



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA

**REGENERACIÓN *in vitro* DE *Heliconia* spp VÍA  
ORGANOGENÉISIS DIRECTA**

**ELEODORO HERNÁNDEZ MENESES**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2008**

La presente tesis titulada “**Regeneración *in vitro* de *Heliconia* spp vía organogénesis directa**”, realizada por el alumno: **Eleodoro Hernández Meneses**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERA**

---

**DRA. MA. CRISTINA GPE. LÓPEZ PERALTA**

**ASESOR**

---

**DR. VÍCTOR A. GONZÁLEZ HERNÁNDEZ**

**ASESOR**

---

**DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2008.

## DEDICATORIA

**A mis padres: Juana Meneses Hernández y Valentín Hernández Ascencio.** Por su paciencia y apoyo incondicional en todo.

**A Sandra Eloisa Rangel Estrada y nuestro angelito†.** Ambos me mantienen de pié.

**A mis hermanos Gabriela, Efraín, Fátima y Evangelina.** Por los buenos y malos tiempos vividos pero que nunca nos disgregaron.

**A mis sobrinos Saúl Yamir, Alex Alonso, Karem Alejandra y al que está por llegar.**

Son personitas que me alegran siempre.

**A mi tío Víctor Manuel y Familia.** Por ser mí sombra en mi ausencia.

**A mis amigos:** Dulce, Cancino, Mónica, Janeth, Alejandro, Carlos M., Ismael, Álvaro, J. Sabino, Equipo de Soccer de Genética.

**A toda mi familia... toda.**

## AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que, por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, me otorgó una beca económica para cursar mis estudios en el Colegio de Postgraduados y llevar a cabo la presente investigación.

Dra. Ma. Cristina López Peralta le agradezco el tiempo, sapiencia y apoyo otorgado durante mi formación en el Colegio de Postgraduados. Más que una consejera una gran amiga.

A la Finca Las Abejas, Tacotalpa, Tabasco por facilitarme el material vegetal empleado en la investigación.

Un profundo reconocimiento al Dr. Víctor A. González Hernández por su valiosa orientación y apoyo en el análisis estadístico de la investigación.

A la Dra. H. Araceli Zavaleta Mancera por su conducción en el estudio histológico.

Al Sr. Juan Zaragoza, por su inagotable ayuda en el laboratorio y sobre todo por su amistad.

Al Sr. Miguel Vega, por su gran apoyo en la obtención de las muestra de histología.

Un especial agradecimiento a la familia Bobadilla Adame por toda su invaluable ayuda y amistad a cada momento. Muy agradecido con ustedes.

A la familia Sánchez Trujano por su confianza y amistad a manos llenas.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de esta investigación.

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos generales .....	3
1.2 Objetivos específicos .....	3
1.3 Hipótesis .....	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Generalidades de las Heliconias .....	4
2.1.1 Descripción Botánica .....	4
2.1.2 Morfología .....	5
2.1.3 Importancia Económica.....	7
2.2 Técnicas del cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	9
2.3 Totipotencia celular .....	10
2.4 Determinación y Competencia.....	11
2.5 Morfogénesis <i>in vitro</i> .....	12
2.5.1 Embriogénesis somática.....	12
2.5.2 Organogénesis <i>in vitro</i> .....	12
2.6 Factores que afectan los procesos morfogénicos .....	13
2.6.1 El genotipo .....	14
2.6.2 El explante.....	14
2.6.3 Ambiente químico: Medio de cultivo y sus componentes.....	15
2.6.3.1 Macronutrientes .....	15
2.6.3.2 Micronutrientes.....	15
2.6.3.3 Suplementos orgánicos (vitaminas y aminoácidos) .....	16
2.6.3.4 Fuente de carbono .....	16
2.6.3.5 Agentes gelificantes .....	17
2.6.3.6 Regulación hormonal de la morfogénesis <i>in vitro</i> .....	17
2.6.3.6.1 Auxinas .....	18
2.6.3.6.2 Citocininas.....	19
2.6.3.6.3 Giberelinas .....	20
2.6.3.6.4 Ácido Abscísico.....	21
2.6.3.6.5 Etileno.....	21
2.6.3.6.6 Nuevos reguladores de crecimiento vegetal .....	21

2.6.4 Ambiente físico .....	22
2.6.4.1 Temperatura .....	22
2.6.4.2 Humedad relativa .....	22
2.6.4.3 Luz .....	22
2.7 Cultivo <i>in vitro</i> de heliconias .....	23
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Material vegetal .....	25
3.2 Medio de cultivo .....	27
3.3 Condiciones de incubación .....	28
3.4 Establecimiento del cultivo aséptico .....	28
3.4.1 Origen de los explantes .....	28
3.4.1.1 Ápices de inflorescencias y frutos inmaduros .....	28
3.4.1.2 Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	29
3.4.1.3 Yemas laterales .....	29
3.4.1.4 Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	32
3.4.2 Efecto del tamaño del explante de yemas laterales .....	33
3.4.2.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	33
3.5 Inducción de brotes .....	34
3.5.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	34
3.6 Análisis histológico de brotes adventicios .....	35
3.6.1 Fijación y deshidratación .....	35
3.6.2 Inclusión en parafina .....	35
3.6.3 Microtomía .....	35
3.6.4 Remoción de la parafina e hidratación del tejido .....	36
3.6.5 Tinción .....	36
3.7 Multiplicación de brotes .....	36
3.7.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	37
3.8 Enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas .....	38
3.8.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	38
3.9 Germinación <i>in vitro</i> de semillas .....	39
3.9.1 Material vegetal .....	39
3.9.2 Método de esterilización de semillas .....	39
3.9.3 Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	40
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
4.1 Establecimiento del cultivo aséptico .....	42
4.1.1 Origen de los explantes .....	42
4.1.1.1 Ápices de inflorescencias y frutos inmaduros .....	42
4.1.1.2 Yemas laterales de <i>H. nickeriensis</i> .....	43
4.1.1.3 Yemas laterales de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. psittacorum</i> cv. ‘Sassy’, <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’ y <i>H. wagneriana</i> .....	47
4.1.2 Efecto del genotipo y tamaño de explante de yemas laterales sobre la contaminación .....	48
4.2 Inducción de brotes vía organogénesis directa .....	50

---

4.3 Análisis histológico de los brotes adventicios.....	54
4.4 Multiplicación de brotes.....	56
4.4.1 Efecto de la concentración de BA .....	56
4.4.2 Efecto de la concentración de tiazurón (TDZ) .....	60
4.5 Enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas.....	66
4.6 Germinación <i>in vitro</i> de semillas .....	73
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>78</b>
<b>VIII. APÉNDICE.....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Auxinas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> *.....	18
Cuadro 2. Citocininas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> *.....	19
Cuadro 3. Tratamientos probados para la desinfección de yemas laterales de <i>H. nickeriensis</i> . .....	30
Cuadro 4. Relación de concentraciones de 6-benciladenina (BA) adicionadas al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) para evaluar su efecto en la inducción de brotes a partir de yemas laterales de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’. .....	34
Cuadro 5. Relación de concentraciones de 6-benciladenina (BA) y ácido indol-3-acético (AIA) adicionadas al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) para evaluar su efecto en la multiplicación de brotes de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’.....	37
Cuadro 6. Relación de concentraciones de tidiazurón (TDZ) y ácido indol-3-acético (AIA) adicionadas al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) para evaluar su efecto en la multiplicación de brotes de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’.....	37
Cuadro 7. Relación de concentraciones de ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) adicionadas al medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (MS) para evaluar su efecto en el enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’.....	38
Cuadro 8. Tratamientos de escarificación de semillas de <i>H. bikai</i> cv ‘Pink Peach’, <i>H. collinsiana</i> y <i>H. platystachys</i> cv. ‘Sexy Orange’ empleando 3% de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v).....	40
Cuadro 9. Respuesta organogénica medida en porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) en concentraciones de 6-benciladenina (BA) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA) (0.17 mg L <sup>-1</sup> ), durante la multiplicación de brotes de tres especies de <i>Heliconia</i> . .....	57
Cuadro 10. Promedios de brotes por explante (BE) en la etapa de multiplicación de brotes de tres especies de heliconias después de 4, 8 y 12 semanas de la siembra <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L <sup>-1</sup> ) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L <sup>-1</sup> ). .....	60
Cuadro 11. Promedios de brotes por explante (BE) en la etapa de multiplicación de brotes de tres especies de heliconias después de 4, 8 y 12 semanas de la siembra <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L <sup>-1</sup> ) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L <sup>-1</sup> ). Los brotes procedían de medio de cultivo MS suplementado con tidiazurón (TDZ, 0.44 mg L <sup>-1</sup> ) + AIA (0.17 mg L <sup>-1</sup> ). .....	66
Cuadro 12. Respuesta organogénica medida en número de raíces (R), longitud (LR) y altura de plántula (AP) con diferentes auxinas durante el enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de tres especies de heliconia. ....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de arreglos de las hojas en <i>Heliconia</i> . (A) Musoide, (B) Canoide, (C) Zingiberoide. ....	5
Figura 2. Tipos de inflorescencias en <i>Heliconia</i> . (A) Erecta, (B) Colgante. ....	6
Figura 3. Características de las inflorescencias en <i>Heliconia</i> . ....	7
Figura 4. Inflorescencias de heliconias utilizadas como explantes en la inducción de organogénesis directa <i>in vitro</i> . (A) <i>H. bihai</i> cv. ‘Pink Peach’, (B) <i>H. collinsiana</i> , (C) <i>H. nickeriensis</i> , (D) <i>H. platystachys</i> cv. ‘Sexy Orange’, (E) <i>H. psittacorum</i> cv. ‘Sassy’, (F) <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’; y (G) <i>H. wagneriana</i> . Fuente: Elaboración propia. ....	26
Figura 5. Frutos inmaduros de <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’ usados como explantes. ....	29
Figura 6. Rizomas con yemas laterales después de su almacenamiento durante 10 d en bolsas de polietileno a temperatura ambiente. (A) <i>H. collinsiana</i> ; (B) <i>H. nickeriensis</i> , (C) <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’. ....	30
Figura 7. Yemas laterales de <i>H. nickeriensis</i> después de la esterilización y de la disección usadas como explantes. (A) 5 mm, (B) 10 mm y (C) 15 mm. ....	33
Figura 8. Semillas de heliconias utilizadas para la germinación <i>in vitro</i> . (A) <i>H. bihai</i> cv. ‘Pink Peach’, (B) <i>H. collinsiana</i> , (C) <i>H. platystachys</i> cv. ‘Sexy Orange’. ....	39
Figura 9. Protocolo empleado en la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Heliconia</i> vía organogénesis directa, análisis histológico de los brotes (Fases 1-5) y germinación de semillas (Fase 6). ....	41
Figura 10. Porcentajes de contaminación y supervivencia <i>in vitro</i> en explantes de <i>H. nickeriensis</i> evaluados 15 d después de la siembra en medio de cultivo MS (1962). ....	44
Figura 11. Establecimiento del cultivo aséptico de yemas laterales de <i>H. nickeriensis</i> . ....	46
Figura 12. Porcentajes de contaminación y supervivencia <i>in vitro</i> en explantes de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. psittacorum</i> cv. ‘Sassy’, <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’ y <i>H. wagneriana</i> evaluados 15 d después de la siembra en medio de cultivo MS (1962). ....	47
Figura 13. Porcentajes de contaminación <i>in vitro</i> en tres tamaños de yemas laterales en promedio, de tres especies de heliconias, después de 15 d de la siembra en medio MS (1962). ....	49
Figura 14. Yemas laterales después de una semana de siembra <i>in vitro</i> . (A) <i>H. collinsiana</i> , (B) <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’, (C) <i>H. nickeriensis</i> . ....	50
Figura 15. Porcentaje de brotación (B) y número de brotes por explante (BE) de tres especies de heliconias cultivadas <i>in vitro</i> a partir de explantes de yemas laterales durante la etapa de inducción de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey, $p \leq 0.05$ ). ....	51
Figura 16. Efecto de concentraciones de 6-benciladenina (BA) en la respuesta organogénica medida en porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB), de tres especies de heliconias en la etapa de inducción de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey, $p \leq 0.05$ ). ....	52
Figura 17. Inducción de brotes adventicios <i>in vitro</i> en explantes de yemas laterales de heliconias después de 12 semanas de su siembra en medio MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L <sup>-1</sup> ). (A) <i>H.</i>	

- collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y (C) *H. nickeriensis*. br = brote; eo = explante original; yl = yema lateral.....53
- Figura 18. Origen histológico de los brotes de *H. collinsiana* (A, B, C), *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' (D, E, F) y *H. nickeriensis* (G, H, I) generados en explantes de yemas laterales. Cortes medianos del explante (A, D y G) una semana después de la siembra *in vitro* (barra=100 µm). B) Yema axilar a las cuatro semanas después de la siembra (barra=25 µm). C) Primordio de brote originado a partir de procambium en la base del explante 10 semanas después de la siembra (barra=100 µm). E) Yema axilar a las cuatro semanas después de la siembra (barra=100 µm). F) Yema axilar latente en la base del explante (barra=100 µm). H) Explante a las cuatro semanas (barra=100 µm). I) Alargamiento de la yema lateral a las 10 semanas (barra=150 µm). cm=células meristemáticas; h=hoja; ma=meristemo apical; ph=primordio de hoja; pr=procámbium; ya=yema axilar.....55
- Figura 19. Efecto de concentraciones de 6-benciladenina (BA) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>) en la respuesta organogénica medida en porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB) en tres especies de heliconias en la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey, p≤0.05).....57
- Figura 20. Efecto de la interacción especie y concentración de 6-benciladenina (BA) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante en tres especies de heliconias en la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey, p≤0.05).....59
- Figura 21. Multiplicación de brotes en tres especies de heliconias después de 10 semanas de cultivo en medio MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L<sup>-1</sup>) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch', y (C) *H. nickeriensis*. br = brote; eo = explante original; yl = yema lateral.....59
- Figura 22. Efecto de concentraciones de tiazurón (TDZ) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey, p≤0.05).....62
- Figura 23. Multiplicación de brotes en tres especies de heliconias después de ocho semanas de cultivo en medio MS (1962) suplementado con tiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch', (C) *H. nickeriensis*. br = brote; eo=explante original; yl = yema lateral.....64
- Figura 24. Alargamiento de brotes en tres especies de heliconias después de seis semanas de cultivo en medio MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L<sup>-1</sup>) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y (C) *H. nickeriensis*. Los brotes permanecieron ocho semanas en un medio de cultivo MS (1962) suplementado con tiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) en combinación con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>), antes de ser transferidos al medio con BA.....65
- Figura 25. Enraizamiento de plántulas de tres especies de heliconias después de cuatro semanas de cultivo en medio de cultivo MS (1962) suplementado con ácido 1-naftalenacético (ANA, 0.18 mg L<sup>-1</sup>). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. nickeriensis* y (C) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'.....68
- Figura 26. Representación esquemática de la regeneración *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' vía organogénesis directa.....69
- Figura 27. Regeneración *in vitro* de *H. collinsiana* vía organogénesis directa. A) Explante inicial (yema lateral); B) Inducción de brotes en medio MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 3.0 mg L<sup>-1</sup>); C) Multiplicación de brotes en BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>); D) Multiplicación de brotes en tiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); E) Alargamiento de

- brotos inducidos por TDZ en medio con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); F) Enraizamiento *in vitro* de plántulas con ácido 1-naftalenacético (ANA, 0.18 mg L<sup>-1</sup>). ..... 70
- Figura 28. Regeneración *in vitro* de *H. nickeriensis* vía organogénesis directa. A) Explante inicial (yema lateral); B) Inducción de brotes en medio MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L<sup>-1</sup>); C) Multiplicación de brotes en BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>); D) Multiplicación de brotes en tiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); E) Alargamiento de brotes inducidos por TDZ en medio con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); F) Enraizamiento *in vitro* de plántulas con ácido 1-naftalenacético (ANA, 0.18 mg L<sup>-1</sup>). ..... 71
- Figura 29. Regeneración *in vitro* de *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ vía organogénesis directa. A) Explante inicial (yema lateral); B) Inducción de brotes en medio MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L<sup>-1</sup>); C) Multiplicación de brotes en BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>); D) Multiplicación de brotes en tiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); E) Alargamiento de brotes inducidos por TDZ en medio con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); F) Enraizamiento *in vitro* de plántulas con ácido 1-naftalenacético (ANA, 0.18 mg L<sup>-1</sup>). ..... 72
- Figura 30. Plántulas desarrolladas a partir de semilla germinada de *H. bihai* cv. ‘Pink Peach’ durante 45 semanas (10.5 meses) de incubación en la mitad de concentración de sales del medio MS (1962). (A) Plántula a las 46 semanas (B) Plántula a las 50 semanas. .... 73

## ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

1A. Componentes del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) empleados para la inducción, multiplicación y enraizamiento de brotes de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’ <i>in vitro</i> .....	88
2A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de contaminación y supervivencia <i>in vitro</i> de yemas laterales de <i>H. nickeriensis</i> . Las variables de contaminación y supervivencia se transformaron usando $Y + 0.5$ . ....	88
3A. Comportamiento de la contaminación <i>in vitro</i> en explantes de yemas laterales de <i>H. nickeriensis</i> evaluados durante 15 d a partir de la siembra. ....	88
4A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de contaminación y supervivencia <i>in vitro</i> de yemas laterales de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. psittacorum</i> cv. ‘Sassy’, <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’ y <i>H. wagneriana</i> . Las variables de contaminación y supervivencia se transformaron usando $Y + 0.5$ . ....	89
5A. Comportamiento de la contaminación <i>in vitro</i> en explantes de yemas laterales de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. psittacorum</i> cv. ‘Sassy’, <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’ y <i>H. wagneriana</i> evaluados durante 15 d a partir de la siembra. ....	89
6A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de tres tamaños de explante en la tasa de contaminación y supervivencia <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’. Las variables de contaminación y supervivencia se transformaron usando $Y + 0.5$ . ....	89
7A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de nueve concentraciones de 6-benciladenina (BA) en la inducción de brotes <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’. Las variables de porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) se transformaron usando $Y + 0.5$ . ....	90
8A. Respuesta organogénica de tres especies de heliconias sometidas a diferentes concentraciones de 6-benciladenina (BA), medida en porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB), durante la inducción de brotes. ....	91
9A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de cinco concentraciones de 6-benciladenina (BA) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L <sup>-1</sup> ) en la multiplicación de brotes <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’. Las variables de porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) se transformaron usando $Y + 0.5$ . ....	92
10A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de cinco concentraciones de tiazurón (TDZ) y dos concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA) en el número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) durante la multiplicación de brotes <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’. ....	92
11A. Respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) en diversas concentraciones de tiazurón (TDZ) y ácido indol-3-acético (AIA) durante la multiplicación de brotes de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. ‘Golden Torch’.....	93
12A. Efecto de la interacción entre especie y concentraciones de tiazurón (TDZ) en la respuesta organogénica medida en el número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones. ....	93

---

13A. Efecto de la interacción entre especie y concentración de ácido indol-3-acético (AIA) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones.....	94
14A. Efecto de la interacción entre concentraciones de tiazurón (TDZ) y de ácido indol-3-acético (AIA) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones.....	94
15A. Efecto de la interacción entre especie, concentraciones de tiazurón (TDZ) y de ácido indol-3-acético (AIA) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones.....	95
16A. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza del ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) en el enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. 'Golden Torch'.....	96
17A. Efecto del ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) sobre el número de raíces (R), longitud de raíces (LR) y altura de plántulas (AP) de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. 'Golden Torch' propagadas <i>in vitro</i> .....	96

## RESUMEN

### REGENERACIÓN *in vitro* DE *Heliconia* spp VÍA ORGANOGÉNESIS DIRECTA

Eleodoro Hernández Meneses, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2008

Las heliconias son plantas ornamentales tropicales cultivadas como flor de corte por sus colores brillantes y formas exóticas. Su cultivo en México ha tenido un crecimiento lento por las dificultades que presentan para su propagación. Una alternativa para la propagación clonal es el uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En esta investigación se desarrolló un protocolo para la producción de plántulas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ vía organogénesis directa a partir de yemas laterales de rizomas procedentes del campo. La mezcla de 30% de hipoclorito de sodio (v/v), 4% de Tween<sup>®</sup> 20 (v/v) y 3% de plata coloidal (v/v) fue eficiente para abatir la contaminación de explantes a menos de 10 %. La inducción de brotes adventicios en *H. nickeriensis* y cv. ‘Golden Torch’ se logró en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) con 2.5 mg L<sup>-1</sup> (11.1 µM) de 6-benciladenina (BA) y con 3.0 mg L<sup>-1</sup> (13.3 µM) de BA en *H. collinsiana*. Los brotes se formaron en la base del explante a partir de células de procambium y en las axilas de la cuarta y quinta hoja. La multiplicación de brotes fue posible con 2.5 mg L<sup>-1</sup> (11.1 µM) de BA en combinación con 0.17 mg L<sup>-1</sup> (1.0 µM) de ácido indolacético (AIA), en las tres especies. Esta tasa de multiplicación se incrementó con la combinación de 0.44 mg L<sup>-1</sup> (1.9 µM) de tidiazurón (TDZ) y 0.17 mg L<sup>-1</sup> (1.0 µM) de AIA. El enraizamiento *in vitro* de los brotes de las tres heliconias se obtuvo en el medio de cultivo MS con 0.18 mg L<sup>-1</sup> (1.0 µM) de ácido naftalenacético (ANA). Con este protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa se pueden obtener hasta 823 brotes en *H. collinsiana*, 322 en el cultivar ‘Golden Torch’, y 171 en *H. nickeriensis*, en un período de 26 semanas a partir de un explante.

