En el caso de requerirse homogeneidad en los explantes, se opta por explantes provenientes de plantas crecidas en invernadero o de plantas provenientes de la germinación in vitro de semillas.

Sin embargo hay plantas más resistentes para la obtención de callos por lo tanto se deben utilizar solo determinado tipo de plantas (leñosas y gramíneas).

Cuando el objetivo perseguido es la obtención de plantas a partir de callos es más difícil la elección de plantas apropiadas. Pocas especies vegetales permiten el uso de gran variedad de explantes para producir un callo capaz de regenerar plantas.

Por otro lado determinados objetivos limitan aun más a tipos de explantes por ejemplo: la obtención de haploides, donde es indispensable

partir del cultivo de anteras inflorescentes, microesporas y ovarios. Si se desean obtener plantas libres de patógenos, siempre se deben de utilizar ápices y meristemas (en algunas ocasiones es recomendable la utilización de yemas axilares que reúnan ciertas condiciones). Es recomendable partir de explantes como ápices y meristemas cuando el objetivo es la conversión de germoplasma in vitro.

4.1.2 LA ESPECIE VEGETAL QUE SE TRABAJA.

En cuanto a la elección de la planta determinada para la elección de la especie vegetal, es recomendable atender a las siguientes situaciones de las que depende el uso de uno u otro tipo de explante cuya influencia de la respuesta in vitro es de gran trascendencia.

PRIMERO. La variabilidad asociada al genotipo. En idénticas condiciones de desarrollo y medio de cultivo, se puede apreciar una respuesta diferente dentro de individuos de la misma especie usando diferentes cultivares, evitándose o minimizándose, manejando cambios a nivel de medio de cultivo.

SEGUNDO. La variabilidad con el estado de desarrollo y edad ontogénica, esto requiere importancia cuando se cultivan in vitro, pues la obtención del haploide depende en 90 % de su estado de desarrollo. Otra consideración importante es que los ápices jóvenes permanecen adultos solo a través de repetidos subcultivos, un meristemo adulto gradualmente toma características juveniles.

TERCERO. Tomado del explante. A mayor tamaño mayor probabilidad de obtención de callo, pero mayor probabilidad de heterogeneidad de y/o contaminación. El tamaño del explante es muy importante preferentemente cuando se efectúan cultivos de meristemas, anteras y suspensiones

celulares, embriones y protoplastos. Los explantes más pequeños requieren medios de cultivos más complejos o acondicionados, considerando el número de explantes, volumen de material, cantidad de reserva en alimentos, área de superficie cortada (producción de etileno), época del año, tratamientos, condiciones de crecimiento de la planta donante.

4.2 DESINFECCION DEL EXPLANTE.

Gallaga (1995), menciona que el explante o semilla deberá pasar por una pre-desinfección, para remover el mucílago y la cubierta, realizándola con agua caliente y detergente líquido, y posteriormente enjuagando con agua destilada, también pasará por la desinfección con cloro (NaClO) al 15 % por 15 minutos, enjuagando con agua destilada y esterilizada tres veces.

Las yemas axilares en el caso de Anthurium un nudo da lugar a una yema lateral vegetativa, mientras que el otro produce la hija. Morfológicamente entre la mayoría de las plantas, la existencia de yemas sin hoja es muy rara. Es muy probable, que un primordio de la hoja se inicie con o antes de la yema, pero nunca se desarrolla completamente, sin embargo la respuesta del cultivo in vitro a las yemas axilares no ha sido exitosa cuando se parte de la planta original en invernadero, por lo que se recomienda y de hecho esto es lo que en la práctica se lleva a cabo, utilizar yemas axilares de plantas desarrolladas in vitro.

Cuando son espadices:

Se elige la inflorescencia con la espata aun abierta y se efectúa un lavado con agua corriente y detergente:

Etanol al 70 % por 5 segundos
Cloro al 3 % por 10 a 20 minutos

Remover espata:

Etanol al 70 % por 5 segundos
Cloro al 3 % por 10 a 20 minutos.

Tres veces enjuagar con agua destilada y esterilizada.

Cuando son hojas con nervaduras:

NaClO (Hipoclorito de sodio) al 10 % por 30 minutos más Tween 200.05 ml por cada 100 ml de desinfectante.

Desinfectante al 5 % por 30 minutos.

4.3 FASES DEL CULTIVO IN VITRO DE ANTHURIO

Murashige (1974) ha propuesto tres pasos fundamentales para propagar in vitro eficientemente una especie:

1. El establecimiento del cultivo aséptico
2. Multiplicación (multiplicación de propagulos sanos)
3. Enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante a suelo (enraizamiento in vitro)

4.3.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASEPTICO.

Gallaga (1995) afirma, es la primera fase o etapa y sus condiciones son: ser aséptico, libre de contaminantes, estos cuidados se inician con el manejo correcto de las plantas donantes en el vivero de planta original del laboratorio, si se sospechan plantas enfermas, o para extremas precauciones, se le corren pruebas al material donante.

Si se trata de eliminar patógenos, deberán sembrarse meristemas, tomando estas de la parte de la planta donante que luzcan sanos. A las plantas enfermas se les deberán dar también algunos tratamientos como termoterapias.

Gallaga y Jaramillo (1995), sostienen que la selección del explante o inóculo, es muy importante, buscando siempre el mejor, el más joven, de mejor aspecto, y que ya prendido evolucione típicamente y en condiciones óptimas.

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente, la razón es que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos principalmente bacterias y hongos que compitan ventajosamente con el explante.

El explante debe de responder eficientemente bajo las condiciones in vitro, siendo importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y en forma importante su balanza hormonal.

Gallaga y Jaramillo (1993,1995), mencionaron otra medición importante al medio de cultivo, y en esta, el manejo de los fitorreguladores o reguladores de crecimiento, si su uso se desconoce se deben de correr pruebas con ello a diferentes concentraciones y proporciones hasta encontrar la que mejores resultados ofrezca (formando así un cuadro tecnológico)

4.3.2 MULTIPLICACIÓN O CRECIMIENTO DEL INOCULO.

Los factores importantes de esta fase son: la edad, tamaño y tipo de propagación (embriones, yemas adventicias, brotes, callos, etc., así como el

proceso de transferencia in vitro y las precauciones que en ellas se manejan. En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callo. O sin ella, según las condiciones del cultivo. La fase intermedia de formación de callos se evita cuando se tiene de que las plantas provenientes de callos presentan diferentes grados de variación; esta puede ser de tipo epigenético o corresponden a motivaciones verdaderas. (Lankin et-al 1981)

4.3.3 ENRAIZAMIENTO IN VITRO.

Thorpe (1980), menciona que este proceso requiere del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales, también se requiere cambiar el balance hormonal, esto es disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En la micropropagación en gran escala de especies ornamentales, esta fase resulta económicamente incosteable, por lo que algunas empresas la han sustituido por el enraizamiento de brotes en cámaras de humificación o invernaderos de aislamiento y substratos diferentes y utilizando enraizadores, el objetivo principal de la fase logra el estímulo y producción de raíces.

4.4 CUIDADO DEL MATERIAL VEGETAL.

Ayerbe- Mateo (1990), se puede utilizar dos tipos de material vegetal para su aislamiento in vitro: plantas cultivadas bajo condiciones controladas: en invernadero o con ambiente controlado, o plantas cultivadas en el campo. En la práctica, si un explante es aislado de una planta cultivada en el exterior, existen muchas posibilidades de que se produzca una infección, son excepciones los tejidos aislados del interior del vegetal, si a pesar de los inconvenientes se tiene que utilizar material cultivado en el campo, se debe tener en cuenta lo siguiente:

1. Las yemas deben usarse con sus catafilos o brotes, una vez que no estén durmientes, aunque no hayan empezado a abrirse.
2. Se pueden utilizar ramas que hayan permanecido almacenadas, y luego brotarlas en agua en el interior.
3. Las ramas que se hayan desarrollado en el interior, se pueden envolver en plástico y solo deben usarse para su aislamiento las partes que se desarrollan a partir de ese momento.
4. Si se utiliza material desarrollado en el exterior, se deben emplear, los vegetales más jóvenes.

El elevado porcentaje de infección que se produce, cuando se utiliza material cultivado en el exterior hace generalmente necesario utilizar material producido en el invernadero o cámara de cultivo. Si se tiene que utilizar material exterior es aconsejable, siempre que sea posible, pasar la planta al interior donde se continua su cultivo en algún recipiente y, por lo tanto el crecimiento; Sobre estas partes recién formadas se toman los explantes para el cultivo in vitro (Ayerbe Mateo 1990).

Finalmente para limitar las infecciones cuando se utiliza material de invernadero o cámara de crecimiento, se deben de seguir las siguientes directrices:

1.- Impedir las infecciones por insectos (afidos, araña roja, ácaros, mosca blanca, etc.) ya que estos frecuentemente son portadores de enfermedades.

2.- Evitar hongos y bacterias, utilizando cuando sea posible fungicidas o bactericidas (sistémicos)

3.- No mojar nunca las plantas al regar, añadiendo directamente el agua. El agua frecuentemente es un elemento importante para la reproducción o propagación de microorganismos.

4.- Mantener la humedad en el invernadero tan baja como sea posible, las infecciones fungicas y bacterianas son más probables con alta humedad.

5.- Permitir a las plantas secarse prácticamente antes de iniciar la esterilización y el aislamiento.

4.5 ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL VEGETAL.

Ayerbe Mateo (1990). En principio existen cuatro fuentes de infección: la planta (su interior y exterior), el medio nutritivo (insuficiente esterilización), el aire y el operador (trabajando preciso), lo más importante de estas condiciones es la planta misma, el material vegetal deberá ser bien esterilizado antes de su aislamiento in vitro.

Antes de empezar el proceso de esterilización, se deben retirar cualquier residuo de suelo, proporciones muertas que pudiesen quedar en las plantas o proporciones de plantas con las que se trabaje. A continuación se debe de realizar un lavado con agua, si la contaminación externa es fuerte, la esterilización, generalmente es de la siguiente forma:

- Se sumerge el órgano en alcohol al 70 % durante algunos segundos, para eliminar las burbujas de aire (el alcohol del 96 % resulta demasiado fuerte, produciendo una excesiva deshidratación) luego,
- Se realiza una esterilización durante 10 a 30 minutos en NaClO al 1 % conteniendo algunas gotas de Tween 20 ó 80, después se aclara en agua corriente estéril (para eliminar el hipoclorito), generalmente se hacen tres aclaraciones durante 2 a 5 y 15 minutos respectivamente, después,
- Se puede comenzar a trocear el material vegetal, en condiciones estériles (cámaras de flujo laminar) utilizando instrumentos estériles bañados en alcohol al 96 % y después flameado.

Ayerbe Mateo (1990), si a pesar de una buena esterilización química del material vegetal, después se producen infecciones, esto se puede deber a las siguientes causas:

1.- A las llamadas infecciones internas,

2.- Trabajo poco escrupuloso (falta de lavado de las manos, superficie de la mesa no esterilizada con alcohol al 96 %, pinzas o bisturí no esterilizados, insuficiente esterilización de las cajas petri, papel y/o medio nutritivo, botes de laboratorio sucios, etc.), la utilización de mascarar, cubrirse el pelo y el empleo de guantes estériles pueden contribuir a disminuir el numero de infecciones.

