



Nova Scientia

E-ISSN: 2007-0705

nova_scientia@delasalle.edu.mx

Universidad De La Salle Bajío

México

Mireles-Ordaz, Julieta; Arellano-Perusquia, Abraham; Espinal-Centeno, Annie; Sánchez-Segura, Lino; Estrada-Luna, Andrés Adolfo; Cruz-Ramírez, Alfredo

Reprogramación celular de embriones de *Anthurium andraeanum* por fitohormonas para micropropagación masiva

Nova Scientia, vol. 7, núm. 15, 2015, pp. 49-67

Universidad De La Salle Bajío

León, Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203342741004>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Revista Electrónica Nova Scientia

Reprogramación celular de embriones de
Anthurium andraeanum por fitohormonas
para micropropagación masiva
Hormonal cell reprogramming of *Anthurium
andraeanum* embryos for massive
micropropagation

**Julieta Mireles-Ordaz¹, Abraham Arellano-Perusquia²,
Annie Espinal-Centeno¹, Lino Sánchez-Segura³, Andrés
Adolfo Estrada-Luna^{2,3} y Alfredo Cruz-Ramírez^{1,2}**

¹Complejidad Molecular y del Desarrollo, U.G.A.-LANGEBIO-CINVESTAV-
Irapuato, Guanajuato

²Escuela de Agronomía, Universidad De La Salle Bajío, León, Guanajuato

³Departamento de Ingeniería Genética, Unidad Irapuato, CINVESTAV-Irapuato,
Guanajuato

México

Alfredo Cruz-Ramírez. E-mail: lacr1973@yahoo.com.mx

Resumen

El género *Anthurium* incluye alrededor de 800 especies, las cuales son originarias de diversos países tropicales y subtropicales de América. Numerosos cultivos de estas especies de *Anthurium* son crecidos y comercializados debido a su gran popularidad como plantas ornamentales alrededor de todo el mundo, de las cuales la más popular es *Anthurium andeanum*. La reproducción sexual de estas plantas en invernaderos es difícil y toma mucho tiempo, lo cual representa una desventaja para su producción masiva y comercialización. La micropropagación *in vitro* ha emergido como una opción para sobrellevar dicha desventaja, hasta la fecha se han logrado avances parcialmente exitosos en la micropropagación en especies de *Anthurium* usando varios tejidos como explantes iniciales, incluyendo hojas, pecíolo, espádice, espata, brote lateral, meristemo apical y embriones somáticos, estos últimos previamente inducidos a partir de tejido diferenciado. Sin embargo, hasta ahora no hay reportes del uso de embriones cigóticos como tejido madre para la propagación masiva de estas plantas. En el presente estudio reportamos la formación de callos organogénicos a partir de embriones cigóticos inmaduros crecidos en medio MS suplementado con la combinación de 2 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) y 0.5 mg/l de 6-benzilamino-purina (BAP). Los resultados obtenidos demuestran que los embriones en proceso de desarrollo son altamente eficientes como explantes de origen para inducir la formación de tejido calloso de una manera rápida y fácil, dando en promedio 9 brotes por callo y logrando una taza de sobrevivencia de las plantas del 90% en la fase de aclimatación.

Palabras clave: Inducción de callo, reprogramación celular, embriones, Anturio, fitohormonas

Recepción: 29-01-2015

Aceptación: 28-07-2015

Abstract

The *Anthurium* is a plant genus belonging to the Araceae that comprises up to 800 species, which are native of an extensive tropical and subtropical area including several countries in America. Various species of *Anthurium* are grown and commercialized as potted plants, for landscaping or to produce flowers due to its great popularity as ornamental plants all over the world, from which

the most popular is *Anthurium andraeanum*. Sexual reproduction of these plants faces several challenges including slow growth rates and the production of heterogeneous materials which represents a disadvantage for its massive production and commercialization. Therefore, *in vitro* micropropagation has become an option to overcome such disadvantages, so far partially successful micropropagation approaches of *Anthurium* species have been achieved by using various tissues as initial explants, including leafs, petioles, spadix, spathe, lateral buds, shoot meristems and somatic embryos, the former previously induced from differentiated tissue. However, up to date there is no report using zygotic embryos as a source tissue for massive propagation. In this study, we report calluses formation from immature embryos cultured in MS medium supplemented with a combination of 2 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and 0.5 mg/L of 6-benzylaminopurine (BAP). The results show that the embryos are highly efficient as explants to induce callus formation in a fast and easy manner, giving on average 9 plants per callus and having a 90% of survival after acclimatization.