Palabras clave: Organogénesis, cultivo de yemas, heliconia, rizoma, tidiazurón.

**ABSTRACT***In vitro* REGENERATION OF *Heliconia* spp BY DIRECT ORGANOGENESIS

Eleodoro Hernández Meneses, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2008

Heliconias are tropical ornamentals plants cultivated as cut flower by their showy and brightly colored inflorescences. Their cultivation in Mexico has had a slow increase due to the difficulties for their vegetative propagation. An alternative technique for their clonal propagation is *in vitro* plant tissue culture. In this research it was developed a protocol for plantlet production of *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* and *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' by direct organogenesis from lateral buds of rhizomes coming from field conditions. The mixture of sodium hypochlorite (30%, v/v), Tween<sup>®</sup> 20 (4%, v/v) and colloidal silver (3%, v/v) was successful to reduce the *in vitro* contamination to less than 10%. Shoot induction in *H. nickeriensis* and cv. 'Golden Torch' was achieved on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.5 mg L<sup>-1</sup> (11.1 µM) 6-benziladenine (BA), and in *H. collinsiana* with 3.0 mg L<sup>-1</sup> (13.3 µM) BA. Shoots arose at the base of the explant from procambium cells and in the axis of the fourth and fifth leaf. Shoot multiplication was attained with 2.5 mg L<sup>-1</sup> (11.1 µM) BA in combination with 0.17 mg L<sup>-1</sup> (1.0 µM) indolacetic acid (IAA), in these three species; this rate of multiplication was increased with the combination of 0.44 mg L<sup>-1</sup> (1.9 µM) thidiazuron (TDZ) and 0.17 mg L<sup>-1</sup> (1.0 µM) IAA. The *in vitro* rooting was induced on MS medium containing 0.18 mg L<sup>-1</sup> (1.0 µM) naftalenacetic acid (NAA). With this protocol of regeneration *in vitro* by direct organogenesis it is possible to obtain up to 823 shoots in *H. collinsiana*, 322 in cv. 'Golden Torch', and 171 in *H. nickeriensis*, in a 26-week period from a single explant.

Key words: Organogenesis, bud culture, heliconia, rhizome, thidiazuron.

## I. INTRODUCCIÓN

En México se producen alrededor de 50 tipos diferentes de flores de corte, entre las cuales figuran las heliconias aunque para esta especie no se tienen estadísticas que indiquen superficies y volúmenes (ASERCA, 2006). Las heliconias son plantas ornamentales tropicales cuyas inflorescencias tienen amplio potencial comercial por sus colores brillantes y formas exóticas, además de producirlas continuamente y en cantidades abundantes, con larga vida en florero. En virtud de estas características muchas variedades de heliconias se han comercializado como flor de corte (Castro, 1995; Proexport, 2003).

Son hierbas rizomatosas, perennes, con un tubo en forma de tallo erecto compuesto de hojas arregladas en una funda llamada pseudotallo. El rizoma se ramifica simpodialmente a partir de yemas en la base del pseudotallo. El crecimiento vegetativo es igualmente vigoroso, y a menudo dan origen a poblaciones monoclonales (Kress, 1990).

Las heliconias se cultivan principalmente en países tropicales como Colombia y Ecuador; en México las escasas áreas de cultivo se localizan en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz. Su cultivo ha tenido un crecimiento lento en el país por las dificultades que presentan para su propagación. La principal forma de propagarlas es asexualmente mediante la división de rizomas y es la mejor vía para mantener selecciones clonales (Criley, 1989). Su producción de hijuelos varía entre especies, algunas son muy prolíferas y otras tardan hasta un año para emitir una nueva planta. La propagación por semillas es una de las formas menos eficiente, debido a que la progenie obtenida es variable y a que el endospermo que protege al embrión es una barrera que limita la germinación (Criley, 1988; Simão y Scatena, 2003).

La mayoría de las variedades comerciales se han desarrollado en los países centro y sudamericanos (Costa Rica, Brasil, Colombia, Ecuador). Por tratarse de plantas relacionadas filogenéticamente con el género *Musa*, la Norma Oficial Mexicana NOM-068-FITO-1998 (SAGARPA, 1998), restringe la importación de rizomas de heliconias debido a la presencia de hongos y bacterias causantes de enfermedades en banano.

---

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* han jugado un papel importante en la producción y mejoramiento de cultivos hortícolas. La micropropagación ha sido ampliamente utilizada para la propagación a gran escala de especies ornamentales, ya que no sólo permite la obtención de miles de individuos a partir de un genotipo «elite» seleccionado, sino que también permite la multiplicación de plantas raras o en peligro de extinción, resguardando la estabilidad genética de las mismas y sirve para la obtención de plantas libres de virus (Debergh y Maene, 1981; Thorpe y Harry, 1997).

Para tratar de superar las dificultades en la propagación de las heliconias, Nathan *et al.* (1992) evaluaron la técnica de cultivo *in vitro* de yemas laterales y lograron la propagación de *H. psittacorum* cv. 'Choconiana'; observaron que las plantas propagadas *in vitro* producen más vástagos que las propagadas por división de rizomas. Sin embargo, las yemas laterales usadas como fuente de explantes para la micropropagación complican el establecimiento del cultivo aséptico, pues los rizomas subterráneos alojan numerosos microorganismos; además, algunas especies de heliconia albergan más de estos microorganismos, por lo que los métodos de esterilización no se pueden homogeneizar (Pedersen y Brandt, 1992).

Con estos antecedentes, en esta investigación se ha planteado desarrollar un protocolo para la propagación de heliconias mediante la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa, así como el análisis anatómico de los brotes obtenidos. Este sistema de propagación podría contribuir para aumentar el número de plantas disponibles para cultivo en menos tiempo y mantener la estabilidad genética del material propagado para las zonas de producción en México. También, podría aplicarse para la propagación de heliconas de alto valor económico que son sumamente recalcitrantes, como las variedades de *H. caribea* y *H. vellerigera*.

Aunado a lo antes mencionado, la obtención de plantas libres de microorganismos patógenos eliminaría la barrera de intercambio de material vegetal con los países productores de heliconias y a la vez podría aplicarse para la propagación de especies relacionadas filogenéticamente como *Musa*, *Etilingera*, *Strelitzia*, entre otras, ya sea por su importancia económica o por encontrarse en peligro de extinción. El análisis histológico brindará información sobre el origen anatómico de los brotes obtenidos y asegurará que las plantas serán genéticamente estables como las plantas madre.

## 1.1 Objetivos generales

- Desarrollar un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa.
- Analizar histológicamente el proceso de regeneración de los brotes generados.
- Evaluar la germinación de la semilla de heliconia por métodos *in vitro*.

## 1.2 Objetivos específicos

- Determinar la capacidad morfogénica de siete especies de heliconias.
- Establecer su cultivo aséptico.
- Evaluar diferentes orígenes y tamaños de explantes así como concentraciones hormonales en la inducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de brotes.
- Determinar el origen anatómico de los brotes.
- Evaluar la germinación de semilla de heliconia *in vitro*.

## 1.3 Hipótesis

- Las especies con mayor grado de domesticación tienen una mejor capacidad de regeneración *in vitro*.
- La respuesta morfogénica de heliconia depende del tipo de explante así como de las concentraciones y combinaciones hormonales.
- Es factible inducir la germinación de semillas de heliconias por métodos *in vitro*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades de las Heliconias

Las heliconias se encuentran ampliamente distribuidas en los trópicos, en regiones muy húmedas y en altitudes entre 100 y 2000 msnm. Las inflorescencias erguidas de heliconias son de amplio potencial comercial, pues además de sus colores brillantes y formas exóticas, producen flores continuamente y en cantidades abundantes con larga vida en florero. En virtud de estas características muchas variedades de heliconias se comercializan como flor de corte (Castro, 1995; Atehortua, 1997; Proexport, 2003).

#### 2.1.1 Descripción Botánica

Las heliconias se ubican dentro del orden de las Zingiberales, el cual se integra por ocho familias estrechamente relacionadas: Marantaceae, Musaceae, Strelitzaceae, Lowiaceae, Heliconiaceae, Zingiberaceae, Costaceae, Cannaceae. Estas familias se distribuyen en los trópicos del mundo y cada una se restringe a ciertas áreas dentro de esta zona, por ello las heliconias tienen su centro de diversidad en los trópicos americanos y unas cuantas especies en el sur de las islas del pacífico (Criley y Broschat, 1992; Andersson, 1998).

Las principales características de las heliconiaceae son las flores invertidas, la presencia de un estaminodio singular y los frutos en forma de durazno o melocotón, lo que permite separarla de las Musaceae (Kress, 1990; Andersson, 1998). Esta familia está integrada por el género *Heliconia*, dentro del cual existe un gran polimorfismo que ha hecho compleja y confusa la separación de las especies (Berry y Kress, 1991; Criley y Broschat, 1992).

Reino: Vegetal

División: Monocotiledónea (Liliopsida)

Subclase: Zingiberidae

Orden: Zingiberales

Familia: Heliconiaceae

Género: *Heliconia*

Especie: 180 spp descritas y 250 spp estimadas

### 2.1.2 Morfología

Las heliconias son hierbas rizomatosas, perennes con un tubo en forma de tallo erecto y aéreo compuesto de hojas arregladas en una funda llamado pseudotallo. El rizoma se ramifica simpodialmente a partir de yemas en la base del pseudotallo. El crecimiento vegetativo es igualmente vigoroso, a menudo dando origen a grandes poblaciones monoclonales (Kress, 1990). La hoja se compone de un pecíolo y limbo y su arreglo es alternado y dicotómico dando origen a tres hábitos de crecimiento conocidos como musoide, canoide o zingiberoide (Figura 1).