3.- Una cámara de flujo laminar defectuosa, las cámaras deben revisarse cada año en fabrica, con un contador de partículas, además los filtros frontales deben de ser renovados periódicamente.

4.- El alcohol en el que se sitúan los instrumentos antes de su flameado están contaminados, es aconsejable renovar este alcohol de forma periódica.

5.- Los tubos que contienen los medios nutritivos no están estériles en su exterior, después de esterilizar los medios nutritivos los recipientes deben colocarse en condiciones estériles.

6.- Si los suelos no se limpian y se desinfectan de forma regular, cuando se entra en la habitación de inoculación se debe usar calzado de plástico sobre los zapatos, o mojar las suelas de los zapatos con un liquido esterilizante.

7.- Se permite el paso a la habitación de inoculación a más personas de las necesarias, produciéndose la infección del suelo y del aire.

4.6 FASES DEL INOCULO IN VITRO (AISLAMIENTO, INOCULACIÓN Y REPICADO).

Resulta obvio que la inoculación y el repicado deberían llevarse a cabo en las mismas condiciones de esterilidad que el aislamiento, en el laboratorio se realizan en la cámara de flujo laminar, pero si en algún momento no existe disponibilidad de este

tipo de recurso, algunas operaciones como el cortado, pueden realizarse entre aspal de filtro estéril (Ayerbe Mateo 1990).

Los explantes en principio pueden cortarse de dos formas diferentes, sobre una placa de cristal esterilizado con alcohol al 96 % o también sobre papel filtro estéril.

4.6.1 AISLAMIENTO.

Después de la esterilización y el aclarado, se deja el explante sobre el papel filtro estéril o la placa de vidrio, utilizando unas pinzas, si las superficies cortadas han estado en contacto con cloro, las partes afectadas se retiran utilizando un bisturí estéril, frecuentemente es necesario cortar cantidades o volúmenes estándares de tejidos y para realizar esta labor con mas facilidad se puede utilizar milimetrico (plastificado) (Ayerbe Mateo , 1990).

4.6.2 INOCULACION.

En la inoculación el tubo de ensaye o matraz que contiene el medio sólido, debería estar en principio, en posición horizontal, esto reduce frecuentemente el numero de infecciones sobre todo cuando no se trabaja en una cámara de flujo laminar.

El método de inoculación sobre medios sólidos dependen en gran medida del tipo de material con el que se trabaja, los meristemas se inoculan sobre el medio, en lugar de hacerlo en su interior, esto ultimo producirá una deficiencia de oxígeno. Los explantes son generalmente introducidos ligeramente en el agar, se debe de tener cuidado de no introducir demasiado al agar los ápices del vástago, ya que produciría una deficiencia de oxígeno. (Ayerbe Mateo, 1990).

4.6.3 REPICADO.

El repicado puede ser necesario por diversas razones:

- 1.- El medio nutritivo esta apuntado (síntoma de deficiencia)
- 2.- El medio nutritivo se seca (haciéndose demasiado elevadas las concentraciones de sal y de azúcar)
- 3.- El tejido u órgano ha crecido de manera que ocupa todo el tubo o matraz.
- 4.- Se necesita el material para la siguiente propagación.
- 5.-El medio se ha hecho liquido, debido a la disminución de pH por la acción de la planta.

Y si se realiza como se indica:

- 1.- El tubo o matraz se esteriliza externamente, con un algodón empapado de alcohol al 96%.
- 2.- Se retira del tubo, en la cámara de flujo laminar, el papel de aluminio o película que recubre el tapón de algodón después se retira esta.
- 3.- Se extrae el explante o callo y se coloca sobre una placa de petri estéril o sobre (entre) papel filtro estéril.
- 4.- Después de trozar el material, en la forma que convenga se vuelve a inocular sobre un medio nutritivo reciente, cuando se obtienen diferentes porciones, se selecciona material vigoroso, homogéneo, no necrótico.

5. ESTABLECIMIENTO DEL LABORATORIO DE CULTIVO (MATERIAL)

Se indican en una lista los elementos necesarios para montar un laboratorio profesional de cultivo de tejidos. Si se trabaja en pequeña escala, se puede utilizar un equipo mas reducido en este caso los elementos marcados con un asterisco no son absolutamente necesarios:

- Suministro de gas, agua y electricidad y posiblemente aire comprimido y línea de vacío.
- Calentador de agua
- Material de vidrio diverso
- Placa caliente con agitación magnética
- Manta calefactora o placa apta para grandes recipientes, en la practica el medio de calentamiento es frecuentemente por medio de inyección de vapor.
- Fuente de vapor para la calefacción de los medios
- Granetaria para pesados en gramos (precisión hasta 0.01 gr)
- Espátulas para la utilización durante la pesada.
- Mezcladora para grandes cantidades de medio
- Horno microondas, para calentamiento rápido de los medios y mezclas de gas (puede sustituir a la manta calefactora); el horno de microondas se puede utilizar también para la descongelación rápida de material.
- Sistema de filtrado millipore.
- Dosificador automático.
- Potenciometro
- Aparato de destilación
- Deionizador
- Productos químicos
- Reloj, alarma para tiempos de esterilización.
- Gradillas de metal, para mantener los tubos de ensayo en el autoclave.
- Cajas petri para autoclave.
- Tubos de ensaye, matraces, recipientes de plásticos
- Material para el cerrado de tubos y matraces (algodón, papel aluminio, película plástica, tapones metálicos)
- Autoclave, olla exprés
- Almacén de productos químicos, material de vidrio
- Almacén estéril para medios nutritivos, agua estéril.
- Deposito de agua destilada y/o deionizada.
- Escurridores.

- Lavado de pipetas (resistentes al ácido)
- Cámara de flujo laminar (cámara de inoculación estéril)
- Suministro de gas en la cámara de inoculación
- Microscopio simple binocular
- Mechero Bunsen para flameado (o lampara de alcohol)
- Estabilizador seco para bisturíes, escalpelos, pinzas.
- Papel filtro (o placa de vidrio) para su uso como material esteril.
- Cajas petri para repicado
- Centrifuga de baja velocidad
- Hipoclorito calcio, para esterilización del material vegetal.
- Alcohol al 96 %
- Almacén para alcohol defendido del fuego.
- Material para envolver cajas, gradillas
- Estufa de secado para vidrio, después de la esterilización.
- Material de limpieza.
- Detergente.
- Carrito.
- Refrigerador para almacenamiento de productos químicos y medios nutritivos.
- Congelador.
- Baño resistente al ácido contenido.

5.1 SALA DE LAVADO.

En la planeación y organización de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales deben de tomarse en cuenta, principalmente las condiciones de asepsia en los que se debe trabajar así como su funcionamiento,(Merino 1988).

Un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales no es muy distinto de cualquier otro laboratorio de investigación; la diferencia principal estriba en las condiciones de asepsia que se requieren para establecimiento de cultivos asépticos entendiéndose

como asepsia un conjunto de métodos destinados a prevenir enfermedades infecciosas o organismos (o los cultivos in vitro en nuestro caso).

Merino (1988) en esta solo se llevara a cabo el lavado de la cristalería en general, también puede emplearse para el primer lavado con detergente del material vegetal, aquí se puede instalar el autoclave para esterilizar tanto el medio de cultivo como el material y tubos o recipientes contaminados. También es recomendable instalar una lavadora de cristalería (opcional) y una estufa u horno para el secado de la cristalería, es indispensable contar con el siguiente material:

- Cristalería
- Gabinetes para la cristalería de preferencia con puertas para evitar que se empolve.
- Estufa u horno de secado por convección.
- Autoclave.
- Agua caliente y fría
- Agua destilada
- Agua deionizada (destilador y deionizador opcionales)
- Fregadero de preferencia de doble tarja profundo
- Instalación eléctrica

5.2 SALA DE PREPARACION DE MEDIO Y MATERIAL VEGETATIVO

Merino (1988) En esta sala se preparan los medios de cultivo que serán utilizados en las diferentes fases de desarrollo de los inoculos, a igual que el material vegetal del cual se tomara el inocular seleccionado y es indispensable solo contar con el material siguiente:

- Gabinetes para guardar los reactivos, es recomendable un gabinete extra para almacenar cristalería.
- Gabinete o cajones para guardar los tapones de los tubos de ensaye o “kaputs”, así como las tapas para matraces y frascos de 150 ml

- Cánulas para esterilizar cajas petri
- Cánulas para esterilizar pipetas
- Charolas de plástico para transportar las soluciones madre y medio preparado
- Gradillas de metal para colocar los tubos con medio de cultivo (preferentemente 40 tubos por gradilla)
- Agitadores magnéticos con calentamiento
- Desinfectador automático de medio de cultivo (puede suplirse con soportes, anillos, embudos de 500 ml con mangueras de hule y pinzas mhor)
- Reloj de alarma de 120 min.
- Balanza granetaria
- Balanza analítica
- Potenciometro
- Refrigerador y congelador
- Instalación eléctrica
- Instalación de gas
- Instalación de vacío

5.3 SALA DE SIEMBRA Y DISECCION.

Merino (1988), en esta sala se deben tener los máximos cuidados de asepcia, para lo cual se emplean cámaras de flujo laminar de aire, utensilios estériles como cubre bocas, cubre cabezas y aire filtrado en la sala, además:

- Aire acondicionado y filtración.
- Vacío para esterilización por filtrado
- Cámaras de flujo laminar de aire
- Microscópico estereoscópico
- Lupa con lampara

- Instalación eléctrica de 110 a 220 volts
- Instalación de gas
- Gabinetes
- Instrumentos de disección
- Lampara de luz ultravioleta

5.4 SALA DE INOCULACIÓN.

Ayerbe Mateo (1990). Aunque la preparación y separación de los explantes y la división (corte) de los callos, etc.; se realizan sobre placas de vidrio estéril, o sobre papel filtro estéril, estas labores son necesarias llevarlas a cabo en una cámara de flujo laminar (también llamada cámara de inoculación).

Cuando estas operaciones se llevan a cabo en una habitación no estéril, el numero de infecciones es, mucho mayor, si se realiza sobre papel filtro con aire no estéril (por ejemplo en las clases de practica, donde el uso de cámaras de flujo laminar serian demasiado caro, se debe contar al menos con un 10 % de infecciones). (Ayerbe Mateo 1990)

Los laboratorios de cultivo de tejidos de investigaciones comerciales, usan siempre cámara de flujo laminar para limitar las posibilidades de infección. En las cámaras de flujo laminar, el aire se toma del exterior, y se hace pasar a través de un filtro de poros muy finos, antes de que llegue a la mesa de la cámara de inoculación.

Ayerbe Mateo (1990). Este sistema de filtrado asegura que el flujo de aire sobre la mesa es completamente estéril (este flujo al ser laminar, da nombre a la cámara), teniendo en cuenta que el flujo de aire es continuo, a través de la cámara de inoculación, es prácticamente imposible que ninguna partícula pase desde la habitación en la que se encuentra la cámara, en esta ultima. Cuando no se usa la cámara puede ser cubierta con plástico, quedando resguardada del aire del exterior.