Keywords: Callus induction, cell reprogramming, embryos, *Anthurium*, phytohormones

Introducción

El anturio (*Anthurium andraeanum*) es una especie vegetal perteneciente a la familia Araceae que produce atractivas y llamativas inflorescencias, las cuales tienen una vida de pos cosecha prolongada de 15 a 20 días en florero, lo cual es una gran ventaja con respecto a otras especies que son requeridas en el mercado de las plantas ornamentales. Las características antes descritas favorecen la preferencia y demanda de los anturios, los cuales después de las orquídeas, se han convertido en las especies tropicales más valoradas y comercializadas en el planeta (Atak, 2009), por lo que en varios países como Holanda, Venezuela, Jamaica, Estados Unidos, y Las Islas Mauricio son considerados como los principales productos de explotación dentro de la industria florícola. Estados Unidos y Holanda son los principales productores de anturios en el mundo, siendo *Anthurium andraeanum* la especie más cultivada y de la cual se han liberado innumerables genotipos comerciales. Dentro del grupo de plantas ornamentales tropicales, los anturios destacan por su potencial comercial en México, ya que además de las ganancias superiores que se obtienen por los atractivos precios de venta, algunas regiones del sureste poseen las condiciones climáticas óptimas para su cultivo.

Se han reportado diversos métodos de propagación del anturio, como la segmentación de plantas, esquejes o “chupones” del rizoma (Trujillo *et al.*, 2000), la propagación por acodo e incluso la propagación sexual por semilla, los cuales resultan lentos y poco costeables para el productor (Geier, 1986).

Debido a la creciente demanda de anturios en el mercado mundial y a que los métodos de propagación han mostrado diversas desventajas en tiempo y costo (Trujillo *et al.*, 2000), la propagación *in vitro* por cultivo de tejidos representa una estrategia viable para obtener un gran número de plantas en un lapso de tiempo menor, además de permitir el control de la variabilidad genética y de patógenos virales, bacterianos y hongos en las plántulas generadas (Ruiz, 2000). La propagación clonal *in vitro* o micropropagación se ha utilizado ya con éxito para el anturio (Pierik *et al.*, 1974; Pierik, 1997). Desde el establecimiento de las primeras técnicas para la multiplicación, diversos grupos han innovado en el procedimiento (Kunisaki, 1980; Geier, 1986; Teng, 1997; Chen *et al.*, 1997; Joseph *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2004; Yixun *et al.*, 2009).

La micropropagación es un proceso asexual de multiplicación de plantas en el cual, a partir de secciones relativamente pequeñas de tejidos u órganos cultivados en condiciones

asépticas y artificiales, se induce la formación de brotes para regenerar una planta completa o sólo alguna parte de ella. La organogénesis puede clasificarse en directa e indirecta; en la organogénesis directa se produce una estructura organizada que puede ser un brote o raíz en ausencia de la formación de un callo. En la organogénesis indirecta se forma un órgano a partir del callo generado por el explante. Los callos también pueden ser inducidos a través del uso apropiado de una relación de fitohormonas, básicamente auxinas y citocininas (Meyerowitz *et al.*, 2011; Yun-gui Guo y Miao Luo, 2012; Li-li Zhou *et al.*, 2012; Behnam Sedaghati *et al.*, 2012). La diferencia entre el desarrollo del fenómeno de organogénesis directa o indirecta depende de la cantidad empleada de hormonas en el cultivo del explante utilizado, el cual pueden ser cualquier órgano, tejido o sección de hoja, hipocótilo, epicótilo, raíces, grano de polen, óvulos y el embrión (Geier, 1990).

En la organogénesis indirecta se originan los brotes y raíces a partir de las células de los callos (Ruiz, 2000; Mojtaba *et al.*, 2012; Chayanika *et al.*, 2015). La inducción de la formación de un callo en condiciones controladas es una etapa crucial, ya que implica la reprogramación de las células que pertenecen a un tejido diferenciado para regresar a un estado des diferenciado y con alta capacidad proliferativa. Después de la des diferenciación, las células se empiezan a dividir rápidamente bajo la influencia de reguladores de crecimiento, lo que da lugar al callo (Ruiz, 2000; Mojtaba *et al.*, 2012; Chayanika *et al.*, 2015).

Actualmente, este proceso de regeneración indirecta *in vitro* de anturio (mediada por producción de callo) podría ser una alternativa rápida y eficiente que permite la obtención de plantas sanas, es decir libres de bacterias u hongos y asegurar un fenotipo estable evitando la fertilización cruzada y la variabilidad genética. Además, constituye una alternativa para la producción masiva de plantas (Oscullo-Avila, 2011).

En este trabajo reportamos la formación de órganos (en su mayoría brotes) a partir del cultivo de embriones inmaduros aislados de anturio a través de la inducción de organogénesis directa e indirecta, su enraizamiento y aclimatación. Observamos que el fenómeno de organogénesis directa se da en menor proporción, pero bajo las condiciones ambientales experimentales establecidas también se induce el rompimiento de latencia de yemas axilares y su activación para la formación de brotes y raíces. Nuestros resultados indican que es posible inducir la reprogramación celular mediada por fitohormonas en embriones de anturio como una nueva alternativa para la propagación de ésta especie recalcitrante. Estos avances representan un método

novedoso con gran potencial en la propagación *in vitro* de *Anthurium andraeanum*, que implica diversas ventajas como la obtención de callo en menor tiempo que algunos de los reportados anteriormente y un porcentaje de contaminación casi nula.

Métodos

Material vegetativo y preparación del explante

En el presente estudio se utilizaron plantas adultas de *Anthurium andraeanum* como donadoras de explantes (Figura 1A). Los embriones provenientes de frutos en diferentes estadios de maduración fueron separados del espádice (Figura 1B y 1C) y empleados como explantes iniciales.