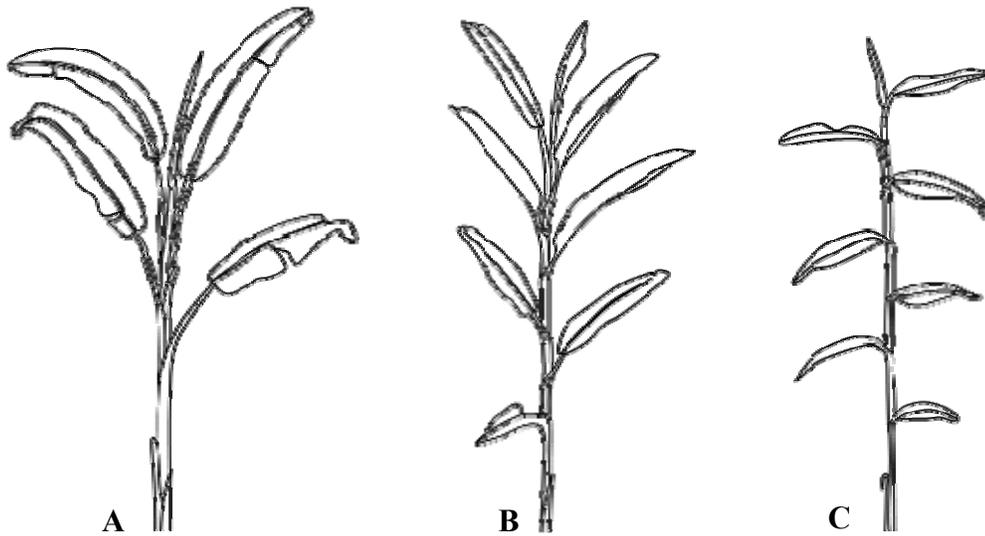


Figura 1. Tipos de arreglos de las hojas en *Heliconia*. (A) Musoide, (B) Canoide, (C) Zingiberoide.

Las inflorescencias de las heliconias son erectas o colgantes con respecto al tallo del cual emergen. Están formadas por el pedúnculo, hojas modificadas llamadas brácteas, el raquis conecta las brácteas adyacentes y un conjunto de flores en cada bráctea. Las brácteas pueden ser dísticas o arregladas en espiral debido a la torcedura del raquis. En algunas especies, el raquis está ligeramente torcido, colocándose las brácteas de forma semiespiral, o son dísticas cuando son jóvenes pero cuando maduran todas las brácteas se colocan en espiral (Figura 2) (Criley y Broschat, 1992; Berry y Kress, 1991).

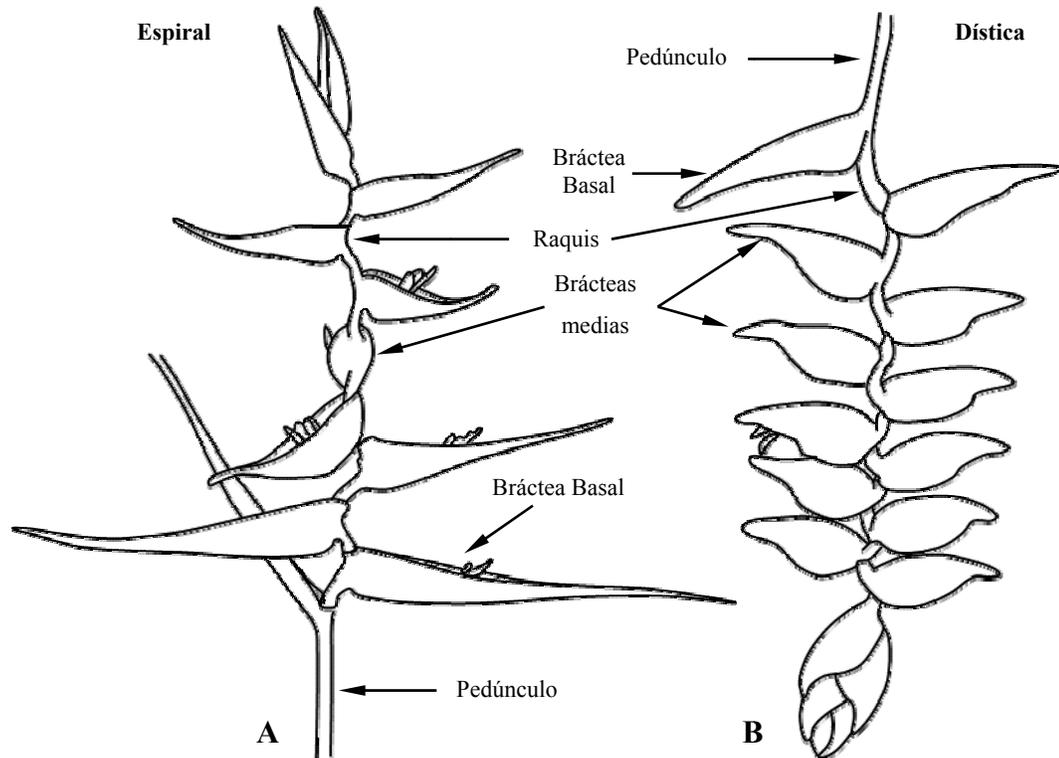


Figura 2. Tipos de inflorescencias en *Heliconia*. (A) Erecta, (B) Colgante.

Las inflorescencias son de diversos colores y cada una contiene un número variable de flores, incluso hasta 50 dependiendo de la especie. Las flores son hermafroditas y cada una es sostenida por una bráctea floral más pequeña. La flor contiene 5 estambres fértiles que producen polen viable, el sexto estambre es estéril y su principal función es guiar a los polinizadores hacia los néctares florales que se encuentran en la base del estilo (Figura 3) (Berry y Kress, 1991; Andersson, 1998).

Los frutos de las especies del Nuevo Mundo son de color azul y tienden a ser más pequeños (2 cm), mientras que los de especies tropicales del Pacífico pueden ser mayores a 3 cm y de un color rojo o anaranjado. El desarrollo de las semillas es ocultado por las brácteas y protegido por el líquido de las brácteas y los tejidos duros de alrededor. Hasta la maduración, el fruto se eleva por el alargamiento de su pecíolo para ser visible rápidamente y dispersado por aves, murciélagos y otros mamíferos. El fruto se describe como una drupa de 1-3 semillas o esquizocarpo carnoso. La semilla rugosa dura es propiamente llamada un pireno debido a que la cubierta de la semilla es un

endocarpo lignificado. Se reporta que el embrión está pobremente diferenciado al tiempo de madurez de la semilla (Montgomery, 1986; Criley, 1988; Criley y Broschat, 1992).

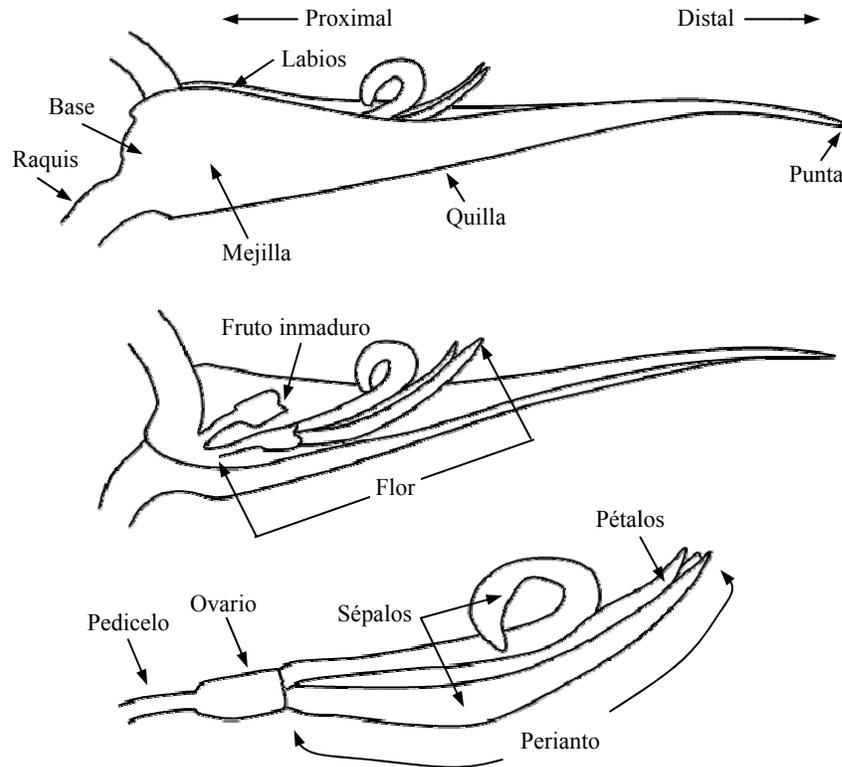


Figura 3. Características de las inflorescencias en *Heliconia*.

### 2.1.3 Importancia Económica

La importancia de la demanda de flores de corte en el mundo se refleja en el valor de comercio de las mismas. A nivel mundial existe un gran número de países que se dedican a la producción de flores, tanto a cielo abierto como en invernaderos; sin embargo, no todos ellos tienen un peso significativo en el mercado mundial, ya sea por la calidad del producto y porque la mayoría produce para abastecer el mercado interno. Los principales países exportadores de flores de corte, bulbos, flores frescas, etc. son Holanda y Colombia, quienes en conjunto exportan más del 70 % de las flores que se comercializan en el mundo (Proexport, 2003; ASERCA, 2006).

Pese al potencial productivo con el que cuenta México en el sector de flores de corte, su participación en el mercado internacional es reducida, estimándose las exportaciones en menos

del 1 % del total mundial. Sin duda que esto no habla bien del sector florícola nacional, ya que aún cuando cuenta con todos los elementos a su favor [climas, suelos, costos de producción bajos, cercanía a uno de los mercados más importantes (Estados Unidos), etc.], el envío de flores al exterior es muy pobre en volumen y valor (ASERCA, 2006).

En México se producen alrededor de 50 tipos diferentes de flores (rosas, gladiolas, claveles y crisantemos representan el 56 % de la superficie cultivada y 89 % de la producción de flores) y se encuentra concentrada en el Estado de México, donde el municipio de Villa Guerrero es el principal productor nacional (ASERCA, 2006).

Las heliconias se usan como flores de corte y como plantas en macetas. Su empleo como plantas en macetas se restringe a especies de porte pequeño como *H. stricta* cv. ‘Dwarf Jamaican’ y se utilizan para decorar parques, edificios y jardines privados en áreas tropicales y subtropicales (Lekawatana y Criley, 1989; Castro y Graziano, 1997). El uso como flores de corte se ha popularizado en virtud de la larga vida en florero de sus inflorescencias y se emplean principalmente en arreglos florales.

Las heliconias de flor de corte se clasifican en chicas, medianas y grandes de acuerdo al tamaño de las inflorescencias. A las chicas pertenecen cultivares de *H. psittacorum* como ‘Lady Di’, ‘Sassy’, ‘St Vincent Red’, ‘Tay’ (Abalo, 1999; Criley, 1989; Geertsen, 1989). Dentro de las inflorescencias de tamaño mediano, la especie más versátil es *H. orthotricha* con sus diferentes variedades. Al grupo de heliconias grandes pertenece *H. caribaea*, la más sobresaliente junto con *H. bihai*. Las variedades de *H. chartacea* también son inflorescencias grandes de tipo colgante y, probablemente, son las más cotizadas en el mercado (Abalo, 1999; Criley *et al.*, 2003).