El flujo de aire puede ser regulado, y en la parte superior de la cámara se disponen tubos fluorescentes para su iluminación.

Ayerbe Mateo (1990), se sitúa una llave de gas sobre la mesa para el flameado, para este fin también se puede utilizar un mechero de alcohol o un esterilizador seco. En este último proceso el instrumento que se va a esterilizar se coloca durante un cierto tiempo en un aparato que contiene pequeñas bolas de cristal calientes, también llamada incinerador de bacterias.

Ayerbe Mateo (1990), se recomienda que las cámaras de flujo laminar sean revisadas por un servicio técnico, una vez al año y la mayor parte de los laboratorios prefieren hacer un contrato de mantenimiento con suministrador. En los laboratorios modernos las cámaras de flujo laminar se sitúan en una habitación especial (relativamente limpias) y aislado, que se mantiene estéril y libre de polvo por medio de filtros, la habitación se mantiene presurizada de manera que el aire no estéril del exterior no puede entrar.

Ayerbe Mateo (1990). Los filtros de la cámara de flujo laminar deben ser limpiados con aspiradoras, de forma regular, y remplazados anualmente (los filtros gruesos se ensucian de forma especial). El piso de la habitación en la que se encuentra la cámara, debe de ser descontaminado diariamente y se deberá usar en su interior calzas y botas de laboratorio limpios y esterilizados. Los visitantes del exterior son una fuente importante de infección (a través del calzado y la ropa). Otras indicaciones para el uso de una habitación de incubación son: mantener la habitación tan limpia como sea posible, no introducir ningún material infectado, retirar los tubos u otros recipientes sospechosos de infección, tan pronto como sea posible, retirar de forma periódica la basura en bolsas de plástico, limpiar regularmente las mesas con alcohol al 96 % (no utilizar alcohol al 70 % ni dejar gotas de agua) utilizando un trapo de calidad que no deje residuos, retirar los medios infectados con esporas, cambiar de manera regular los instrumentos, no permitir la entrada de objetos o personas innecesarias, no utilizar nunca la cámara como almacén, lavarse de forma regular las manos y brazos con agua y jabón y después con alcohol al 96 %, colocar los instrumentos utilizados directamente en alcohol al 96 %, o en esterilizador seco, conectar la cámara de flujo laminar 15 minutos antes de su utilización, evitar la interrupción o inversión de flujo de aire, exponer la parte más vital de la cámara al

flujo directo del aire estéril, y finalmente evitar introducir la cabeza (cabellos), en el interior de la cámara en algunos laboratorios se conectan lamparas ultravioleta durante la noche para desinfectar el aire.

5.5 SALA DE DESARROLLO

Merino (1988), en esta sala se deben tener muy en cuenta las instalaciones eléctricas, para diferentes fases de crecimiento de los inoculos necesitan diferentes fotoperiodos y temperaturas. No deben fallar:

- Aire acondicionado y filtrado
- Control de temperaturas
- Acido cromico y sulfúrico para limpieza de material de vidrio muy contaminado.
- Temperaturas controladas (17 a 271 °C), con refrigeración y calefacción.
- Estantería para las gradillas de los cultivos.
- Iluminación favoreciente
- Reloj para regulación de fotoperiodo
- Sistema de alarma por si falla el funcionamiento
- Mesa para realizar observaciones
- Agitador rotatorio

5.6 INVERNADEROS.

Merino (1988). Son muy importantes las condiciones de los invernaderos a los cuales se van a transferir las plantas provenientes del laboratorio, pues es el lugar de donde se pueden recontaminar o sufrir daños por insectos y/o roedores, lo más adecuado e indispensable seria:

- Regulación de la luz, tanto en intensidad como en fotoperiodo

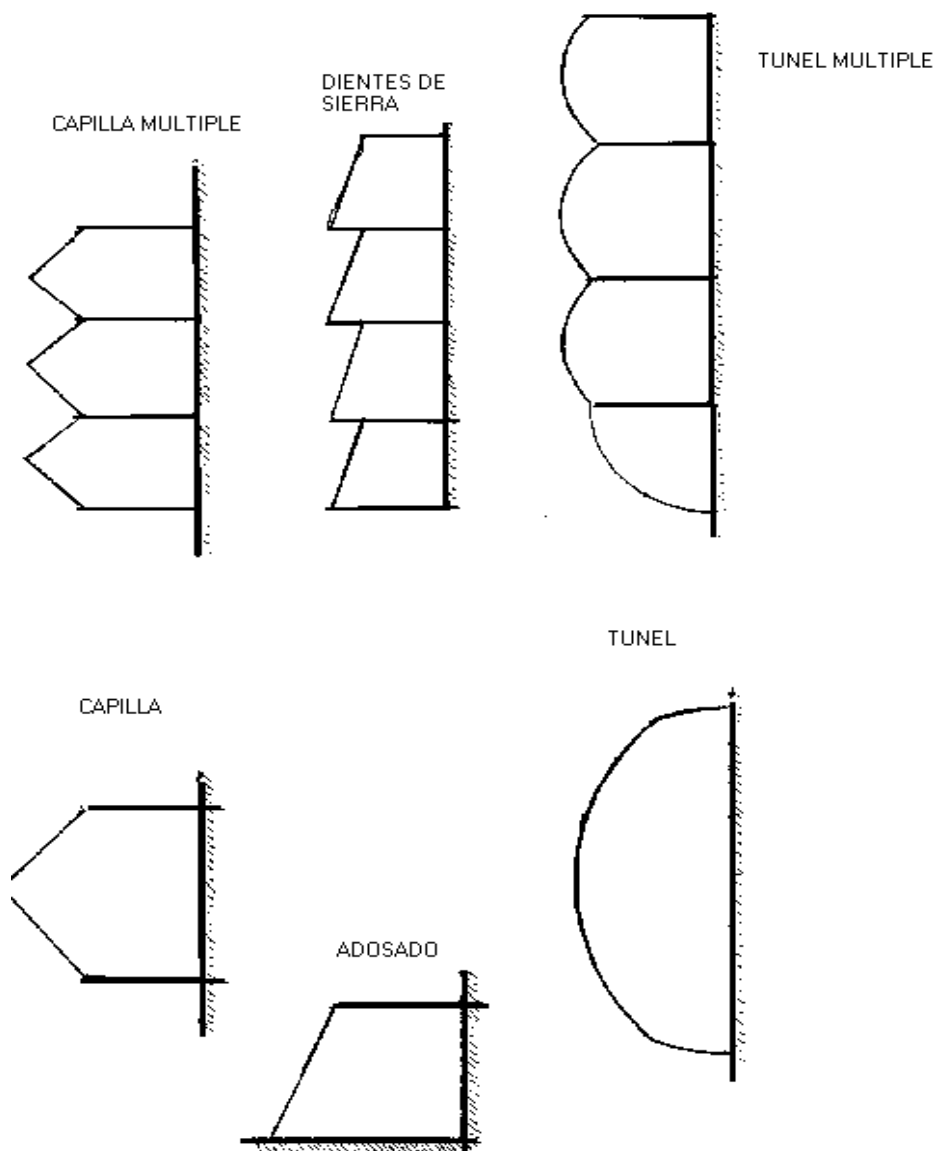
- Regulación de la temperatura
- Control de la humedad
- Pisos de concreto
- Aire filtrado
- Exclusión de insectos (mosquiteros)
- Sistemas de nebulización
- Fertilización o irrigación automático
- Area de almacenamiento para los implementos del invernadero
- Mezclas de suelos estériles
- Bancales para los maceteros

Gallaga (1997). Normalmente la construcción de un invernadero se inicia como parte fundamental y complementaria para la producción de Anthurios, que provienen de propagación in vitro, estos invernaderos tienen la función de:

- Proveer a las plantas de las condiciones adecuadas para seguir creciendo.
- Mantenerlas libres de patógenos y enfermedades, ya que en un invernadero es más fácil controlar estos problemas.
- Disponer de condiciones idóneas para el estudio y la investigación.

Para construir un invernadero es conveniente consultar a un especialista, a usuarios, procurar leer al máximo información técnica, pedir distintos presupuestos y sobre todo no olvidar el fin que se persigue.

FIGURA 1. Diferentes tipos de invernaderos.



6. TECNICAS DE ESTERILIZACION Y MANIPULACIÓN ASEPTICA.

Hurtado (1988). Un laboratorio de tejidos vegetales es en esencia, igual a cualquier otro laboratorio; sin embargo las condiciones de esterilidad de este son

fundamentales de importancia porque todos los medios empleados contienen nutrientes, los cuales facilitan el crecimiento de muchas bacterias y hongos. El crecimiento abundante de ellos destruiría el crecimiento más lento de los tejidos vegetales; aun los contaminantes con crecimiento lento son indeseables, pues pueden producir toxinas que afectan el crecimiento de las células vegetales, por estas razones, el material vegetativo se desinfecta superficialmente antes de iniciar un cultivo in vitro y todo el manejo de los tejidos se hace en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar de aire, en áreas específicas para este propósito.

Hurtado (1988), menciona, que así , todos los medios, instrumentos y recipientes de cultivo deben de esterilizarse para matar las células vegetativa, esporas y otras estructuras reproductivas de los microorganismos que son los causantes de la contaminación de los cultivos.

Jaramillo (1993), el método más común de esterilización es el vapor húmedo, empleando autoclaves que actúan con vapor a presión. Los laboratorios grandes las autoclaves son automáticas o semiautomáticas, eléctricas o de gas, y las hay de tipo horizontal o vertical, cuando se va a esterilizar un volumen pequeño de medios de cultivo basta emplear una olla exprés casera.

Hurtado (1988). Nombra generalmente el tiempo empleado para una buena esterilización es de 15 minutos a una presión de 15 lbs/pul² y una temperatura de 120-121 °C, sin dejarse de tomar en cuenta que cuando se esterilizan grandes volúmenes del medio el tiempo de esterilización debe ser mayor.

Jaramillo (1993), siempre debe evitarse la sobreesterilización, pues trae como consecuencia la degradación de ciertos componentes del medio nutritivo, así como la caramelización de los azúcares. Algunos constituyentes termolabiles del medio de cultivo, como vitaminas, reguladores de crecimiento, urea, etc., deben de ser esterilizados empleando un filtro millipore, pues el tipo de membranas de estos filtros retienen a los microorganismos lográndose un filtrado estéril.

Hurtado (1988), cita, el tiempo de esterilización de la cristalería no es crítico y generalmente es de 15 minutos como tiempo mínimo a 15 lb/pulg² a 121 ° C. Los instrumentos como pinzas y bisturíes generalmente se mantienen sumergidos en el alcohol hasta el momento de su uso, y se esterilizan conforme se van empleando por medio de frecuentes inmersiones en alcohol seguido por flameo.