Una vez que los frutos fueron cuidadosamente removidos del espádice (Figura 1D), se sometieron a un tratamiento de desinfección superficial para minimizar la contaminación causada por hongos y bacterias. Durante el tratamiento, los frutos fueron inmersos en una solución de cloro comercial al 20% por 15 min y enjuagados tres veces con agua destilada esterilizada (dos minutos por enjuague). Enseguida, los frutos fueron abiertos para sacar las semillas (Figura 1D), las cuales fueron inmersas en una solución de cloro comercial al 20% por 10 min para su desinfección y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada (un minuto por enjuague). Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar.

Después del tratamiento de desinfección, el fruto fue colocado en la tapa de una caja Petri estéril y disectado con un bisturí, las capas de la semilla fueron cuidadosamente removidas para exponer y aislar al embrión (Figura 1E). Los embriones fueron cultivados en medio de inducción de callo (Figura 1F).

Medios de cultivo e inducción de callo

Para la inducción de callo se usó medio MS (Phytotechnology Laboratories) adicionando 9 g/l de agar (Phytotechnology Laboratories), el pH fue ajustado a 5.8 y esterilizado en autoclave a 121 °C, 15KPa por 20 min. Al medio se le adicionó una combinación de 2 mg/l de ácido 2,4 diclorofenoxyacético (2,4-D) (Phytotechnology Laboratories) y 0.5 mg/l bencil-aminopurina (BAP) (Phytotechnology Laboratories).

Cuatro embriones fueron cultivados en cada caja Petri que contenían el medio antes descrito. Como control negativo los embriones se cultivaron en medio MS sin fitohormonas. Cada tratamiento estuvo representado por diez repeticiones, los cultivos fueron colocados en el cuarto de cultivo a 25 °C con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Organogénesis directa e indirecta

Para la obtención de brotes (aéreos y/o raíz) de los callos formados los cultivos se llevaron a cabo en el medio MS con las mismas concentraciones de fitohormonas y se mantuvieron bajo las condiciones previamente descritas en el cuarto de cultivo. Se subcultivó en medio fresco cada 2 semanas para evitar el envejecimiento y muerte de los callos o brotes.

Procesamiento histológico

Algunos callos regenerados fueron seleccionados para realizar el estudio histológico, por lo que fueron disectados y extraídos del medio de cultivo y fijados en una solución de formaldehído/ácido acético (glacial)/Agua (FAA) (Sigma Aldrich, 2015) durante 12 h. Las muestras fueron posteriormente lavadas 3 veces con una solución tampón de fosfato 0.1 M a pH 7.2 y se deshidratadas a través de una serie gradual de soluciones - hidroetanolicas de 40% a 90% durante 30 min en cada etapa –en condiciones de temperatura ambiente. En la ultima concentración, correspondiente a etanol absoluto (100%), las muestras se incubaron durante toda la noche (12 h) posteriormente se transfirieron a soluciones graduales de etanol-xilol, en proporciones de 2:1, 1:1 y 1:2, incubándose 1 h en cada etapa y finalmente se transfirieron a xilol puro durante 3 h para finalmente ser incluidas en Paraplast® a 60 °C. Las muestras se colocaron en moldes de plástico para formar bloques histológicos. Se realizaron- cortes histológicos de 10 µm de grosor mediante el uso de un microtomo (LKB, Suecia).

Los cortes histológicos fueron desparafinados en horno de microondas (LG, Corea) durante 30 segundos a una potencia de 1500 W y lavados en xileno absoluto (100%) durante 5 min y posteriormente en series graduales de etanol-xileno (1:2, 1:1, 2:1) durante 5 min. Los tejidos se rehidrataron en soluciones graduales de etanol de 100% a 50%, incubándose 3 min durante cada etapa, posteriormente fueron contrastados con azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich, 2015) disuelto en una solución hidroetanolica al 50% y montadas de forma permanente en resina Entellan (Merck, 2015).

De forma paralela en un corte histológico se realizó la tinción con 4 ',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para visualizar el núcleo celular. Esta muestra fue procesado a través de la técnica de recuperación de tejidos (Ruiz-Herrera *et al.*, 2015); en el que la parafina fue removida a 60 °C por 15 min y posteriormente fue transferido en xileno absoluto (100%) y series graduales de etanol-xileno (1:2, 1:1, 2:1) durante 5 min. Los cortes histológicos se rehidrataron en soluciones de etanol de 100% a 20%, incubándose durante 3 min en cada etapa; posteriormente se transfirieron a agua destilada durante 15 min. Los cortes histológicos se transfirieron a un horno de recuperación de epitopos, Retriever 2100 (Prestige Medical, 2014) y embebidos en tampón de desenmascaramiento a base de citratos a pH 6.0 (Vector Lab., 2011) con las siguientes condiciones 120 °C y presión de 1.2 kg/cm² durante 15 min; posteriormente se enfriaron en hielo. Las muestras se lavaron en agua destilada y se incubaron durante 30 min en una solución de DAPI (Sigma Aldrich, 2015) a una concentración de 10 mg/ml e incubados en oscuridad y humedad ambiental controlada. Posteriormente las muestras se lavaron con agua desionizada y secaron. Finalmente, a los cortes se montaron en medio para fluorescencia, Fluoroshield® (Sigma Aldrich, 2015).