En México existen pocas áreas dedicadas al cultivo de las heliconias como flores de corte. Las superficies cultivadas se localizan en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz. Sin embargo, la floricultura mexicana ha carecido de un seguimiento estadístico por parte de las dependencias encargadas de hacer esta labor, de allí que resulte complicado conocer el panorama global del sector, donde se señale el área cultivada a nivel nacional, producción, rendimientos, número de productores, clasificación por superficie cultivada, tipo de flor que produce, etc. (ASERCA, 2006).

## 2.2 Técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una abreviación para el cultivo de protoplastos, células, tejidos y órganos. Estos diferentes tipos de cultivos tienen como factor común el cultivo de material vegetal libre de microbios en un medio ambiente aséptico y controlado. Esta técnica biotecnológica se ha convertido en una poderosa herramienta para la propagación y mejoramiento de muchas especies vegetales (Taji *et al.*, 2002; Thorpe, 2007).

Uno de los mayores impulsos para la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se le atribuye a los primeros trabajos de Morel (1960) sobre la propagación de orquídeas y al desarrollo y uso generalizado de un nuevo medio de cultivo con una alta concentración de sales minerales logrado por Murashige y Skoog (1962). Desde entonces esta tecnología se ha desarrollado extensamente y juega un papel clave en la propagación, mejoramiento vegetal e ingeniería genética.

Existen diversos tipos de cultivos *in vitro* dependiendo de los objetivos perseguidos. Dentro de ellos se pueden mencionar el de embriones (inmaduros), órganos (meristemas de brote y raíz, hoja, polen, anteras), callos, células en suspensión y protoplastos, entre otros (Taji *et al.*, 2002; Thorpe, 2007).

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* han jugado un papel importante en la producción y mejoramiento de cultivos hortícolas y su aplicación a la horticultura ornamental es paralela al desarrollo de las técnicas mismas. Este papel se ve reflejado en la producción de plantas libres de patógenos, almacenamiento de germoplasma, micropropagación y modificación vegetal (Debergh y Maene, 1981; Thorpe y Harry, 1997).

Las orquídeas fueron las primeras plantas hortícolas que se propagaron por cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y la mayoría se generó en tubos de ensayo. Después siguieron las plantas de follaje (*Ficus*, *Dracaena*, *Cordyline*, etc.) aunque las plantas de flores en maceta (*Anthurium*, *Saintpaulia*, *Spathiphyllum*) han tenido también un impacto considerable (Miller y Murashige, 1976, Debergh, 1994; Chandler y Lu, 2005).

Actualmente las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* abarcan mucho más que la propagación clonal y micropropagación. El rango de tecnologías se ha expandido hasta emplear a la embriogénesis somática en bioreactores para la propagación masiva. El mayor valor de estas tecnologías tiende no tan sólo a su aplicación en la propagación clonal, sino al mejoramiento vegetal, biología molecular y bioprocesos, así como la investigación (Altman, 2003; Kim *et al.*, 2003; Ziv, 2005; Taji y Lakshmanan, 2006; Rout *et al.*, 2006).

La micropropagación ahora se considera una tecnología de rutina. Muchas especies de plantas se han micropropagado tanto en laboratorios de investigación como en unidades de producción comercial. Entre los cultivos más propagados a gran escala se encuentran los plátanos, café, papaya y caña de azúcar (Josekutty *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004; Fitch *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006). También se han micropropagado una gran variedad de plantas ornamentales y de follaje siendo las orquídeas, gerberas, alstroemeria y helechos los grupos más beneficiados. Además, la micropropagación ha sido importante para la producción de plantas elite o libres de virus tales como fresas y uvas (Aswath *et al.*, 2003; Khare y Shukla, 2003; Pedraza-Santos *et al.*, 2006).

### 2.3 Totipotencia celular

La totipotencia celular es el potencial o capacidad inherente de una célula vegetal somática para desarrollarse en una planta completa si se estimula adecuadamente. La totipotencia implica que toda la información necesaria para el crecimiento y reproducción del organismo está contenida en la célula. Aunque todas las células son totipotentes, las células meristemáticas son las más capaces para expresarla (Krikorian y Simola, 1999; Razdan, 2003).

Esta totipotencia es una de las principales propiedades de las células vegetales, que asegura la posibilidad de sobrevivencia de las plantas bajo diferentes condiciones ambientales. La totipotencia de las células vegetales garantiza un amplio uso en la biotecnología. En condiciones *in vitro*, prácticamente cualquier célula viva, puede, después del período de dediferenciación y bajo la influencia de los componentes del medio de cultivo, iniciar la proliferación infinita en la forma de callos o cultivos en suspensión, iniciar la formación de brotes o raíces, o embriogénesis somática. Estudios recientes han logrado detectar que los genes que controlan el desarrollo

vegetal *in vivo* juegan un papel principal en la expresión de la totipotencia de las células vegetales *in vitro* (Ribnicky *et al.*, 2002; Ezhova, 2003).

## 2.4 Determinación y Competencia

En el desarrollo de los organismos, las células llegan a estar progresivamente comprometidas a destinos específicos. Este proceso llamado determinación involucra cambios fenotípicos estables que persisten en la ausencia del estímulo que lo inició. La determinación es un concepto difícil de describir porque sólo es comprensible cuando células, tejidos u órganos se someten a experimentación (Meins y Binns, 1979; Taiz y Zeiger, 2006).

Las células experimentan cambios estables, por ejemplo, el estado determinado persiste cuando las células son removidas del influjo que inició el cambio. La estabilidad es una característica esencial del proceso de determinación, ya que es la base para el compromiso de la célula y, porque las células alteradas establemente recuerdan su pasado, en consecuencia la naturaleza progresiva del desarrollo (Meins y Binns, 1979; Dhaliwal *et al.*, 2003).

La competencia es el potencial endógeno de una célula o tejido para desarrollarse en una vía particular. Las células o tejidos tienen la habilidad para recibir y responder a una señal del desarrollo. Esta competencia es vista como un estado fisiológico, celular o molecular de disposición para los siguientes pasos de la vía morfogénica particular. En la adquisición de la competencia las células primero no son competentes para responder a los estímulos organogénicos pero adquieren esta competencia durante una fase inicial de dediferenciación (Carman, 1990; De Klerk *et al.*, 1997; Che *et al.*, 2007).

La competencia es un prerrequisito para que se dé una determinación específica y resulta difícil separarla de la determinación misma. En un momento en particular, un tejido es competente para ciertos procesos de determinación y no para otros. No obstante, la determinación también involucra cambios en la competencia. Un ejemplo de la competencia son las células embriogénicas competentes que son capaces de desarrollarse por completo en embriones funcionales. El opuesto de competencia es no competente o incapaz morfogénicamente (Christianson y Warnick, 1983; Taiz y Zeiger, 2006).

## 2.5 Morfogénesis *in vitro*

Una de las cuestiones más elementales en la regeneración a partir de células somáticas es el entendimiento y esclarecimiento de los mecanismos que controlan los eventos del desarrollo. La morfogénesis vegetal *in vivo* e *in vitro*, es un proceso complejo del desarrollo. La morfogénesis se define como un cambio fisiológico y/o morfológico que permite la especialización de una célula, tejido, órgano o planta entera durante su desarrollo. La morfogénesis incluye el desarrollo de células que difieren de la célula madre y la diferenciación y arreglo de estas células en un orden definido es el resultado de la división celular de acuerdo a un plan y secuencia específicos. La organogénesis y embriogénesis somática representan las dos vías de regeneración *de novo* de plantas superiores a partir de tejidos y células (Litz, 1993; Ziv, 1999; Ramage y Williams, 2002).

### 2.5.1 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual células somáticas haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas características embriológicas sin que exista la fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986; Chugh y Khurana, 2002; Fehér, 2005; Ikeda *et al.*, 2006).

Durante este proceso una estructura bipolar, parecida a un embrión cigótico, se desarrolla de una célula no cigótica sin conexión vascular con el tejido original. Los embriones somáticos son usados para estudiar la regulación del desarrollo del embrión, y también son una herramienta para la propagación vegetativa a gran escala. La embriogénesis somática es un proceso de múltiples pasos que inicia con la formación de masas proembriogénicas, seguida por la formación del embrión somático, maduración, disecación y regeneración de la planta (Krikorian y Simola, 1999; von Arnold *et al.*, 2002; Jiménez, 2005).

### 2.5.2 Organogénesis *in vitro*

La organogénesis *in vitro* o diferenciación de brotes adventicios, es un proceso mediante el cual ocurre la formación de estructuras adventicias a partir de tejido ya diferenciado no meristemático (Sugiyama, 1999; Radice, 2004). La obtención de estos brotes puede ser de manera directa o indirecta. En la primera se pueden formar brotes directamente del explante, sin la formación de

callo. La segunda se refiere al cultivo de callos donde se inducen proliferaciones más o menos aleatorias a partir de explantes tomados de varias partes de la planta para formar brotes y raíces (Krikorian, 1993). La organogénesis *in vitro* ha sido ampliamente usada en la biotecnología vegetal tanto para la micropropagación *in vitro* y transformación genética, como en estudios del desarrollo vegetal (Zhang y Lemaux, 2004).

La organogénesis *in vitro* depende de la aplicación exógena de hormonas, en particular auxinas y citocininas y también de la habilidad del tejido para responder a esos cambios hormonales durante el cultivo (Sugiyama, 1999; 2000). La mayor proporción auxina-citocinina en el medio, normalmente induce la formación de raíces mientras que una proporción menor de auxina-citocinina promueve la formación de brotes. Por otro lado, un medio con una proporción intermedia auxina-citocinina promueve la proliferación celular desorganizada y la formación de callos (Skoog y Miller, 1957; Yamaguchi *et al.*, 2003).

En general, se reconocen tres fases de la organogénesis en base al requerimiento temporal para un balance específico de hormonas vegetales en el control de la organogénesis. En la primera fase, las células del explante adquieren la competencia. En la segunda, las células competentes en explantes cultivados son canalizadas y determinadas para la formación de un órgano específico bajo la influencia de hormonas vegetales. En la última fase, la morfogénesis continúa independientemente del suministro de fitohormonas (Sugiyama, 2000; Zhang y Lemaux, 2004).