Jaramillo (1993). En cuanto al material vegetativo este contiene en la superficie una abundante microfila, que debe ser eliminada por medio de una desinfección antes del corte del tejido u órgano que será empleado como inóculo. El agente desinfectante más adecuado, así como su concentración y el tiempo de desinfección, debe de ser determinado empíricamente para el material vegetativo con el que se trabaja.

Jaramillo (1993) En general, podemos indicar que casi siempre se usan soluciones de hipoclorito de calcio o de sodio (blanqueador casero), los cuales liberan al cloro como agente desinfectante activo. Las concentraciones empleadas son 0.1 a 2 y 2 a 10 % respectivamente. También puede ser empleado el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), nitrato de plata y cloruro mercurio.

Hurtado (1988) Usualmente, antes de poner el material vegetativo en contacto con el agente desinfectante, se sumerge en alcohol etílico al 70 % durante 30 segundos, con el cual se eliminan los gases de las hojas y se permite una mejor penetración del agente desinfectante en el material. La mayoría de los blanqueadores comerciales contienen un agente humectante pero se recomienda emplear unas gotas de alguno de ellos, como detergente líquido por ejemplo tween . Los agentes desinfectantes posteriormente son eliminados después por medio de varios lavados con agua destilada y esterilizada.

Jaramillo (1993), menciona que no debemos olvidar que con la mayoría de los microorganismos que se encuentran en la superficie de los órganos vegetales, existe evidencia de la presencia de alguno de ellos en la parte interna de las plantas, así se ha reportado que existe una bacteria en los espacios intercelulares de las hojas de petunia, lo cual trae como consecuencia una serie de problemas durante el cultivo, pues no puede ser eliminada. Por la desinfección superficial del tejido, sin embargo

su crecimiento en el medio de cultivo puede controlarse por la adición de antibióticos.

Jaramillo (1993), el trabajo que se realiza en la sala de siembra o cultivo puede hacerse en una mesa de laboratorio creando un área estéril con un mechero bunsen, pero para reducir la probabilidad de contaminación el trabajo se lleva a cabo en un área estéril, proporcionada por una cámara de flujo laminar de aire.

Hurtado (1988). Lo ideal consiste en tener estas cámaras dentro de cuartos independientes los cuales se esterilizan previamente con luz UV, estos cuartos tienen además de la cámara, una superficie con área de trabajo y los servicios esenciales, así como un filtro de aire o unidad de ventana.

Jaramillo (1993), afirma, en una cámara de flujo laminar de aire, este es forzado bajo presión a través de un filtro por la parte trasera de la cámara y fluye sobre el área de trabajo a una velocidad uniforme, la velocidad de flujo del aire evita que las partículas se depositen en el área de trabajo. Estas cámaras pueden ser de uso individual o compartido.

Hurtado (1988), menciona que no debemos olvidar que el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, la limpieza y una organización eficiente, tanto en el laboratorio como en el trabajo contribuirán a reducir el riesgo de contaminación.

6.1 TECNICAS DE ASEPCIA.

- 1.- Esterilización de cristalería y equipo de disección.
- 2.- Flameo de pinzas y bisturíes
- 3.- Desinfección de inoculos vegetales
- 4.- Siembra de diferentes inoculos en condición de esterilidad
- 5.- Preparación y esterilización del medio de cultivo

Ayerbe Mateo (1990), antes de que las semillas, porciones de plantas, órganos, tejidos, etc., sean colocados sobre el medio, este debe ser esterilizado, este es liberado de todos los microorganismos. La esterilización se puede realizar de las siguientes formas:

- 1.- Destrucción física de los microorganismos por medio de aire seco y caliente, vapor o irradiación (luz UV o radiación gamma).
- 2.- Destrucción química de los microorganismos, utilizando compuestos esterilizantes (óxido de etileno, alcohol, hipoclorito, etc.) o antibióticos.
- 3.- Eliminación física de los microorganismos por filtración y/o lavado.

Ayerbe Mateo (1990). La esterilización de los medios de nutritivos generalmente tiene lugar en una autoclave (olla de presión de gran tamaño), menos frecuentemente por filtración y rara vez por irradiación. Los medios nutritivos, así como cualquier otro material esterilizado, deben ser almacenados en armarios o cajas metálicas que hayan sido previamente desinfectadas con alcohol al 96 %.

Ayerbe Mateo (1990), la mayor parte de los medios nutritivos se esterilizan en la autoclave, este aparato (literalmente: recipiente que se cierra así mismo) esteriliza por medio de vapor. Siempre que el tiempo de exposición sea suficiente, el vapor a presión puede destruir todos los microorganismos. El autoclave tiene un rango de temperatura entre 115 y 135 °C, la esterilización depende de:

- 1.- Tiempo
- 2.- Presión
- 3.- Temperatura
- 4.- Volumen

Las ventajas del autoclave son :

- 1.- Velocidad
- 2.- Simplicidad
- 3.- Destrucción adicional de los virus y no la absorción

Las desventajas son :

- 1.- Puede producir un cambio en el pH
- 2.- Algunos componentes se pueden separar.
- 3.- Reacciones químicas (perdida de actividad)

Pasos que se deben seguir para el uso de la autoclave:

- 1.- Tubos de ensaye y matraces, conteniendo entre 20 y 50 ml del medio nutritivo: 20 minutos a 121 °C .
- 2.- Matraces conteniendo 50-500 ml de medio nutritivo 25 minutos a 121°C.
- 3.- Matraces conteniendo 500-5000 ml de medio nutritivo 35 minutos a 121°C .
- 4.- Tubos de ensaye vacíos, matraces, papel de filtro 30 minutos a 130 °C.

El material puede ser esterilizado en seco (tubos de ensaye, matraces y cajas petri vacías, papel, instrumentos,etc.) requieren de 2 a 3 horas de esterilización seca a 160 °C.

6.2 ESTERILIZACION POR IRRADIACION.

Ayerbe Mateo (1990) La esterilización de medios nutritivos por irradiación (los rayos gamma), no se usa casi nunca en cultivo de tejidos, ya que resulta muy cara si se compara con el procedimiento habitual de la autoclave. Aunque la esterilización por rayos gamma es tan eficaz como la realizada en autoclave, el crecimiento vegetal que se obtiene es significativamente menor en los medios

esterilizados de esta forma. Cuando se esterilizan tubos, cajas u otros recipientes de plástico donde la utilización del autoclave es imposible, se emplea casi siempre la esterilización por radiación gamma.

6.3 ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN.

Ayerbe Mateo (1990), en la esterilización por filtración (las soluciones, medios líquidos, etc. Pasan a través de un filtro de membranas) son retenidas todas las partículas, microorganismos y virus que son mayores que el correspondiente poro del filtro. La esterilización por filtrado se utiliza generalmente cuando se quiera añadir a un medio nutritivo una sustancia termolabil "x", se recomienda un filtro de nitrato o acetato de celulosa.

Antes se utilizaba frecuentemente vacío en la esterilización por filtrado, el líquido se filtraba bajo vacío, a través de una membrana, en un matraz Buchner, y se utilizaban en el proceso bombas de vacío. Hoy en día la solución que va a ser filtrada es ayudada generalmente por presión producida por aire o por la misma jeringa.

7. PRODUCCION DE PLANTAS LIBRES DE PATOGENOS.

Las infecciones internas producidas por virus, micoplasmas, bacterias y hongos pueden ser muy difíciles de combatir y es prácticamente imposible liberar a la planta de estos patógenos internos, utilizando productos químicos a veces es posible impedir la multiplicación de los virus, utilizando compuestos relativamente caros como virazide (Ribavirina) y antimetabolitos, añadidos al medio, se dice que los bactericidas son inútiles para eliminar las bacterias en los cultivos in vitro ya que las concentraciones que se necesitarían para ser eficaces son fitotóxicas; además a veces los microorganismos no reaccionan en absoluto a los antibióticos añadidos. (Ayerbe Mateo 1990).

Ayerbe mateo (1990). Para conseguir meristemos libres de virus en gran escala se puede inducir sobre explantes la formación de vástagos adventicios; posteriormente utilizando este material, se puede hacer cultivo de meristemos. Si los meristemos aislados no se pueden mantener in vitro se pueden injertar de forma temporal sobre patrones (plantulas), cultivadas in vitro y libres de virus. El cultivo de meristemos se utiliza también frecuentemente para obtener plantas libres de hongos o de bacterias.

Quinteros (1985). Un aspecto muy importante de la micropropagación es la eliminación de patógenos, la producción de plantas libres de virus, es posible por medio de cultivos de meristemos debido a que, en este sistema, los virus no se replican con suficiente rapidez y se diluyen. La eliminación requiere por lo tanto, subcultivar repetidamente los tejidos hasta obtener líneas libres de virus para la técnica in vitro, aplicando a los cultivos, agentes antivirales, inoculos para los tejidos vegetales como el Virazide.

Quinteros (1985), el problema de las plagas y enfermedades ha sido combatido con métodos químicos facilitando su manejo, debido a la utilización de los cultivos in vitro ocupando menos espacio, la facilidad de manejo de la luz debido a que las células cultivadas in vitro ocasionalmente vuelven a expresar características de resistencia a los patógenos (virus).

7.1 PLAGAS Y ENFERMEDADES MÁS COMUNES EN EL CULTIVO DEL ANTHURIO

Ball (1991), describe a *Rhizoctonia solani* como un hongo que causa una pudrición filamentosa de color pardo en la raíz, presentando la planta debilidad y hojas amarillentas desde la base. El patógeno se encuentra en el suelo y en plantas infectadas, se dispersa en condiciones de clima cálido, humedad moderadamente alta y medio salino.

Ball (1991), también describe al *Phytium spp* como la pudrición por el moho del agua, se presenta una pudrición de la corteza y parte de la raíz puede avanzar hacia el tallo, las plantas atacadas por el hongo se vuelven raquíticas, hojas amarillentas y abatidas, en casos severos se da un colapso repentino de la planta. El hongo se encuentra en el suelo y se dispersa por el agua, requiere alta humedad y temperaturas moderadas.

Larson (1985), dice que el hongo *Thielariosis basicola* es el agente causal de la pudrición negra de la raíz, invoca falta de crecimiento y marchitamiento de la planta, forma esclerosios de color negro en la parte medular del tallo, los cuales sobreviven por largos periodos en el suelo, es favorecido su desarrollo por el frío y la humedad alta; inhibiéndose a las elevadas temperaturas y un medio ácido, con pH menor a 5.5.

Jaramillo (1993). La pudrición de la raíz *Phytophthora sp* y *Phytium splendens* es un problema común entre los ANTURIOS, el daño causado por este hongo se manifiesta por la pudrición de las raíces en un mayor desarrollo de la enfermedad, las raíces pueden ser totalmente descompuestas. Este desorden va generalmente acompañado de reducción en el tamaño de la planta; pocas y pequeñas hojas y flores. La enfermedad se presenta más en los medios envejecidos y descompuestos, impiden un apropiado drenaje y una buena aireación de las raíces.

Jaramillo (1993) *Rodopholus símiles* este problema se manifiesta por un crecimiento pobre y bajo rendimiento, debido a la parasitación de nematodos en las raíces, las plantas reducen su tamaño y producen pocas y pequeñas hojas y flores. El problema es común en plantaciones viejas y con mal drenaje.