La observación de las muestras se realizó en un microscopio (BX50, Olympus, Japón) utilizando objetivos de 4X/0.10 Plan ($\alpha = -$) y 20X/0.50, UPlan-FL ($\alpha = 0.17$) acoplado a una cámara de alta sensibilidad para fluorescencia (Infinity3, Lumenera, Canadá). Las imágenes de ambas tinciones fueron fusionadas y creadas usando el programa Image Pro Premier 9.1 (Media Cybernetics, EUA).

Microscopía Electrónica de Barrido de Presión Variable (VPSEM por sus siglas en inglés)

La morfología de callos de *Anthurium andraeanum* fue examinada a través de VPSEM (EVO LS40, Zeiss, Alemania), acoplado a una platina peltier con rango de temperatura de -25 °C a 50 °C a 50 Pa con temperatura ambiente de 17 °C (Deßen EVO® XVP® Coolstage, Reino Unido), la muestra fue fijada a la platina mediante una cinta de carbono de doble cara. En todos los experimentos se mantuvieron las siguientes condiciones de operación, alta tensión (EHT) 25 kV, Fil I Target 2.508 A, distancia de trabajo 20 mm y Spot Size de 600 ± 5. Las micrografías fueron capturadas a 800X, 200X, 164X y 1.00KX de magnificación y con una resolución de 1024x768 píxeles en escala de grises. En este formato, se asignó una escala de grises con 0 para el negro y 255 para el blanco.

Estereomicroscopía

Todas las actividades relacionadas con la disección, corte y toma de fotos de embriones, callo, brotes que no necesitaron observaciones celulares y subcelulares fueron realizadas y registradas con un estereomicroscopio LEICA EZ4HD.

Enraizamiento

Los brotes regenerados a partir del tejido calloso que alcanzaron un tamaño aproximadamente de 1 cm se separaron del resto para transferirlos en frascos de vidrio con medio MS carente de fitohormonas para su enraizamiento y elongación y se incubaron en el cuarto de cultivo con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad a una temperatura de 25 °C.

Aclimatación en suelo

Una vez que los brotes desarrollaron raíces, las plantas con un tamaño aproximado de 3 cm se transfirieron a charolas con sustrato comercial PRO-MIX compuesto por musgo, perlita y piedra caliza para su adaptación y crecimiento en cuarto de crecimiento a 24 °C con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Resultados

Inducción de callo y organogénesis a partir de embriones

Con el fin de evaluar la inducción de reprogramación celular inducida por fito hormonas en embriones de *Anthurium adraeanum*, aislamos (Figura 1A-F) y cultivamos dichos embriones en medios de cultivo adicionado con combinación de auxinas y citocininas y en ausencia de ellas. Nuestros resultados muestran que, como se observa en la Tabla 1, los embriones cultivados en medio MS carente de fitohormonas no sufrieron reprogramación celular, por lo tanto no se indujo des diferenciaron de las células del embrión para la formación de tejido tipo callo. De los diez embriones disectados y cultivados el 90% de ellos germinó y cada uno produjo una plántula.

En cambio en el medio MS con fitohormonas, el 100% de los treinta y cuatro embriones utilizados en 10 réplicas, formaron callo con las concentraciones utilizadas de BAP y 2,4-D descritas en el apartado de Materiales y Métodos. De éstos, ocho produjeron callo (23.52 %),

mientras que los otros veintiséis (76.47 %) primero formaron callos y después llevaron a cabo la organogénesis regenerando brotes y raíces después de veinticinco días de cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de las fitohormonas en la formación de callos y producción de brotes adventicios a partir de embriones de *Anthurium andraeanum* después de 70 días de cultivo.

	Medio MS sin fitohormonas	Medio MS con fitohormonas
Número de explantes analizados	10	34
Número de explantes que formaron callo	0	34
Número de callos que llevaron a cabo la organogénesis	0	26
Número de embriones germinados	9	0

Para observar el proceso de des diferenciación, re-diferenciación, morfogénesis en los embriones con mayor detalle, decidimos registrar en diferentes tiempos los cambios fenotípicos ocurridos en los embriones tras el tratamiento con fitohormonas desde el día cero hasta que se formaron brotes de tallo maduros. A partir de los primeros veinticinco días después de la siembra (DDS) se observó la formación de callo en los treinta y cuatro embriones transferidos a medio MS con fitohormonas (Figura 2). Después de la diferenciación y crecimiento de los callos, éstos se subcultivaron en medio MS con las mismas concentraciones de fitohormonas cada diez días. Al cabo de sesenta días de cultivo (seis subcultivos), se observó que sólo veintiséis callos fueron inducidos al fenómeno de organogénesis. A los ochenta y cinco días después de la siembra (ocho subcultivos), se logró observar dos respuestas organogénicas en los callos: la diferenciación de brotes adventicios y la aparición de primordios de raíces adventicias por cada callo. Cuando los brotes alcanzaron un tamaño de entre 1 y 2 cm, se separaron del callo para cultivarse en medio MS sin fitohormonas para su enraizamiento, posteriormente fueron trasplantados para su aclimatación y crecimiento en suelo.