## **2.6 Factores que afectan los procesos morfogénicos**

Para optimizar la frecuencia y calidad de la embriogénesis somática así como la inducción de la organogénesis, es necesario considerar factores internos y externos. Los internos incluyen el genotipo, el estado de desarrollo de la planta donadora y el explante. Los extrínsecos comprenden el entorno del cultivo, el suministro de nutrimentos orgánicos e inorgánicos, fitohormonas y las condiciones físicas (como el medio de cultivo), pH, humedad, luz, temperatura y potencial osmótico (Ramage y Williams, 2002; Phillips, 2004; García *et al.*, 2007).

### 2.6.1 El genotipo

El factor que más influye en la morfogénesis *in vitro* es el genotipo, puesto que el material vegetal tiene la habilidad genética para producir la respuesta deseada. Algunas especies o cultivares regeneran brotes o producen embriones somáticos con una estimulación exógena relativamente pequeña, mientras que otras no. Incluso, dentro de una misma especie existen notables diferencias entre subespecies y cultivares, por lo que la formulación de un simple medio de cultivo, frecuentemente, es inadecuada para la estimulación de la morfogénesis. Estas diferencias provocan que especies de ciertas familias sean difíciles de regenerar ya sea por vía embriogénica u organogénica (Litz, 1993; Tiwari *et al.*, 2004).

### 2.6.2 El explante

El tipo de explante elegido, tamaño, edad fisiológica y la forma en la cual se cultivan, pueden afectar el inicio satisfactorio de los cultivos o la inducción de la morfogénesis *in vitro*. Se deben utilizar explantes provenientes de plantas cultivadas en invernadero para reducir las tasas de contaminación. También se recomienda evitar el uso de explantes de raíces y rizomas que proceden de plantas de maceta o del campo debido a que la esterilización se dificulta (Pierik, 1999; Nhut *et al.*, 2007).

La edad fisiológica es de gran influencia en la morfogénesis, por ello cuanto más joven e indiferenciado se encuentre el explante, mejor será su respuesta *in vitro*. En consecuencia, los meristemas apicales y axilares se usan ampliamente en numerosas especies. En el caso de especies leñosas, la micropropagación tiene mayores posibilidades de éxito cuando los tejidos son jóvenes que cuando son maduros (Pierik, 1999; Hoque y Mansfiel, 2004).

Respecto al tamaño del explante, cuanto más grande sea éste mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, también son mayores las probabilidades de contaminación de los cultivos por microorganismos. Es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios de cultivo complejos (Salazar y Sarga, 1988; Taji *et al.*, 2002).

La época del año es un factor que suele tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente se asocia con el grado de dormición que presentan ciertos explantes (p.e. yemas) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos (Molina *et al.*, 2002; Prabakaran *et al.*, 2003; Radice, 2004).

### **2.6.3 Ambiente químico: Medio de cultivo y sus componentes**

El éxito del cultivo de tejidos vegetales es influenciado, en gran medida, por el medio de cultivo utilizado. Este medio de cultivo no solo debe proveer macro y micronutrientes, sino también una fuente de carbohidratos, normalmente sacarosa, para remplazar el carbón que las plantas fijan de la atmósfera por la fotosíntesis. Los mejores resultados se obtienen adicionando algunos compuestos orgánicos (vitaminas, aminoácidos, etc.) y fitohormonas (Williams, 1993; Ramage y Williams, 2002; Niedz y Evens, 2007).

#### **2.6.3.1 Macronutrientes**

Los macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) proveen los elementos más indispensables para el desarrollo de las plantas y constituyen al menos el 0.1 % del peso de materia seca de las plantas. El paso más importante en el manejo de un medio cultivo de tejidos es la selección de iones macronutrientes en la concentración y balance correctos (George y Sherrington, 1984; Williams, 1993; Razdan, 2003).

El N comúnmente se suministra como una mezcla de iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Al suministrar el N en forma de iones de amonio éste se puede incorporar directamente a las macromoléculas, mientras que los nitratos deben ser reducidos antes de su incorporación. En concentraciones elevadas, los iones amonio pueden ser tóxicos y ocasionar la acidificación del medio, además de causar problemas de vitrificación. El fósforo normalmente se suministra como ión fosfato y altas concentraciones pueden producir la precipitación de elementos en fosfatos insolubles (Gamborg, 2002; Razdan, 2003).

#### **2.6.3.2 Micronutrientes**

Los elementos hierro, manganeso, zinc, cobre, molibdeno, yodo, boro, cobalto y níquel, son requeridos en pequeñas cantidades para el desarrollo de las plantas y actúan como cofactores e

inductores de la síntesis de enzimas. El hierro se agrega al medio de cultivo como sulfato de hierro, combinado con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El complejo EDTA-Fe permite la liberación lenta y continua de este elemento en el medio, sin este complejo el hierro puede precipitarse en el medio como óxido férrico (Endress, 1994; Gamborg, 2002).

### **2.6.3.3 Suplementos orgánicos (vitaminas y aminoácidos)**

Las vitaminas son sustancias requeridas por las células vegetales para llevar a cabo ciertos papeles catalíticos en el metabolismo. De manera natural, las plantas son capaces de sintetizar sus propios requerimientos, pero bajo cultivo *in vitro* no necesariamente ocurre así (George y Sherrington, 1984). Generalmente, la cantidad de vitaminas sintetizadas, incluso en tejidos y células fotosintéticamente activos, es insuficiente para asegurar el suministro. Por lo tanto, al menos las vitaminas del grupo B como tiamina, piridoxina y ácido pantoténico, pero también biotina y mio-inositol, deben adicionarse al medio de cultivo (Endress, 1994; Razdan, 2003).

El ácido ascórbico se considera benéfico en algunos casos, debido probablemente a su capacidad para actuar como un agente reductor y para retrasar la formación de sustancias similares a la melanina, que inhiben el crecimiento (Krikorian, 1993; Stasolla *et al.*, 2006).

Los aminoácidos proveen a las células vegetales una fuente de N disponible rápidamente y su absorción también puede ser más rápida que el N inorgánico en el mismo medio. Al parecer no todos los aminoácidos son importantes para el desarrollo *in vitro* y los requerimientos varían de acuerdo al tejido u órgano. El aminoácido más utilizado es la glicina pero su inclusión no es esencial. La caseína hidrolizada se puede emplear como una fuente económica de una mezcla de aminoácidos. También en algunos casos se pueden utilizar arginina, asparagina, ácido aspártico, alanina, ácido glutámico y prolina (George y Sherrington, 1984; Gamborg, 2002).

### **2.6.3.4 Fuente de carbono**

La fuente de carbono es un componente importante en cualquier medio de cultivo y es esencial para el desarrollo *in vitro*, ya que las condiciones de cultivo son poco apropiadas para la fotosíntesis. La sacarosa, como fuente de carbono, es fácilmente asimilable por las plantas, ya que se transporta de manera natural, y es relativamente estable además de ser económica, por lo

tanto, es la más comúnmente utilizada. También se pueden emplear otros carbohidratos tales como glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol (Gamborg, 2002, Razdan, 2003).

### **2.6.3.5 Agentes gelificantes**

Los medios de cultivo para el cultivo *in vitro* de tejidos pueden ser en forma líquida o sólida, dependiendo del objetivo que se persiga. Para cualquier tipo de cultivo, ya sea de células o tejido, que requiera cultivar en la superficie del medio, debe ser gelificado. El agar, producido a partir de algas marinas, es el tipo de gelificante ideal y más comúnmente empleado. Sin embargo, debido a que es un producto natural, su calidad puede variar (Gamborg, 2002; Ramage y Williams, 2002).

El agar disuelto forma un gel capaz de retener el agua y adsorber compuestos. Si la concentración de agar se incrementa, resulta más difícil para los explantes establecer contacto con el medio, con lo que se limita la absorción de los compuestos. El tipo y la concentración de agentes gelificantes pueden afectar sustancialmente la efectividad de varios sistemas de cultivo de tejidos (Pierik, 1999; Mohamed-Yasseen, 2001).

### **2.6.3.6 Regulación hormonal de la morfogénesis *in vitro***

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, la manipulación eficiente de la morfogénesis depende en gran medida del uso apropiado de hormonas vegetales (HV) (Jiménez, 2005; Taji y Lakshmanan, 2006). Los estudios sobre la función de las HV llegan a ser complejos debido a que varias de ellas típicamente actúan de forma conjunta con otras y sus concentraciones en la planta cambian con el tiempo, estación y etapa de desarrollo. Algunas HV son sintetizadas localmente por las células para su propio consumo, mientras que otras son sintetizadas en un órgano y transportadas a otras partes de la planta para una acción específica. Las HV producidas por las plantas pertenecen a las HV endógenas. Sin embargo, se han identificado versiones naturales y sintéticas de hormona y se suministran comúnmente a cultivos de plantas y tejidos y se denominan hormonas exógenas (Gaspar *et al.*, 1996; Gaba, 2005; Lakshmanan *et al.*, 2006).

El suministro de hormonas exógenas al medio de cultivo estimula las respuestas que se desean de los tejidos vegetales. Los diferentes análogos de hormonas tienen diversos efectos dependiendo de la estructura química, tejido vegetal y genotipo. Algunas veces es necesario mezclar varias

hormonas de la misma clase o diferentes para obtener los resultados deseados o para dar tratamientos secuenciales con diferentes hormonas. Existen cinco mayores grupos de fitohormonas endógenas: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. La mayoría de estos grupos tienen múltiples funciones en el desarrollo vegetal y se emplean para manipular la morfogénesis en los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* (Tétu *et al.*, 2003; Thomas y Jiménez, 2005).

#### 2.6.3.6.1 Auxinas

La primera fitohormona aislada fue la auxina ácido indol-3-acético (IAA). El IAA es degradado rápidamente tanto en el medio de cultivo como en la planta, por lo que a menudo se utilizan los análogos químicos por ser más estables. Las auxinas sintéticas usadas frecuentemente son el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3-indol butírico (IBA) y el ácido 1-naftalenacético (ANA) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Auxinas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*\*.**

Nombre químico	Nombre abreviado
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D
Ácido 2,4,5- triclofenoxiacético	2,4,5-T
Ácido 2-metoxi-3,6- diclorobenzoico	Dicamba
Ácido indol-3-acético	AIA
Ácido indol-3 butírico	IBA
Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético	MCPA
Ácido 1-naftalenacético	ANA
Ácido 4-amino-2,5,6-tricloropicolínico	Picloram

\*Fuente: Gamborg, 2002.