Jaramillo (1993) hace mención de algunos insectos que atacan al ANTURIO en su fase de invernadero y las enumera en el siguiente grupo:

- 1.- Trips. Estos se alimentan de las flores cuando se encuentran en botón causando un rayado blanco que se manifiesta en la espata cuando abre; estas flores no son comerciales.

2.- Acaros. Viven y se alimentan en el envés de las hojas jóvenes en desarrollo, causando la detención del mismo y el enrollamiento de las hojas, los ácaros se agrupan en colonias en la superficie inferior de las hojas maduras; su presencia puede ser detectada por las manchas o el puntilleo en las mismas.

3.- Pulgones o chinches, estos se presentan en las hojas jóvenes causando retorcimiento y pérdida del vigor de la planta.

4.- Mosca blanca, se alimenta en el envés de las hojas o en el peciolo, su actividad alimenticia puede causar una seria pérdida de vigor de la planta y puede ocasionar una disminución de la producción de flores.

5.- Caracoles, estos causan cortes circulares grandes en las hojas y flores, atacan de noche y las poblaciones son mayores en el periodo de lluvias.

Cabe mencionar que de ácaros, pulgones y chinches, mosca blanca y caracoles no han sido reportados sus géneros ni especies.

8. REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Las sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas desempeñan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de los vegetales, “sin sustancias de crecimiento no hay crecimiento”

Went (1987), encontró que para desarrollarse longitudinalmente, los tejidos deben recibir sustancias de crecimiento, aunque las sustancias naturales de crecimiento (endogenas) controlan normalmente el desarrollo de las plantas, puede modificarse el crecimiento mediante la aplicación de sustancias exógenas, algunas de las cuales pueden producir resultados provechosos para el hombre.

Weaver (1990). Menciona, investigaciones acerca de las sustancias naturales de crecimiento, revelan gradualmente los mecanismos de control hormonal del crecimiento y desarrollo de las plantas. En la actualidad, los reguladores de las plantas se utilizan ampliamente en el control de malas hierbas, del desarrollo de los frutales, defoliación, propagación y control del tamaño.

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades, fomentan un crecimiento. Las hormonas de las plantas (fitohormonas) son reguladores producidos por las mismas plantas que, en bajas concentraciones, regulan los procesos fisiológicos de aquellas, por lo común las hormonas se desplazan en el interior de las plantas, de un lugar de producción a un sitio de acción.

Hurtado (1987) Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos reguladores del crecimiento vegetal divididos en tres grupos principales:

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citocinicas y giberelinas.
- b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscisico.
- c) Etileno.

8.1 AUXINAS.

Weaver (1990). Auxinas es un termino genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las células de los brotes. Algunas auxinas son naturales y otras se producen sintéticamente, se asemejan al IAA, por los efectos fisiológicos que provocan en las células vegetales, el mas importante de los cuales es la prolongación.

Devlin (1980). De forma natural, las concentraciones más altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento (ápices del coleoptilo, yemas y ápices de crecimiento de las hojas); sin embargo, también se encuentran auxinas ampliamente distribuidas por la planta, sin duda provienen de las regiones meristemáticas.

La auxina desde sus puntos principales de síntesis, que son los meristemas apicales, básicamente es hacia abajo (basipetalo), esta polaridad del transporte se mantiene aun si el tejido vegetal (tallo) es cortado y colocado de cabeza, existiendo,

por tanto, un ápice fisiológico inferior sin importar la orientación que estos tengan. (Bidwell 1979).

8.2 CITOCININAS.

Como sucede con los demás reguladores de crecimiento, las citocininas tienen un intervalo amplio de efectos regulatorios, estas promueven la división celular y el efecto tiene lugar con concentraciones tan bajas como 5×10^{-11} M; generalmente inhiben el crecimiento de raíces laterales, además inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, actúan en el retraso de la senescencia, en la organogénesis, ya que pueden ser inducidas yemas de tejido in vitro de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo (B. Alvarez 1988)

B. Alvarez (1988) En el cultivo in vitro los tejidos “normales” de callo presentan una producción endógena de citocininas, suficiente para dar una respuesta de crecimiento. Además, existen tejidos de callo heterótrofos para citocininas, que puedan desarrollar la capacidad para sintetizar sus propias citocininas, aunque es conocido que esta independencia, así como la dependencia a las citocininas exógenas en el cultivo nunca es absoluta.

8.3 GIBERELINAS.

La giberelina puede provocar un aumento sorprendente de la prolongación de los brotes en muchas especies, que resulta particularmente notable cuando se aplican a ciertos mutantes enanos (Weaver 1990).

B. Alvarez (1988). Las giberelinas presentan un aspecto de actividad biológica muy variado, con un papel regulatorio principal en el crecimiento, pues pueden producir una elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos, fenómeno que puede ser atribuible a la estimulación de la división y el alargamiento

celular, por desgracia al mecanismo de acción exacto de las giberelinas aun es desconocido, pero se ha sugerido que en algunos casos las giberelinas actúan promoviendo la síntesis de auxinas a partir de su precursor triptofano o triptamida.

8.4 INHIBIDORES.

Los Inhibidores constituyen un grupo bastante distinto entre las sustancias del crecimiento de las plantas, inhiben o retrasan el proceso fisiológico o bioquímico de los vegetales. De acuerdo con sus propiedades fisiológicas, algunos Inhibidores endogenos parecen ser hormonas vegetales, diversos Inhibidores naturales pueden tener diferentes acciones, por ejemplo, pueden ser Inhibidores del crecimiento de las auxinas, giberelinas, o bien Inhibidores de la germinación. (Weaver 1990).

Weaver (1990) El crecimiento de las plantas tratadas con retardadores del crecimiento no se suprime por completo. Hasta ahora la mayoría de esos compuestos se producen sintéticamente, existen otros Inhibidores exógenos que pueden retrasar el crecimiento de las plantas, pero de cualquier manera, no encajan en la definición de retardadores de crecimiento.

A pegado a estos productos naturales se han desarrollado también otros de tipo sintéticos, junto con las hormonas, se denomina “reguladores” y son los responsables en primer lugar de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza, también determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta.

Ayerbe Mateo (1990). En el cultivo in vitro, los reguladores, especialmente las auxinas y citocininas juegan un papel muy importante, se puede decir que el cultivo in vitro, es generalmente imposible sin reguladores. Si a un medio nutritivo se le debe añadir una auxina o una citocinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo, que depende del tipo de explante y de la especie vegetal.

A veces se pueden presentar problemas para disolver los reguladores en agua, se recomienda utilizar el IAA (Acido Indol Acetico), IBA (Acido Indol Butirico) y ANA (Acido Naftalacetico), como sales potasicas, que son mas solubles, también es posible disolver estas tres auxinas en la forma de ácidos, con la ayuda de KOH o NaOH 0.1 M, las giberelinas se disuelven con agua con la ayuda de un sonificador. (Ayerbe Mateo 1990).

Las soluciones madre de IAA y kinetina deben almacenarse en la oscuridad debido a la inestabilidad en la luz y por esta razón estos reguladores se descomponen en la luz, hasta ahora el IBA, ANA y 2,4-D (auxinas) y el ABA (citocinina), son más estables en la luz. Un almacenaje prolongado de los reguladores trae problemas adicionales, por ejemplo, el AIA en solución acuosa se vuelve poco a poco inactivo; el AIA se descompone también poco a poco por la acción de algunas enzimas oxidasa y peroxidasa. (Ayerbe Mateo 1990)

Ayerbe Mateo (1990). Si se utilizan reguladores especialmente auxinas y citocininas, se puede producir habituación, se trata de un fenómeno por el cual, el cultivo in vitro que inicialmente necesitaba reguladores para su crecimiento y/o formación de órganos, después de algunos repicados necesitan menos aportaciones de reguladores, o puedan prescindir por completo de ellos.

9. PREPARACION Y COMPOSICION DE LOS MEDIOS.

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también el empleo de tejidos vegetales viables, inoculación, calidad de reactivo, etc., usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer, cultivos para crear todas las partes de una planta en diversas especies vegetales. (Merino 1988).

Ayerbe mateo (1990). El crecimiento y desarrollo in vitro de una planta esta determinado por una serie de factores complejos:

- 1.- La constitución genética.
- 2.- Nutrientes como agua, macro y microelementos, azúcares, etc.
- 3.- Factores físicos que influyen sobre el crecimiento como luz, temperatura, pH, concentraciones de CO₂ y O₂.
- 4.- Algunas sustancias orgánicas como reguladores, vitaminas, etc.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir in vitro ni in vivo, también se deben de añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en las condiciones adecuadas. (Ayerbe Mateo 1990).

Los factores físicos ambientales tienen tanta importancia en el crecimiento y desarrollo in vivo como in vitro, estos factores influyen prácticamente en todo tipo de procesos como absorción, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, etc. (Ayerbe Mateo 1990).

Ayerbe Mateo (1990) En cuanto al tipo de factor importante es el grupo de las sustancias orgánicas al que pertenecen los reguladores, las vitaminas y otros sumamente importantes.

Jaramillo (1993) El cultivo in vitro se puede llevar a cabo, en principio, en recipientes de varias formas y tamaños, de vidrio o de plástico, el vidrio tiene la ventaja de que es muy duradero y puede ser autoclavado, el plástico tiene normalmente una vida limitada y no siempre puede ser utilizado en autoclave, tiene también la desventaja de que produce Etileno que puede producir efectos perjudiciales si se acumula.

Existe un amplio rango de tipos de vidrio que pueden producir importantes efectos fisiológicos, en investigación es aconsejable utilizar vidrio PYREX o un vidrio similar de borosilicato, el vidrio barato, de poca calidad puede liberar al medio cationes como sodio, plomo y arsénico, el vidrio pyrex se recomienda expresamente para el trabajo con protoplastos, cultivos de células aisladas y cultivos de meristemas.

9.1 EQUIPO INSTRUMENTAL REQUERIDO PARA LA PREPARACION DEL MEDIO.

Hernández y Ruiz (1993) Hacen mención que para la preparación del medio de cultivo, se requiere del siguiente equipo instrumental:

- Balanzas analíticas y granetarias
- Potenciometro
- Autoclave
- Campana de flujo laminar de aire
- Refrigerador
- Destilador
- Deionizador
- Plancha magnética con calentamiento
- Pipetas, probetas, matraces volumétricos (vidrio o plástico)
- Vasos de precipitado y matraces erlenmeyer
- Frascos para almacenar soluciones
- Desecador para guardar material higroscópico
- Embudo montado en un anillo y soporte para distribuir el medio nutritivo o dosificador semiautomático o automático.
- Filtro millipore para esterilizar sustancias termolabiles
- Tubos de ensaye y frascos con tapas, o papel aluminio extrareforzado.
- Cajas petri
- Cenulos de acero inoxidable para esterilizar las probetas y cajas petri

9.2 REACTIVOS Y FORMULA QUE SE UTILIZAN PARA LA PREPARACION DEL MEDIO MS

Preparación de soluciones de Stock para preparar medio de cultivo Murashige y Skoog (M.S). Este medio es utilizado para la micropropagacion de la mayoría de las especies.