Los embriones cultivados en medio MS sin fitohormonas solamente germinaron durante el tiempo de cultivo (Figura 2), dando lugar al desarrollo del sistema radical y el brote. Durante los días consecuentes la plántula mostró un crecimiento activo paulatino alcanzando un tamaño aproximado de 2 cm hasta el primer subcultivo, en los siguientes subcultivos prosiguió el crecimiento normal de la plántula, la cual produjo varias hojas y raíces.

La Tabla 2 muestra los datos obtenidos al final de los subcultivos. De los 26 callos obtenidos que mostraron organogénesis se obtuvieron 248 brotes en el medio MS suplementado

con fitohormonas (9.54 brotes en promedio por callo), de los cuales 121 produjeron raíces (48.795%) y 127 no (51.21%). El promedio de brotes nuevos por brote subcultivado fue de 4.88 y el promedio de raíces por brote subcultivado fue de 4.65.

Tabla 2. Brotes y raíces de *Anthurium andraeanum* regenerados por nuevos brotes a partir del cultivo de embriones en medio MS con fitohormonas.

Organogénesis	Número de brotes (de 26 callos formados)	Promedio/callo
Brote	127	4.88 ± 1.30
Raíces	121	4.65 ± 1.70

Reprogramación celular en embriones induce organogénesis directa e indirecta.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con fitohormonas es capaz de inducir reprogramación celular de tejidos del embrión inmaduro de *Anthurium andraeanum*. Si bien el resultado final es la organogénesis de brotes, se observaron dos tipos de procesos que dieron origen a dichos brotes.

Con el fin de determinar si en todos los casos se trataba de organogénesis indirecta a partir de callo, realizamos seguimiento de los explantes en tratamiento y observamos que los nuevos órganos provenían de dos eventos distintos: i) El tratamiento logró inducir la formación de brotes a través de la activación de yemas axilares pre-existentes en el embrión cigótico germinado durante el cultivo en presencia de hormonas. Un claro ejemplo de esto se muestra en la Figura 3, donde se puede observar tejido calloso formado en la base del tallo del embrión cigótico (Figura 3A). Sin embargo los primordios de órganos nuevos no emergen de dicho tejido sino de yemas axilares que han salido de latencia o quiescencia debido al tratamiento con hormonas (Figura 3B y C) ii) El mismo tratamiento propició la reprogramación del tejido del embrión en tejido calloso (Figura 4A), que con el paso del tiempo y los subcultivos iniciaron la formación de múltiples primordios de brotes que iniciaron la síntesis de clorofila (Figura 4B) y se diferenciaron en brotes en distintas etapas de desarrollo (Figura 4C y D), y finalmente se desarrollaron en tallos jóvenes (Figura 4E) que se disectaron para llevar a etapa de enraizamiento y aclimatación como se describe más adelante en este trabajo.

Los resultados obtenidos hasta ese momento sugerían, por fenotipos macroscópicos y observaciones con estereomicroscopía, que el tratamiento hormonal inducía diversos eventos de reprogramación celular que resultaban, en su mayoría, en organogénesis indirecta. El primer

indicador de reprogramación celular evidente es la composición del callo, el cual de ser tejido diferenciado que sintetiza clorofila se convierte en una población heterogénea de células con alta actividad proliferativa que no sintetiza clorofila, como lo indica su color. Estos fenotipos son evidencia clara de un proceso de des-diferenciación celular como puede observarse por estereoscopía microscópica (Figura 2, Figura 4A) o por microscopía electrónica de barrido (Figura 5A-B).

En nuestros experimentos observamos que, en la mayoría de las veces, los callus son una población de células mayormente desdiferenciadas (Figura 2, Figura 4A, Figura 5A-B) y con el paso del tiempo empezaban a desarrollar estructuras similares a primordios de hojas o a meristemos apicales de tallo que sintetizan clorofila (Figura 4B-E, Figura 5 C-D). Esto es indicativo claro de otro evento de reprogramación celular, pues las células inician un proceso de rediferenciación en tejido fotosintético con clara similitud a un brote. Incluso muestra diferencias en la superficie cuando lo comparamos, por microscopía electrónica de barrido, con callus compuestos por una población de células mayormente desdiferenciadas (Comparar Figura 4A-B con Figura 4C-D). El callo, al ser una población de células en distintos estadios de proliferación y diferenciación cuenta con regiones o subpoblaciones de células con diferentes programas, un fenómeno que depende de la concentración de hormonas en el medio, la distribución de las mismas en el interior del callo y el tiempo de cultivo en medio de inducción.

Con el fin de observar los distintos programas celulares que pueden conformar a un mismo callo, realizamos cortes de tejido y se trataron con tinciones para evidenciar actividad metabólica, proliferación celular y morfología. Para esto, se usó azul brillante de Coomassie R-250 que permite visualizar la cantidad de proteínas y la presencia de éstas, a su vez, se relacionan con actividad proliferativa. La misma sección se tiñó con 4 ',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), un compuesto que se une a Timina y Adenina en el ADN y permite observar los núcleos de las células en el callo e identificar poblaciones celulares en estado proliferativo.