Las auxinas tienen múltiples funciones en el cultivo de tejidos dependiendo de su estructura química, concentración y el tejido vegetal. Las auxinas causan la producción de callos, raíces y el crecimiento de tallos. Generalmente, estimulan la elongación celular, división celular en tejido de cambium y, junto con las citocininas, estimulan la diferenciación de xilema y floema. La función esencial de las auxinas y citocininas es reprogramar a las células somáticas que previamente estaban en un estado determinado de diferenciación. Esta reprogramación causa la

dediferenciación y, después, rediferenciación en una nueva ruta del desarrollo. En concentraciones elevadas, las auxinas exógenas pueden inducir la embriogénesis somática, aunque también pueden ser tóxicas debido a que estimulan la producción de etileno, el cual inhibe el crecimiento (Gaba, 2005; Zeng *et al.*, 2007).

#### 2.6.3.6.2 Citocininas

Las citocininas promueven la división celular, misma que conduce a la regeneración *in vitro* de brotes, mediante la estimulación de la formación del meristemo apical de brote y, subsecuentemente, yemas de brotes. Las citocininas regulan las transiciones G1-S y G2-M. Esta regulación de G1-S se sustenta por el aumento de la ciclina G1, ciclina D3 y que la expresión constitutiva de la ciclina D3 causa crecimiento de callos independiente de citocininas en *Arabidopsis*. La regulación de la transición de G2-M, probablemente es mediada por la activación de CDK promovida por las citocininas a través de la desfosforilación de la CDK (Kakimoto, 2003; Rashotte *et al.*, 2005; Sakakibara, 2006).

La primera citocinina aislada fue la cinetina (kin) y poco después se identificó a la adenina como poseedora de actividad citocinina considerable. La zeatina y el N<sup>6</sup>-(2-isopentenil) adenina (2iP) son dos citocininas encontradas de manera natural y a menudo se utilizan en el cultivo de tejidos. También es común emplear citocininas sintéticas como el 6-benziladenina (BA) y el tidiazurón (TDZ) (Cuadro 2) (Murthy *et al.*, 1998; Gaba, 2005; Couselo *et al.*, 2006).

**Cuadro 2. Citocininas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*\*.**

Nombre químico	Nombre abreviado
6-benciladenina ó 6-bencilaminopurina	BA ó BAP
N <sup>6</sup> -(2-isopentil) adenina	2iP
6-furfurilaminopurina	Kin
1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-yl) urea	Tidiazurón
4-hidroxi-3-metil-trans-2-butelinaminopurina	Zeatina

\*Fuente: Gamborg, 2002.

El BA afecta el crecimiento de células vegetales donde la base de BA es un derivado de adenina con una sustitución en la sexta posición del núcleo de purina y se ha encontrado de manera

natural como una citocinina libre. Se ha demostrado que este compuesto afecta el metabolismo vegetal y a una amplia variedad de respuestas fisiológicas (Matsubara, 1990; van Standen y Crouch, 1996). El BA aplicado en forma de base es la citocinina más frecuente y eficientemente utilizada en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, incluso, más que la cinetina o la zeatina (Krikorian, 1993). El estudio de proteínas unidas a citocininas (cytokinin-binding) han implicado más directamente a las bases de citocininas como una de las formas más activas (van Standen y Crouch, 1996).

El TDZ es uno de los sustitutos de urea estudiados por su actividad citocinina y se considera el más potente de las difenilureas que se ha evaluado para su uso en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Concentraciones bajas ( $< 1 \mu\text{M}$ ) pueden inducir la producción de yemas axilares más que otras citocininas, sin embargo, también pueden inhibir el alargamiento de brotes. En algunos casos, para el alargamiento, es necesario transferir los brotes a un medio de cultivo que contenga bajas concentraciones de TDZ y/o una citocinina menos activa (Thomas y Katterman, 1986; Huetteman y Preece, 1993; Lu, 1993; Murthy *et al.*, 1998).

Las concentraciones mayores a  $1 \mu\text{M}$  puede estimular la formación de callos, brotes adventicios o embriones somáticos. El principal efecto no deseado del TDZ es que los cultivos de algunas especies ocasionalmente forman brotes fasciados. La alta actividad citocínica y la respuesta positiva de especies leñosas al TDZ lo proponen entre las citocininas más activas para la manipulación *in vitro* de muchas especies leñosas (Huetteman y Preece, 1993; Campos *et al.*, 2001; Tomsone *et al.*, 2004).

#### 2.6.3.6.3 Giberelinas

Las giberelinas son otra clase de PGRs con cerca de 100 variantes identificadas en diversas fuentes, aunque todas se basan en la estructura del gibano. La actividad de las giberelinas aplicadas exógenamente varía con el tipo de giberelina y la especie vegetal. La giberelina más utilizada en el medio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es el  $\text{GA}_3$ , comúnmente conocida como ácido giberélico. Aunque las giberelinas tienen importantes papeles en el ciclo de vida de las plantas, en el cultivo de tejidos el  $\text{GA}_3$  generalmente se usa para estimular la elongación de brotes o la conversión de yemas a brotes. El  $\text{GA}_3$  interfiere con la iniciación de yemas en la primeras etapas de formación del meristemo y, por consiguiente, puede reducir la producción de

brotos *in vitro* si se suministra en la etapa de iniciación de yemas de brotes. De manera similar, el GA<sub>3</sub> reduce la formación de raíces y la embriogénesis *in vitro*. Por lo tanto, para usos prácticos, es necesario optimizar los efectos del GA<sub>3</sub> en etapas específicas. También pueden tener un papel importante en la organogénesis, al estimular la diferenciación de yemas, aunque generalmente inhiben la diferenciación (Ogas, 1999; Aké *et al.*, 2007).

#### 2.6.3.6.4 Ácido Abscísico

El ácido abscísico (ABA) se utiliza en el cultivo de tejidos para facilitar la maduración de embriones somáticos. En ciertas especies, los embriones no pueden madurar adecuadamente por la ausencia de ABA exógeno. El ABA endógeno funciona similarmente durante el desarrollo de semillas en mono y dicotiledóneas y en coníferas. El ABA induce la formación de proteínas esenciales LEA presentes en las etapas finales de la embriogénesis somática y sexual. Ocasionalmente, el ABA puede estimular algunos procesos de regeneración y raramente pueden reducir la producción de embriones somáticos (von Aderkas *et al.*, 2002; Stasolla y Yeung, 2003).

#### 2.6.3.6.5 Etileno

El etileno es un gas natural que se asocia comúnmente con el control de la maduración de frutos climatéricos y su uso en el cultivo de tejidos vegetales no es amplio. Algunos cultivos producen etileno, el cual, si se produce en concentraciones elevadas puede inhibir el desarrollo del cultivo. El etileno en concentraciones elevadas puede estimular la formación de callos pero reduce la regeneración de yemas y brotes. La embriogénesis somática puede ser afectada por la concentración de etileno, ya que concentraciones bajas la estimulan y las elevadas la inhiben. La formación de raíces y bulbos puede depender de una concentración adecuada de etileno en el frasco de cultivo (Biddington, 1992; Arigita *et al.*, 2003).

#### 2.6.3.6.6 Nuevos reguladores de crecimiento vegetal

Recientemente, muchos compuestos presentes de forma natural tales como las poliaminas, oligosacarinas, salicilatos, jasmonatos, esteroides, brasinoesteroides, alcoholes dehidrodiconiferil, turgorinas, sisteminas y varios inhibidores de crecimiento han mostrado tener actividad parecida

a las hormonas. También, muchos nuevos productos relacionados estructuralmente se están empezando a sintetizar para varias aplicaciones agrícolas. Mientras algunos de ellos han sido extremadamente efectivos en la organogénesis *in vitro* (p.e. tidiazurón, paclobutrazol), poco se conoce acerca del potencial organogénico de muchos de los nuevos reguladores de crecimiento identificados, por lo que se requiere de mayor investigación (Chiancone *et al.*, 2006; Taji y Lakshmanan, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

## **2.6.4 Ambiente físico**

### **2.6.4.1 Temperatura**

En general, se ha encontrado que un rango de temperatura de  $26 \pm 3$  °C es el óptimo para el desarrollo de los cultivos. Las temperaturas mayores a 30 °C, especialmente superiores a 53 °C y por debajo de 21 °C influyen negativamente en el desarrollo. Diferentes temperaturas tienen un efecto pronunciado sobre el contenido de ácidos grasos en los cultivos (Endress, 1994; Razdan, 2003).

### **2.6.4.2 Humedad relativa**

La humedad relativa (HR) es la medida de la cantidad de vapor de agua contenida en la atmósfera gaseosa y constituye otro de los parámetros físicos que se deben tomar en cuenta. La HR dependerá del sello o cobertura del envase empleado, ya que si este cierre es hermético, la humedad interior será del 100 %. Si existe la posibilidad de un intercambio gaseoso, la humedad interna puede descender a niveles cercanos al 50 %. Este importante descenso del contenido de HR puede promover una pérdida veloz de agua del medio de cultivo, variando la concentración de sus compuestos hasta llegar a valores tóxicos (Radice, 2004).

### **2.6.4.3 Luz**

La luz suministrada a los cultivos debe ser evaluada en términos de calidad, intensidad y período de suministro. La respuesta morfogénica de un explante puede variar de acuerdo al suministro de luz. Para estimular la formación de callo comúnmente se prefiere la oscuridad y la luz favorece la diferenciación de órganos. La longitud de onda, densidad de flujo y tiempo de exposición son los

parámetros de la luz que más influyen en la morfogénesis *in vitro* (Radice, 2004; Reuvenil y Evenor, 2007).

## 2.7 Cultivo *in vitro* de heliconias

La principal forma de propagación de las heliconias es la vegetativa mediante la división de rizomas y es la mejor vía para mantener las selecciones clonales deseadas (Criley, 1989). Sin embargo, este tipo de propagación no permite la importación de nuevas variedades debido a la presencia de hongos y bacterias, siendo la más importante *Ralstonia* (Madriz *et al.*, 1991).

La SAGARPA (1998), en la Norma Oficial Mexicana NOM-068-FITO-1998, establece los requisitos fitosanitarios y especificaciones para la importación de material vegetal propagado y restringe la importación de rizomas de los países productores, por el riesgo que representa *Ralstonia solanacearum*, causante del moko bacteriano del plátano. Además se ha descubierto que algunas especies como *Heliconia psittacorum* L. son hospederas del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka-Negra del banano (Gasparotto *et al.*, 2005).

La propagación por semillas es una de las formas menos eficiente, debido a que el endospermo que protege al embrión representa una barrera para la germinación que puede ir desde tres meses hasta tres años, dependiendo de la especie, además, la progenie obtenida mediante semillas es variable (Criley, 1988; Atehortua, 1997; Simão y Scatena, 2003).

El uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es otro de los métodos de propagación utilizados en heliconias mediante el empleo de meristemas apicales y yemas laterales. Mediante el uso de estas técnicas se ha observado que las plantas propagadas *in vitro* producen más vástagos que las propagadas por rizomas, además de ser plantas libres de patógenos (Nathan *et al.*, 1992; Goh *et al.*, 1995).