TABLA 2. Reactivos requeridos para la preparación del medio de cultivo MS.

REACTIVO	En 200 ml	Mg / lto. Conc. Final en el medio.
Compuestos orgánicos:		
• Nitrate de amonio NH_4NO_3 .	33 mg	1650
• Nitrate de potasio KNO_3	38 mg	1900
• Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8 mg	440
• Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4 mg	370
• Fosfato de potasio KH_2PO_4	3.4 mg	170
• Yoduro de potasio KI	16.6 mg	0.083
Acido bórico H_3BO_3	124 mg	0.620
Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	338 mg	1.690
Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	172 mg	0.860
Molibdato de sodio $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 mg	0.250
Sulfato cúprico $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	12.5 mg/50 ml tomar 10 ml	0.0250
Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.5 mg/50 ml tomar 10 ml	0.0250

<ul style="list-style-type: none"> • Sulfato ferroso 	556	2.78
<ul style="list-style-type: none"> • Etilendiamino tetracetato de sodio Na₂ EDTA 	746	3.73
Compuestos orgánicos:		
<ul style="list-style-type: none"> • Vitamina B Clorhidrato de piridoxina 	10 mg	0.050
<ul style="list-style-type: none"> • Agar 	9	9.0
<ul style="list-style-type: none"> • Sacarosa 	20	20.0

9.2.1 PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO M.S

Pasos para preparar un litro de medio M.S:

- Poner cualquier cantidad de agua destilada (ejem 300 ml) en un matraz de aforación de 1000 ml
- Agregar 10 ml de cada una de las soluciones Stock y las hormonas de que se requiera.
- Agregar la sacarosa, agitando hasta disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada y enseguida se pasa a un vaso de precipitado de 1000 ml
- Ajustar el pH a 5.7-5.8 (ajustando con NaOH al 15 % y HCl al 10 % según se requiera)
- Agregar el agar, calentar hasta ebullición sin dejar de agitar, hasta que el líquido sea claro (transparente), de aquí se procede a llenar con 20 ml cada frasco de gerber, enseguida se tapan con papel estaño, procurando que queden bien sellados, se llevan a la autoclave a esterilizar a 120 °C y 1.4 lb de presión por espacio de 15 a 20 minutos.

Preparación del material para sembrar:

Dependiendo del material que se va a sembrar, se procede a sembrar el material:

- ◆ Por lo general siempre se usan pinzas de disección
- ◆ Bisturí
- ◆ Cajas petri
- ◆ Vasos de precipitado
- ◆ Agua destilada

Todo este material debe de ser esterilizado en autoclave, el cual se envuelve en papel estraza para mayor protección.

Cuando se va a sembrar meristemas, yemas, nudos, entrenudos, ápices primero hay que seleccionar la parte de la planta donde estos se encuentran, se lava con agua y con jabón, se secan y se ponen en agua destilada para que no se deshidraten.

Si se va a sembrar tejido como pedazos de hojas, se lava la hoja con agua y jabón, se cortan los pedazos al tamaño requerido y se colocan en agua destilada para que no se deshidraten.

Enseguida se saca el material del agua y se pone en una solución de cloro al 10 % por un tiempo determinado (según el tejido) se lleva a la campana de flujo laminar la cual se pone a funcionar unos 15-20 minutos antes, rociándola con etanol, se saca el material del cloro cuando haya transcurrido el tiempo necesario para su desinfección, se pone en una solución de etanol al 70 % por 30 segundos, y se procede a enjuagar con agua destilada esterilizada, se colocan los tejidos en una caja de petri y se procede a sembrar.

Para sembrar, se coloca el frasco lo más cerca posible del mechero para evitar contaminación, procurando no introducir los dedos en el frasco, tapándolo inmediatamente. Ya terminada la siembra se procede a sellar los frascos con el papel autoadherible, se marcan y se pasan a la incubadora o cuarto de crecimiento.

Se toman datos de crecimiento, de mortandad y de contaminación periódicamente según se requieran los datos.

10. TECNICAS DE PROPAGACIÓN DEL *Anthurium andreanum*.

De las muchas especies en este genero *A. andreanum* y *A. sherzarianum*, son de las que más se conoce, son ornamentales crecidas al aire libre en, los trópicos y subtropicos, en climas templados *A. andreanum* es cultivado por viveristas para producción de flor cortada. Gran cantidad de plantas de *Anthurium* son clonadas por micropropagación. (Van der Meijs y Pierik 1980 y 1991).

FIGURA 2. Los principales métodos de micropropagación.

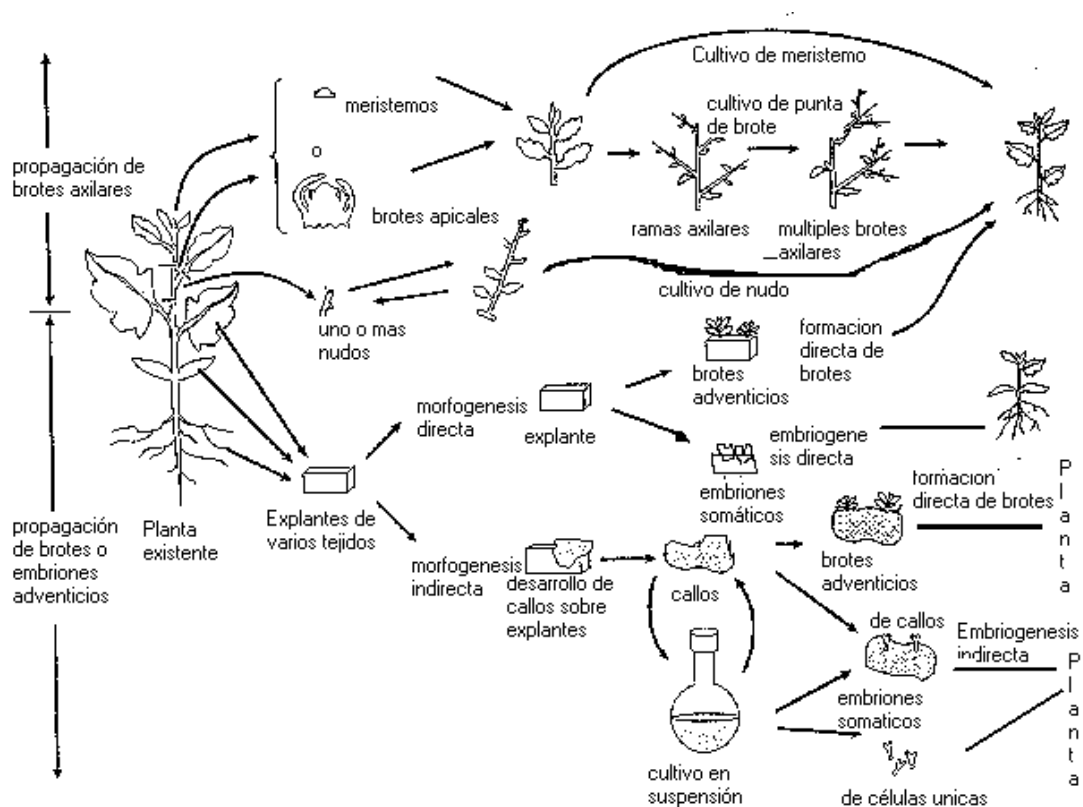
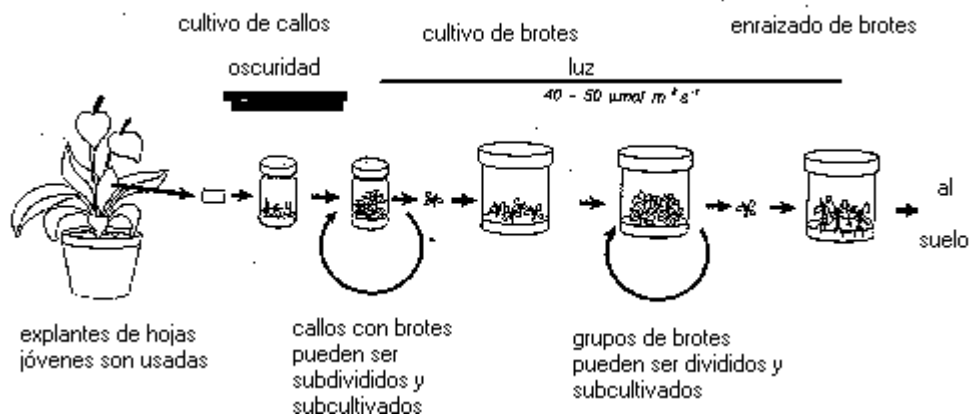


FIGURA 3. Método más usado para la micropropagación de *Anthurium andreaeanum*



Las técnicas más recomendables para la micropropagación de esta especie son el cultivo de brotes y el cultivo de callos, que son en los que se han obtenido mayores éxitos:

10.1 CULTIVO DE BROTOS:

Se deben de utilizar como material inicial, para el cultivo de brotes vástagos jóvenes en crecimiento de 10 a 15 cm de longitud, que acaben de desarrollar sus hojas, cualquier residuo de suciedad o suelo se lava bien con agua corriente, se retiran las hojas de manera que se puedan ver las yemas axilares, se bañan los vástagos sin hojas en alcohol al 70 % y se esterilizan 10 minutos, las bases de las yemas más pequeñas se cortan y eliminan en una cámara de flujo laminar y se realiza la siembra.(Ayerbe Mateo 1990).

El método para cultivar brotes de Anthurium fue descrito por Kunisaki (1980), nos dice que brotes vegetativos fueron cultivados primero en un medio líquido conteniendo:

- ◆ MS sales
- ◆ 0.4 mg/l de tiamina HCl
- ◆ 0.5 mg/l de ácido nicotico.
- ◆ Piredoxina HCl
- ◆ 15 % de agua de coco
- ◆ 2 % de sacarosa.

Los brotes son multiplicados en el mismo medio de agar solidificado (sin agua de coco) y 0.2 mg/l de BAP. Múltiples brotes son producidos de 2 nudos por sección de tallo. Los brotes formados en los cultivos de brotes son la base para formar brotes axilares (Geiger 1990).

Los cultivos de brotes tienen la desventaja de que solo un pequeño número de brotes pueden ser utilizados.

A pesar de la posibilidad de usar cultivo de brotes, el Anthurio es frecuentemente micropropagarlo por procedimientos de cultivo de callos. Este género es uno de los pocos en los cuales es empleada la regeneración indirecta de brotes a partir del cultivo de callos.(E.F George 1996)

10.2 CULTIVO DE CALLOS:

Se puede definir a un callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una dediferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa

de tejido. Esta masa celular puede presentar diferentes tipos de textura y composición celular, (B. Alvarez 1988).

El callo esta generalmente constituido por una alta proporción de células en las que las vacuolas son predominantes, similares a las células del parenquima; el tallo también contiene pequeñas zonas de células en división, que por medio de un manejo adecuado pueden formar nódulos vasculares y meristemoides, los cuales se encuentran localizados en las áreas periféricas superficiales o dentro del tejido, y que serian centros para la formación de meristemas apicales, primordios radiculares, o embriones incipientes (B. Alvarez 1988).