En la Figura 6 mostramos la reconstrucción de un corte de un callo teñido con DAPI (Panel A), con azul de Coomassie (Panel B) y la sobreposición de ambos (Panel C). Las flechas blanca y roja en el panel A señalan sólo un par de las múltiples regiones con poblaciones de células con alta señal de DAPI, en el panel B podemos observar que la señal de azul de Coomassie es también alta en esas regiones y cómo dichas regiones sobrelapan perfectamente en el panel C. Estos resultados sugieren que dichas regiones están compuestas por poblaciones de células con alta actividad proliferativa. También observamos regiones de ausencia de ambas

señales, lo cual sugiere que en dichas poblaciones celulares, que no se dividen activamente, el programa celular es distinto.

Al hacer una amplificación de una región en particular (Figura 6D) podemos observar claramente como al lado de una población celular con alta señal de ambos colorantes y cuyas células son más pequeñas, todos indicadores de proliferación (Figura 6D flecha blanca), coexiste una población de células más grandes y que no muestran señal de DAPI o azul de Coomassie (Figura 6A y D, flecha azul y Figura 6B). Una amplificación aún mayor en una zona con alta señal de DAPI nos permitió observar células que se encuentran en distintas etapas de la mitosis (Figura 6E, flechas amarillas).

Otro indicativo claro de reprogramación celular que pudimos observar en esta misma sección de callo es una estructura en forma de corazón (Flechas rojas en Figura 6AyB) similar a primordios nuevos como los observados en la Figura 4. Al hacer una amplificación de dicha estructura, tanto en las tinciones con DAPI como con azul de Coomassie, observamos que hay distintos tipos celulares (Figura 6F y G). Si bien pueden observarse células pequeñas con alta señal de ambos colorantes, también hay células adyacentes de mucho mayor tamaño, con una morfología distinta y que parecen tener gránulos de almidón que no tiñen para ninguno de los dos colorantes (Flechas verdes en Figura 6F y G).

Los resultados antes descritos indican de manera contundente que el tratamiento hormonal utilizado induce un primer evento de reprogramación, evidenciado por la formación de callos. También indican que el callo no es una población de células uniforme, sino que coexisten en él distintas poblaciones celulares con diferentes programas que, al final del tratamiento, diferenciarán en primordios de hojas o estructuras similares a meristemos de apicales de brotes que darán origen a los brotes maduros, los cuales hemos descrito previamente en este trabajo.

Enraizamiento de brotes y desarrollo de plantas de *Anthurium adraeanum* regeneradas *in vitro*.

Con el fin de evaluar la viabilidad de los brotes regenerados *in vitro* (Figura 7A), se disectaron y transfirieron a medio para inducir formación de raíz (Figura 7B), una vez obtenidas plantas completas se transfirieron a medio MS sin fitohormonas para permitir el establecimiento de las plantas (Figura 7C). Con un sistema radical bien desarrollado, se continuó a la etapa de trasplante a sustrato para aclimatación a condiciones de cámara de crecimiento (Figura 7D) y tras esta etapa se transfirieron a invernadero (Figura Sup. 1).

En la Tabla 3 se muestran los datos de sobrevivencia de las plantas después de la aclimatación a las condiciones *in vivo* y el trasplante a suelo. En general, los datos muestran que después del periodo de aclimatación las plantas reactivaron su crecimiento y como resultado de esto se observó un incremento en el número de hojas y en el tamaño de la parte aérea de las plantas.

Tabla 3. Resultados obtenidos de la etapa de enraizamiento y aclimatación en suelo de las plantas regeneradas de *Anthurium andraeanum*.

	Enraizamiento (Medio MS)	Aclimatación (Suelo)
Altura de la plántula (cm)	3.14	4.3
Número de hojas	2.28	4.04
Sobrevivencia	80%	90%

La eficiencia en la formación de callos a partir de embriones fue del 100% y se obtuvieron en promedio 5 plantas en el 77% de los callos. El 80% de los brotes formaron raíces en medio MS sin fitohormonas durante la etapa de enraizamiento. Se logró una eficiencia del 90% de sobrevivencia después del trasplante y la etapa de aclimatación en suelo.

Discusión

Diversos estudios como el de Pierik *et al.*, (1974), Pierik y Steegmans (1976) y Adelheid *et al.*, (1992), han demostrado que la propagación de *Anthurium andraeanum* de forma vegetativa, utilizando como tejido fuente esquejes y vástagos, es muy difícil y consume mucho tiempo. Investigaciones más recientes como las de Hamidah *et al.*, (1997); Vargas *et al.*, (2004) y Te-Chato (2006) utilizaron otros tejidos incluyendo segmentos nodulares, segmentos de tallo, semillas recién germinadas, raíces, hojas y llegaron a la misma conclusión que los estudios anteriores con respecto a la dificultad de propagar *in vitro* esta especie.

El presente estudio es resultado de la búsqueda de un sistema de micropropagación *in vitro* más eficiente, para lo cual partimos de tejido compuesto por grupos de células troncales o células madre que están presentes en los embriones cigóticos inmaduros de *Anthurium*

andraeanum, los cuales son capaces de reprogramarse fácilmente mediante tratamiento con fitohormonas.

Nuestros resultados demuestran que los embriones son altamente eficientes como explantes de origen para inducir la formación de callo de una manera rápida y fácil, lo cual representa un avance para futuros esfuerzos de micropromoción masiva, ya que se obtuvo un promedio de 9 brotes inducidos por explante, comparado con Kunisaki (1980) que sólo obtuvo 3.1 brotes por explante de yemas vegetativas. La concentración y combinación de las fitohormonas (2 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de BAP) utilizadas para este trabajo fue suficiente para darnos mejores resultados que en trabajos previamente realizados, ya que se generan numerosas plántulas por callo y la eficiencia en la sobrevivencia después del trasplante y la etapa de aclimatación en suelo es del 90% superior a la obtenida por Jahan *et al.*, (2009) que fue del 85%.

La relación y concentración de hormonas utilizada fue suficiente para la generación de organogénesis indirecta a partir de callo en aproximadamente sesenta días después de la inducción. Además, en algunos casos los brotes generados a partir de callos dieron origen a nuevos brotes mediante organogénesis directa por activación de yemas axilares o primordios laterales. La activación de yemas axilares que dio origen a nuevos tallos ocurrió una vez que los brotes generados por organogénesis indirecta mostraron un estado de desarrollo avanzado o bien a partir del embrión cigótico que, en algunos casos, germinó. Aunque en la mayoría de los trabajos la etapa de inducción de callo se lleva a cabo en condiciones de oscuridad, en este estudio se observó que con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad es también apropiado para la formación de callos.

El efecto de las hormonas utilizadas en este estudio ya se habían reportado con éxito en varios trabajos anteriores con diferentes tipos explantes pero nunca con embriones cigóticos inmaduros. Kunisaki (1980) logró la inducción de 3.1 brotes por explante con el medio MS adiconado con 0.2 mg/l de BAP. Ruiz (2000) logró la mayor formación de callo con la dosis de 0.5 mg/l de BAP independiente de las dosis de 2,4-D, utilizando explantes provenientes de la vena central de hojas jóvenes y maduras. Jahan *et al.*, (2009) con una concentración de 1 mg/l de BAP en medio MS obtuvo la regeneración de brotes a partir de explantes de hojas y de segmentos de espádice derivado de callo y aumentó de 3 a 4 veces el número de brotes de yemas después de subcultivar en el mismo medio. Farsi *et al.*, (2012) analizó 16 tratamientos de crecimiento en la

inducción y regeneración de callo de explante de hojas y como resultado obtuvo que el mejor medio para inducción de callo es el MS con 0.1 mg/l de 2,4-D más 1.5 mg/l de BAP.

Si bien puede plantearse que una de las desventajas de utilizar embriones como tejido madre es que sólo se obtienen una vez que la planta adulta es polinizada y después de unos meses empieza a dar frutos en sus espádices, una vez establecida la formación de callos y plantas jóvenes mediante el uso, sólo en un inicio de embriones, se pueden utilizar dichos explantes para continuar con la propagación de plantas *in vitro* de manera sencilla y rápida (Arellano-Perusquia y Cruz-Ramírez, datos no publicados).

Nuestro trabajo muestra diversas ventajas respecto a estudios anteriores y el protocolo resultante es sencillo y eficaz. Además, permite rápidamente la obtención de tejido proliferativo como fuente para generar miles de plántulas una vez que se cuenta en una primera fase con embriones inmaduros de la variedad de interés. Sin embargo, es necesario afinar y revisar diversas concentraciones de hormonas para el cultivo de embriones, o callos provenientes de embriones, que permitan hacer aún más eficiente la producción de brotes por callo generado y mejorar también las condiciones de enraizamiento, aclimatación en cámara de crecimiento y finalmente en invernadero de las plantas regeneradas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad De La Salle Bajío A.C. por el apoyo recibido, a través de la Dirección de Investigación, para llevar a cabo la presente investigación. De la misma manera se agradece a la Dra. Alba Jofre y Garfias, Dr. Luis Herrera-Estrella, M.C. Araceli Oropeza Aburto, Ing. Jorge Luis Ledesma Arredondo, M.C. Karla González Aguilera, Dr. Stefan de Folter y Silvia Ordaz Fernández, del CINVESTAV Campus Irapuato por la ayuda técnica, materiales y equipo.

Referencias

Adelheid, R.K., Fure-Chyi Chen y Nellie Sugii (1992). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andeanum* hybrids. Plant Cell Reports. 11:438-442.

Atak, Ç. y Çelik Ö. (2009). Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1155-1161, 2009.

Beham Sedaghati, Nad-Ali Babaeiyan, Nad-Ali Bagheri, Hamed Salehiyan, Rahekeh Khademian (2012). Effect of type and concentration of growth regulators on plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. *Intl. J. Agric: Res & Rev. Vol.*, 2 (S), 998-1004.