El cultivo del callo se puede dividir en las etapas siguientes:

- a) Inducción: en esta etapa las células del inoculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en numero como en tamaño,
- b) Proliferación celular: durante esta fase el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo,
- c) Inducción de la diferenciación: en esta fase se obtienen meristemas tanto apicales como radiculares, embrioides, tejido vascular, etc., a partir de la masa celular del callo,
- d) Envejecimiento y perdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

Cualquier tipo de órganos (raíz, tallo, hoja, flor) o tejido puede ser utilizado como materia inicial para la inducción de callo, un callo es básicamente un tejido tumoral mas o menos organizado, que generalmente surge sobre heridas de organos y tejidos diferenciados, se le llama inducción de callos al inicio de su formación, es posible la formación de callos con muchas especies diferentes, posteriormente los callos se cultivan en un medio diferentes y nos referimos a ellos como subcultivo de callos (Ayerbe mateo 1990)

Geiger y Rehuther 1981 y 1982). Pierik y sus trabajadores en 1974 desarrollaron un método de propagación de Anthurio para los cultivos de callos. En los primeros

experimentos de callos fueron iniciados sembrando embriones, posteriormente en otros trabajos los segmentos de hojas de plantas maduras fueron usadas como explantes, los callos son capaces de producir brotes adventicios y pueden ser obtenidos de una variedad de tejidos incluyendo espadices, espatas, pedúnculos, y los peciolos y laminas de hojas nuevas. Los explantes de espadices usualmente requieren ser transferidos a varios medios frescos antes de empezar a producir callos. También tienen una fuerte determinación floral y son sujetos a regenerar supuestos óvulos, estigmas, estambres y estilos durante algunas transferencias.

Las secciones cortadas de hojas nuevas son ahora mas comúnmente usadas en la micropropagación de Anthurio, en la mayoría de los genotipos estos explantes provienen de callos capaces de producir brotes adventicios cuando incuban en la oscuridad a 25 °C en un medio apropiado. (Geiger y Rehuther 1981 y 1982)

Los brotes adventicios etiolados se levantan y surgen espontáneamente de los callos primarios los cuales pueden ser subdivididos y subcultivados de nuevo en la oscuridad para obtener mas brotes. Si los callos son transferidos a la luz se producen brotes de apariencia normal. Los callos pueden ser también subdivididos en esta etapa para otra proliferación de brotes. En un medio normal los callos no son producidos por genotipos sensibles, o los callos se forman pero no se forman como brotes adventicios. (Geiger y Rehuther 1981 y 1982).

Leffring y Soede (1978). Para asegurar que la uniformidad de la planta permanece con limites aceptables, sugieren, que los brotes adventicios sean producidos por cultivos de callos que pueden ser subcultivados en un medio el cual permite el desarrollo de brotes axilares.

La combinación de la regeneración de brotes adventicios indirectos seguido por el cultivo de brotes, parece ser el método de micropropagación que ha sido mas usado en las practicas comerciales. (Leffring y Soede 1978).

11. ADAPTACION DE PLANTAS OBTENIDAS IN VITRO.

Una de las etapas que reviste gran importancia dentro de la técnica de propagación in vitro es el trasplante de las plantulas al suelo, así como la adaptación de estas al medio ambiente, lo cual se ha llevado a cabo con éxito en varias especies a través de numerosos intentos, deben considerarse para la aclimatación de las plantulas al medio ambiente, ya que estas difieren mucho en la fase de laboratorio, en los invernaderos y campo, siendo necesario que sean sometidas a un tratamiento de aclimatación para evitar la perdida de muchos propagulos valiosos. (Hurtado 1988)

11.1 FASE DE ACLIMATACION.

Durante la fase de aclimatación los cultivos deberán ser colocados durante una o dos semanas bajo un ambiente controlado, donde la intensidad luminica deberá de ser de 10 000 lux, tanto la temperatura como el fotoperiodo serán regulados de acuerdo a las necesidades del cultivo. (Hurtado 1988).

La plantula dentro del tubo de ensaye se encuentra bajo condiciones de esterilidad y con alta humedad relativa, la cual deberá reducirse eliminando el papel parafilm (si se usa) unos cinco días antes del trasplante al suelo, lo que dará a la planta mayor tolerancia a la baja humedad relativa del medio ambiente, facilitándole su posterior adaptación a condiciones autotrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, traslocaciòn y transpiración de agua. (Hurtado 1988).

11.2 FASE DE INVERNADERO.

Una vez efectuada la fase de aclimatación las plantas pueden ser transportadas y transplantadas en el invernadero, donde serán colocadas en un sustrato, proporcionándoles un buen sistema de drenaje y aireación para evitar el desarrollo de hongos y bacterias. (Hurtado 1988).

Algunas mezclas de sustrato que han dado buenos resultados en varias especies consisten de tierra de hoja mezclada en partes iguales con materiales cuya reacción es neutra como la vermiculita. Los sustratos pueden estar constituidos por otro tipo de materiales de sostén, antes de efectuar el trasplante es recomendable que el sustrato sea esterilizado en una autoclave a una temperatura de 121 °C por 30 a 60 minutos (dependiendo de la cantidad), esto reducirá la incidencia de patógenos, particularmente aquellos que causen la pudrición de la raíz (Hurtado 1988)

Las plantas deben de tener de dos a tres nudos y un sistema radicular desarrollado para poder ser transplantadas al suelo. Se colocan en macetas de PVC o vasos de unisel que contengan un sustrato ya esterilizado. Para realizar el trasplante los tubos de ensaye o los frascos de 150 ml se destapan totalmente y se sacan las plantas, debiendo lavarse cuidadosamente con agua deionizada, de manera que no quede agar adherido en las raíces. Las plantas son colocadas en las macetas, cuidando, que la raíz no sea dañada, una vez sembradas se riegan y se cubren con una bolsa de polietileno, que se podrá eliminar a los 15 días. (Hurtado 1988)

En el invernadero se recomienda tener un estricto control fitosanitario, particularmente en aquellos casos en donde el objetivo fundamental es la obtención de plantas libres de patógenos. Puede durar de 4 a 8 meses dependiendo de la respuesta particular de la planta. (Hurtado 1988)

11.3 NECESIDADES NUTRITIVAS.

Hurtado (1988). La planta de Anthurio es herbácea perenne y se encuentra cultivada hoy en día en forma terrestre debido a sus bellas flores y por su larga duración de la misma (27 días), puesto que queremos cultivarla debemos de proveer un medio de cultivo adecuado que se asemeje a las condiciones naturales en que crece, es decir que drene bien y que tenga una excelente aireación, así como condiciones artificiales naturales que proporcionen una sombra adecuada. El sustrato debe de tener las siguientes propiedades:

- ◆ Buena capacidad de retención de humedad
- ◆ Buen drenaje
- ◆ Que no se pudra
- ◆ Que no se colapse
- ◆ Que no tenga sustancias o elementos tóxicos
- ◆ Que sea económicamente disponible.

El vegetal deberá de nutrirse bien para un buen desarrollo, esto implica que los elementos esenciales o nutrimento para la vida del vegetal deberán estar disponibles en cantidades y balances adecuados. Se conocen hasta el presente como nutrimento al N,P,K,Ca,Mg,S,Fe,Cu,C,H,O, etc. El abastecimiento de agua debe de ser de buena calidad especialmente cuando el Anthurio se siembra en un sistema hidropónico y cultivo en sustrato inerte.

Jaramillo (1993). En estudios sobre fertilización para el Anthurio, generalmente se reporta el uso de fertilizantes complejos, es decir mezclas de N,P,K a diferentes dosis y sobre diferentes sustratos, es probable hacer una clasificación de los sustratos, teniéndose orgánicos e inorgánicos así como de los fertilizantes, siendo estos de lenta liberación y aquellos de alta solubilización. El abastecimiento nutrimental se puede hacer, además de la aplicación de fertilizantes líquidos, llamado también fertirrigación, o bien en soluciones nutritivas como el caso de cultivo en hidroponía o cultivo en sustratos inertes, pudiendo usarse la fórmula:

Macroelementos

mg/litro

◆ Nitrato de amonio	2
◆ Nitrato de potasio	4.3
◆ Nitrato de calcio	1.8
◆ Sulfato de potasio	1
◆ Sulfato de magnesio	1
◆ Acido fosfórico	1

Microelementos	PPM
◆ Quelato de fierro	5
◆ Sulfato de magnesio	0.6
◆ Sulfato de zinc	0.07
◆ Sulfato de cobre	0.07
◆ Acido bórico	0.6

11.4 FASE DE CAMPO.

El transplante a campo se recomienda realizarlo en días nublados y teniendo el suelo una humedad a capacidad de campo, la metodología del transplante a campo recomienda que una vez efectuado el transplante se aplique al suelo algún fertilizante comercial, el establecimiento de las plantas a condiciones de campo dura de uno a dos meses.

12. COSTO DE LA MICROPROPAGACION IN VITRO

El alcance en el cual la micropropagación puede ser practicada comercialmente esta limitada por el costo de la producción, si los usos en los cultivos en los cuales la ciencia puede ser aplicada son grandemente extensos, es vital que los costos de producción puedan ser disminuidos. Una estimación sugiere que una reducción del 50 % en costo promedio permitiría la expansión del mercado a mas de 10 veces del tamaño actual, y que por la disminución de los costos de producción del 90 %, el potencial del mercado llegaría a ser 1 000 veces mas grande que en el presente.(Levin y Vasil 1989)

El costo de micropropagación es influenciado por un numero de factores, muchos de los cuales dependen:

- ◆ El capital y los costos por arriba del laboratorio
- ◆ Costo de la mano de obra
- ◆ Costo del material
- ◆ Características in vitro de la planta a ser propagada
- ◆ Las perdidas involucradas en cada etapa del proceso de micropropagación
- ◆ El numero final de plantas requeridas y si la producción es un simple evento o es parte de un proceso continuo.

En la siguiente tabla se demuestra la manera en la cual se distribuye el dinero necesario para la colocación y el arranque de un laboratorio comercial de micropropagación, capaz de producir de 2 a 3 millones de plantas anualmente. Los costos han sido dados a conocer como gastos semanales y las facilidades de conversiones a un local actual que es independiente de la inflación, estos son dados a conocer en unidades arbitrarias, el valor de una unidad semejante puede ser deducida en la actualidad a un 20 % mas de incremento en el precio ya que estos valores que nos dan están para 1995 en que una unidad era igual a 5 dólares.

La tabla representa una distribución probable del costo en un país donde la mano de obra es cara, la comparación del costo de mano de obra y materiales serán diferentes en nuestro país en donde el salario es bajo.

En la tabla No. 3 se muestra un análisis hipotético del costo semanal de operación en un laboratorio de micropropagación capaz de producir cerca de 3 millones de plantas por años. Se ha asumido que hay 30 cámaras de flujo laminar cada una operada durante un simple cambio de 8 hrs por día durante 5 semanas.