Chayanika Bhattacharya, Anandamoy Dam, Joydeep Karmakar and Tapas Kumar Bandyopadhyay (2015). Efficient organogenesis from the induced meristemoid of *Anthurium andraeanum* Linden cv. Tinora. *Plant Science Today*. 2(2): 82-86.

Chen FC, Kuehnle AR, Sugai N (1997) *Anthurium* roots for micropropagation and *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer. *Plant Cell Tiss Org Cult* 49: 71-74.

Farsi M., Taghavizadeh Yazdi ME. and Qasemionran V (2012). Micropropagation of *Anthurium andreanum* cv. Terra. *African Journal of Biotechnology Vol.* 11(68), 13162-13166.

Geier T (1986) Morphogenesis and plant regeneration from spadix of *Anthurium scherzerianum* cultured *in vitro*. In: Proc. 5th Intl. Cong. Plant Cell and Tissue Culture. A. Fujiwara, (ed). Research Conference. Tokyo, Japan. 137-138.

Geier T (1990) *Anthurium*. In: P V Ammirato, D A Evans, W R Sharp, Y P S Bajaj (eds). *Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species*. McGraw-Hill, New York. 5:228-252.

Gou, Y. G., & Luo, M. (2012). The proliferation and differentiation optimization of *Anthurium andraeanum* callus. *Chinese Horticulture Abstracts*, 5, 006.

Hamidah M, Karim AGA, Debergh P (1997). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *J. Plant Cell Tissue and Organ Cult*. 48:189-193.

Jahan MT, Islam MR, Khan R, Mamun ANK, Ahmed G, Hakim H (2009) *In vitro* clonal propagation of *Anthurium* (*Anthurium andraeanum Lind*) using callus culture. *Plant Tiss Cult Biotech* 19 (1): 61-69.

Joseph D, Martin KP, Madassery J, Philip VJ (2003) *In vitro* propagation of three commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort Ind J Exp Biol 41: 154-159.

Kunisaki J T (1980) *In vitro* propagation of *Anthurium andraeanum* Lind. HortScience 15:508-509.

Li-li, Z. H. O. U. (2012). Effects of Different Explants on the Primary Culture and Callus Induction of *Anthurium andraeanum* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 28, 014.

Martin KP, Joseph D, Madassery J, Philip VJ (2003) Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. In Vitro Cell Dev Biol Plant 39: 500-504.

Meyerowitz, E. M., Sugimoto, K. y Gordon, s. P. 2011. Regeneration in plants an animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology* 21.

Mojtaba Khorrami Raad, Sahar Bohluli Zanjani, Mahmoud Shoor, Yousef Hamidoghi, Ali Ramezani Sayyad, Ardashir Kharabian-Masouleh and Behzad Kaviani (2012). Callus induction and organogenesis capacity from lamina and petiole explants of *Anthurium andraeanum* Linden (Casino and Antadra). AJCS 6(5):928-937.

Oscullo-Avila, M.A. (2011). Organogénesis indirecta *in vitro* de anturio (*Anthurium andraeanum* l.), a partir de secciones de hoja. Tesis de Ingeniera en Ciencias Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejército.

Pierik, RLM, Steegmans HH y Van Der Meys JA (1974). Plantlet formation in callus tissues of *Anthuriun andraeanum* Lind. Scientia Horticulturae. 2: 193-198.

Pierik, RLM y Ruibing MA (1997) Developments in the micropropagation industry in the Netherlands. En: Ziv, M (Ed). Plant tissue culture and biotechnology. Vol.3. No. 3. 152-156. Balaban Publishers. Rehovot.

Pierick RLM and Steemans HHM (1976) Vegetative propagation of *Anthurium scherzerianum* Shoot through callus culture. Hor Sci. 4: 291-292.

Ruiz, B. (2000). Efectos del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L. El Zamorano, Honduras.

Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C., Vera-Nuñez, A., Sánchez-Arreguín, A., Ruiz-Medrano, R., Salgado-Lugo, H., Sánchez-Segura, L. and Peña-Cabriales, J. J. (2015). A novel intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis* and *Bacillus* spp. New Phytologist. doi: 10.1111/nph.13359.

Te-Chato, S., Susanon, T., Sontikun, Y (2006). Cultivar, Explant Type and culture medium influencing embryogenesis and organogenesis in *Anthurium* spp. Journal of Science Technology. 28:717-722.

Teng W (1997) Regeneration of *Anthurium* adventitious shoots using liquid or raft culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 49:153-156.

Trujillo, R. Concepción, O. Daquinta, M. Nápoles, L. Balmaseda, M. (2000). Propagación *in vitro* de *Anthurium andeanum* Lind. variedad “Sonate”. Universidad de Ciego de Avila, Cuba.

Vargas, T.E., Mejias, A. Oropeza, M. Garcia E. (2004). Plant Regeneration of *Anthurium andeanum* cv. Rubrun. Electronic Journal of Biotechnology 7: 1-5.

Yi-xun Y, Ling L, Juan-xu L, Jing W (2009). Plant regeneration by callus-mediated protocorm-like body induction of *Anthurium andraeanum* Hort. China. J. Agric. Sci. 8(5):572-577.