Los costos son dados en unidades arbitrarias (una persona equivale al costo de emplear una técnica para trabajar en un gabinete por 40 minutos).

Los costos pueden también ser asignados como se indica en la columna

TABLA 3. Análisis hipotético del costo de un laboratorio de micropropagación.

Análisis de gastos	Tipo	Costos de Mano de obra				Costos totales	
	de	Horas de trabajo	Costo por	Costo por semana		Costos	
			hora	unidades	%		
costos	por semana	unidades				Semana	Unidades
Costos de capital: Depreciación y gastos de Prestamos de edificios y Equipos.	O					1635	27,3

Costos de salario.						
Trabajo de laboratorio:						
Subcultivos para prod. De Plantas.	D	1080	1,5	1620	42,4	
Iniciación de cultivos	D	120	2	240	6,3	
Transferencia de RyD, etc.	O	80	2,5	200	5,2	
Preparación y esterilización del medio.	D	80	2	160	4,2	
Calidad de seguridad	D	40	2,5	100	2,6	
Lavado y limpieza	D	80	1	80	2,1	
Transporte en el laboratorio	D	80	1,5	120	3,1	
Ampliación de cuartos de Trabajo.	D	80	1,5	120	3,1	
Invernadero y embarque.						
Plantar.	D	40	1,5	60	1,6	
Manejo de plantas						
Control de calidad	D	40	2	80	2,1	
Control de invernaderos	D	5	1,5	7,5	0,2	
Riego	D	25	1,5	37,5	1	
Aclimatización	D	10	1,5	15	0,4	

Envíos	S	400	1,5	600	15,7		
Oficina Administración							
Producción y planeación.	O	8	3	24	0,6		
Contabilidad	O	20	3	60	1,6		
Otros	O	12	3	36	0,9		
Rutina de oficina (maquinas Computadoras, teléfono.	O	40	1,5	60	1,6		
Mercadotecnia y ventas.	S	80	2,5	200	5,2		
TOTALES				3820	100	3820	63,8
Costos de funcionamiento Químicos consumibles Medios, esterilizantes, Fungicidas Reemplazamiento de	M O			71 25			

equipo					
Menor y					
mantenimiento.					
Combustible y utileria					
Electricidad	M		140		
Gas, agua	M		50		
Embalaje	S		20		
Mantenimiento de	O		50		
edificios					
Viajes, libros,	O		60		
software					
Impuestos	O		33		
Horarios comerciales	O		35		
y					
Gastos					
Contingencias	O		50		
TOTALES			534	534	8,9
GRAN TOTAL				5989	100

- Estos datos de costos son aplicados en 1995 donde una unidad equivale a 5 dolares.

El costo de la micropropagación es relativamente caro, pero los gastos son recuperados al momento de la cosecha, para esto tenemos que el Anthurio es comercialmente bien pagado por la producción prolongada de flores.

PRIMER AÑO PRODUCTIVO DESDE LA SIEMBRA DE LA PLANTA.

PRIMERA FLORACIÓN.

1 000 plantas 25 % en producción = 250 plantas

250 plantas x 6 flores anual = 1 500 entre 6 = 125 flores mensuales

125 flores – 5 % de merma = 118.75 flores

118.75 flores entre 12 (docena) = 9.90 docenas

9.90 docenas x \$15 = \$148.50

SEGUNDA FLORACIÓN.

1 000 plantas 50 % en floración = 500 plantas

500 plantas x 6 flores anual = 3000 entre 12 meses = 250 flores/mes

250 flores – 5 % de merma = 237.5 flores

237.5 flores entre 12 (docena) = 19.79 docenas

19.79 docenas x \$15 = \$296.87

TERCERA FLORACIÓN.

1 000 plantas 75 % en floración = 750 plantas

750 plantas x 6 flores anual = 4500 entre 12 meses = 375 flores/mes

375 flores - 5 % = 356.25 flores

356.25 flores entre 12 (docena) = 29.68 docenas

29.68 docenas mini x \$15 = 445.31.

CUARTA FLORACIÓN.

1 000 plantas 100 % en floración = 1000 plantas

1 000 plantas x 6 flores anual = 6 000 entre 12 meses = 500 flores/mes

500 flores – 5 % = 475 flores/mes

475 flores entre 12 (docena) = 39.58 docenas

39.58 docenas mini x \$15 = \$593.75

LA PRODUCCION SE NORMALIZA EN EL ULTIMO TRIMESTRE DEL AÑO
DESPUES DE SEMBRAR LA PLANTA.

Floración al 100 %

475 flores mensuales = 39.58 docenas

39.58 docena flor chica x \$40 = \$1 583.20

SEGUNDO AÑO PRODUCTIVO DESDE LA SIEMBRA DE LA PLANTA.

PRODUCCION PRIMER TRIMESTRE.

500 flores 75 % chica = 375 flores – 5 % de merma = 356.5

25 % med. = 125 flores – 5 % de merma = 118.75

356.25 flores entre 12 (docena) = 30.43 docenas x \$40 = 1 217.50

118.75 flores entre 12 (docena) = 9.89 docenas x \$60 = 593.75

\$ 1 811.25

x 3 meses

\$ 5 433.75

PRODUCCION SEGUNDO TRIMESTRE.

500 flores 50 % chicas = 250 flores –5 % de merma = 237.5 flores
50 % med. = 250 flores –5 % de merma = 237.5 flores

327.5 flores entre 12 (docenas) = 19.79 docenas x \$40 = \$ 791.60

237.5 flores entre 12 (docenas) = 19.79 docenas x \$60 = \$1 187.40

\$ 1 979.00

x 3 meses

\$ 5 937.00

PRODUCCION TERCER TRIMESTRE.

500 flores 25 % chica = 125 flores –5 % = 118.75 flores
50 % med. = 250 flores –5 % = 237.50 flores
25 % gde. = 125 flores – 5 % = 118.75 flores

118.75 entre 12 (docena) = 9.89 x \$40 = \$ 395.60

237.50 entre 12 (docena) = 19.79 x \$60= \$1 187.40

118.75 entre 12 (docena) = 9.89 x \$80= \$ 791.20

\$ 2 374.20

x 3 meses

\$ 7 122.60

PRODUCCION CUARTO TRIMESTRE.

500 flores 50 % med. = 250 flores -5 % = 237.50 entre 12 = 19.79
25 % gde. = 125 flores -5 % = 118.75 entre 12 = 9.89
25 % extra 125 flores -5 % = 118.75 entre 12 = 9.89

19.79 docenas x \$ 60 = \$ 1 187.40

9.89 docenas x \$ 80 = \$ 791.20

9.89 docenas x \$95 = \$ 939.55

\$ 2 918.15

x 3 meses

\$ 8 754.45

TERCERA FASE DE PRODUCCION.

500 flores 50 % gde. = 250 flores -5 % = 237.50 entre 12 = 19.79

50 % ext. = 250 flores -5 % = 237.50 entre 12 = 19.79

19.79 docenas x \$80 = \$ 1 583.20

19.79 docenas x \$95 = \$ 1 880.05

\$ 3 463.25

CONCLUSIONES.

La mejor técnica de propagación in vitro en Anthurium es la de cultivo de callo seguida de un subcultivo de brotes, esta es la que en la actualidad ha dado mejores resultados.

Esta técnica de propagación es muy rentable ya que aparte de obtenerse un mayor número de plantas en un periodo de tiempo corto, están libres de patógenos y enfermedades, además de que esta ornamental genera mucha mano de obra y acarrea divisas a nuestro país por la exportación que se tiene de esta especie.

Los costos de producción son un poco altos y se requiere de mucho esfuerzo y cuidado para llevarla a cabo, pero los resultados finales son satisfactorios y los costos de producción quedan muy por debajo de las ganancias, ya que esta especie es muy cotizada en los mercados extranjeros.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ayerbe Mateo L.S. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Editorial Mundi Prensa. Madrid España.
- A. Barba Alvarez. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. Edit. Trillas. México.
2. Ball V. 1991. In ball red book (V. Ball ed.)Geoj. Ball. Inc; West Chicago Illinois.
3. Bidwell R.S. 1979. Fisiologia Vegetal. AGT Editor. México.
4. Criley R.A. 1985. Anthurium In; Havelly, A.H. CRC Handbook of flowering. Vol. 1 CRC PRESS, Inc. Boca Raton, Florida, USA.
5. Croat T.B. 1983. A revision of the genus Anthurium (Araceae) of México and Central America. Annals of the Missouri Botanical Garden.
6. Devlin R.M. 1980. Fisiología Vegetal. Edit. Omega. Barcelona España.
7. Gallaga López Salvador. 1995, 1997. Información de Anhurium andreanum. Centro de capacitación agropecuaria y forestal. Ac. México.
8. Geir T.B. 1982. Morphogenesis and plant from spadix fragment of Anthurium Sherzerianum cultivate in vitro. Fed. Republic of Germany. Plant Tissue and cell culture.
9. George E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2nd. Edition. Exegetics limited England.
10. Hernández Torres J. Y Ruíz Sanchez M.D. 1993. Informe de servicio social en cultivo de tejidos vegetales. UAAAN.

11. Higaki T. Et-al. 1984. A study of some morphological and anatomical aspects of *Anthurium andreanum* L. University of Hawaii at Hilo. Research series 030.
12. Higaki T y Watson D.P. 1972. *Anthurium* culture in Hawaii University of Hawaii. Cooperative Extension Service Circular 420.
13. Hurtado y Merino M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Edit. Trillas. México.
14. Iwata R. Y Tang y Kamemoto H. 1985. Concentration of anthocyanins affecting spathe color in *Anthuriums*. J. Amer. Soc. Hort. Sci 110 (3)
15. Jaramillo P. 1993. Cultivo y actividades para un buen manejo de laboratorio e invernadero. LBI S.A. Michoacán México.
16. Knauss J.F. and Knauss M.E. 1980. Contamination in plant tissue cultures. Proc. Fla. State Hort. Soc. 92
17. Kunisaki J.T. 1980. In vitro propagation of *Anthurium andreanum* L. Hort. Science 15.
18. Lankin et-al. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet 60.
19. Levin R. And Vasil L.K. 1989. Progress in reducing the cost of micropropagation. IAPTC Newsletter 59
20. Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann Rev. Plant Physiol 25.
21. Pierik R.L.M. 1987. Department of horticulture agricultural University, wagheningen, the Netherlands.

22. Quinteros Ramirez R. 1985. Prospectiva de la biotecnología en México. CONACYT. Fundación Javier Borros Sierra A.C.
23. Reuther G. 1982. Adventitious organ formation and somatic embryogenesis in callus. Acta Hort. 78.
24. Roberto L. M. Y Loyola V.M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACYT. México.
25. Thorpe T.A. 1980. Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press. New York, London. Toronto, Sydney.
26. Van der Meijs y Pierik 1980 y 1991. Vegetative propagation of horticultural crops by tissue culture. Zaadbelangen 34.
27. Wang A.S. 1987. Process for generating corn.
28. Weaver M.L. et-al. 1990. Nonenzymatic release of intact protoplasts from mature pollen of bean J. Am Soc. Hort. Sci. 115.