Una de las limitantes del cultivo *in vitro* es que cada especie posee sus propios requerimientos nutricionales y técnicos y no siempre responden de la misma forma a la micropropagación, además los ápices de rizomas que crecen subterráneos son difíciles de esterilizar y se convierte en uno de los mayores problemas en la micropropagación de heliconias, aunado a una infección sistémica como un incentivo adicional (Pedersen y Brandt, 1992).

Nathan *et al.* (1992), fueron los primeros en reportar el cultivo *in vitro* de heliconias al propagar *Heliconia psittacorum* L.f. empleando como explantes yemas axilares y apicales. Los cultivos se iniciaron en medio MS (1962) modificado, con 9 mg L<sup>-1</sup> BA, 150 mL de agua de coco L<sup>-1</sup>, 30 g de sacarosa L<sup>-1</sup> y 2 g de Gelrite<sup>®</sup> L<sup>-1</sup>. La multiplicación de los brotes se hizo en el medio suplementado con 2.25 mg L<sup>-1</sup> BA. Los brotes fueron enraizados en el medio básico de MS y eficientemente aclimatados en condiciones de invernadero.

Nathan *et al.* (1993) obtuvieron una alta frecuencia de regeneración de plántulas inducidas de callos derivados de ápices de brotes y secciones transversales cultivados *in vitro* de *Heliconia psittacorum* L.f. Los callos nodulares finos se iniciaron en la oscuridad en el medio MS (1962) semisólido suplementado con carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>), caseína hidrolizada (1.0 g L<sup>-1</sup>) y 2,4-D (17.6 mg L<sup>-1</sup>). El mantenimiento de callos regenerativos a largo plazo fue posible reduciendo la concentración de 2,4-D en el medio y subcultivándolos a intervalos de seis semanas. El desarrollo y regeneración de protocormos a plántulas ocurrió cuando el 2,4-D se excluyó del medio.

Goh *et al.* (1995), emplearon plántulas *in vitro* obtenidas por Nathan *et al.* (1992), para desarrollar un sistema rápido y flexible para la propagación de *Heliconia psittacorum* usando secciones delgadas (1 mm) de la base de plántulas. Al cultivar los explantes en medio MS (1962) en presencia de 2,4-D (2.2 mg L<sup>-1</sup>), éstos produjeron plántulas con raíz. Concentraciones de 8.8-17.6 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D indujeron la formación de callos morfogénicos y cuando se subcultivaron en el medio basal, los callos produjeron cuerpos en forma de protocormos que se desarrollaron en plántulas.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad y en el Laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

#### 3.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *H. bihai* L. cv. 'Pink Peach', *H. collinsiana* Griggs, *H. nickeriensis* Mass & Rooij, *H. platystachys* Baker cv 'Sexy Orange', *H. psittacorum* L.f. cv. 'Sassy', *H. psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta cv. 'Golden Torch' y *H. wagneriana* Peterson. Todo el material vegetal aquí empleado fue proporcionado por la finca las Abejas de Tacotalpa, Tabasco y procedían directamente del campo (Figura 4).

***H. bihai* cv. 'Pink Peach'**. Es una heliconia erecta dística que produce inflorescencias durante todo el año con picos marcados de noviembre a abril. Mide de 2-4 m de altura y se adapta bien para su cultivo a pleno sol. La inflorescencia está formada de cuatro a siete brácteas de color rojo en tres cuartas partes de las brácteas, la primera bráctea es de color amarillo y verde con tonalidades rojas. Su hábito de crecimiento es de tipo musoide (Figura 4A).

***H. collinsiana***. Es una heliconia colgante cuya floración tiene un período marcado entre los meses de julio a noviembre. Mide de 3 a 4.5 m de altura y se adapta bien en áreas con 50 % de sombra. La inflorescencia consta de seis a 18 brácteas de color rojo brillante, cubiertas de cera blanca; el raquis es de color rojizo y su hábito de crecimiento es de tipo musoide (Figura 4B).

***H. nickeriensis***. Es una heliconia erecta dística que florece de junio a noviembre. Mide de 1.2-3.0 m de altura y se adapta bien desde pleno sol hasta 40 % de sombra. La inflorescencia consta de cinco a nueve brácteas de color rojo-rosado y el raquis es de color amarillo distalmente y rosa hacia abajo. Sépalos de color dorado. Ovario de color amarillo oscuro distalmente y amarillo claro hacia abajo. Pedicelo amarillo claro. Es una heliconia estéril (Figura 4C).

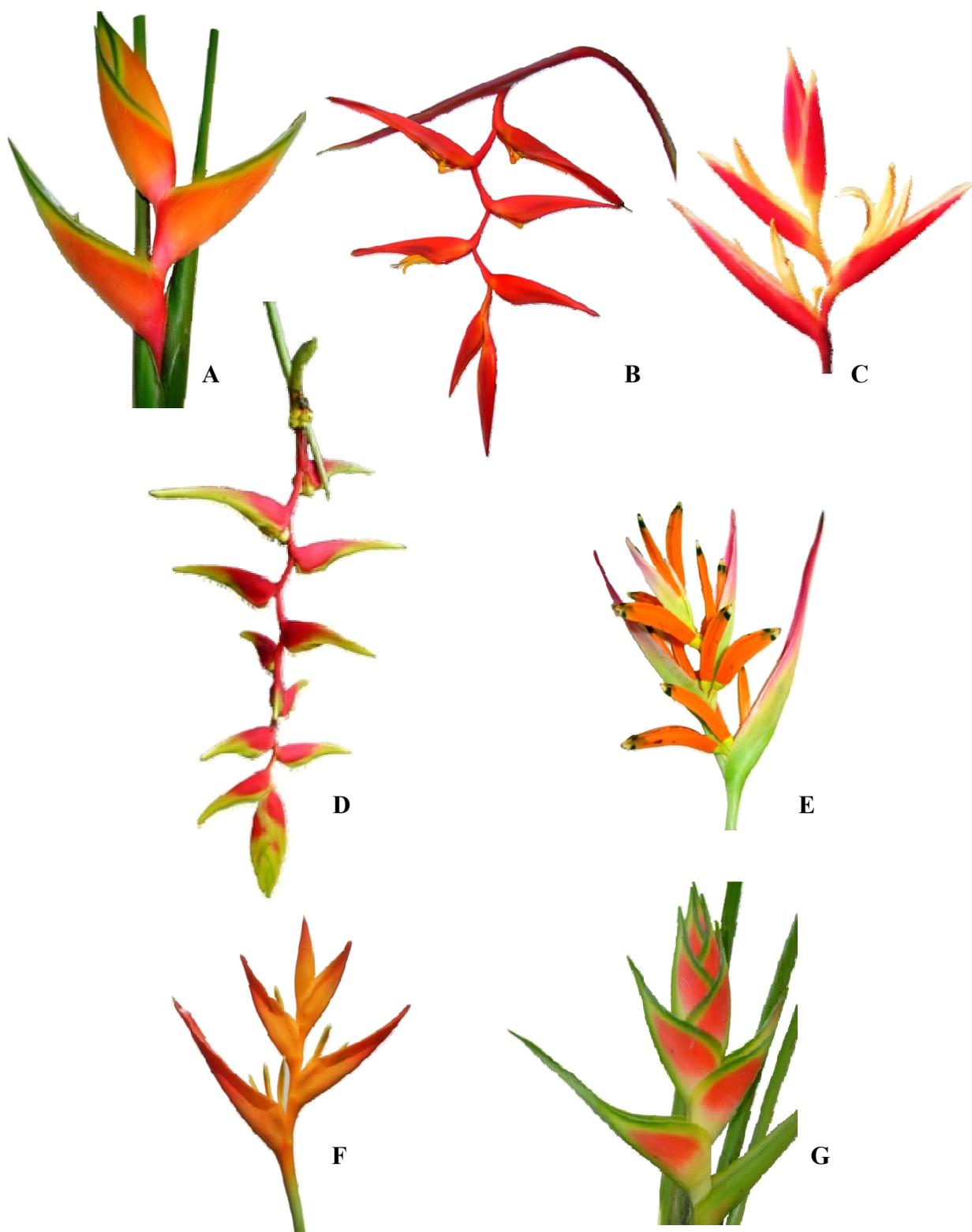


Figura 4. Inflorescencias de heliconias utilizadas como explantes en la inducción de organogénesis directa *in vitro*. (A) *H. bihai* cv. 'Pink Peach', (B) *H. collinsiana*, (C) *H. nickeriensis*, (D) *H. platystachys* cv. 'Sexy Orange', (E) *H. psittacorum* cv. 'Sassy', (F) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'; y (G) *H. wagneriana*. Fuente: Elaboración propia.

***H. platystachys* cv. ‘Sexy Orange’.** Es una heliconia colgante que tiene un período de floración marcado entre los meses de julio a septiembre. Mide de 4-5 m de altura y se adapta bien al cultivo con 50 % de sombra. Su inflorescencia consta de ocho a 18 brácteas con márgenes de color amarillo y base roja con flores amarillas. Raquis de color amarillo rojizo. Su hábito de crecimiento es de tipo musoide (Figura 4D).

***H. psittacorum* cv. ‘Sassy’.** Es una heliconia erecta dística que florece durante todo el año. Mide de 1-2 m de altura y se adapta a pleno sol y hasta 40 % de sombra. La inflorescencia consta de cuatro a ocho brácteas de color rosa a rojizo y el raquis de color amarillo verdoso. Sépalos de color dorado con la punta débilmente verde oscuro. Ovario de color dorado. Pedicelo amarillo con tintes verdes. Su hábito de crecimiento es de tipo musoide y es una heliconia estéril (Figura 4E).

***H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’.** Heliconia erecta dística que florece todo el año. Mide 0.7 a 1.5 m de altura y se adapta bien a pleno sol y hasta 40 % de sombra. La inflorescencia consta de cuatro a ocho brácteas de color dorado o amarillo, con el raquis de color dorado. Sépalos de color dorado con la punta débilmente verde. Ovario de color dorado. Pedicelo amarillo con tintes verdes. Es de crecimiento musoide y es una heliconia estéril (Figura 4F).

***H. wagneriana*.** Es una heliconia erecta dística que florece durante el año en condiciones ambientales propicias. Mide de 3 a 4.5 m de altura y se adapta bien en áreas con 10 % de sombra. La inflorescencia consta de seis a 20 brácteas de color rojo, contorneadas de amarillo y verde, alternas, que encierran pequeñas flores tubulares apenas sobresalientes formadas por tres sépalos y tres pétalos. Raquis de color amarillo claro. Su hábito de crecimiento es de tipo musoide (Figura 4G).

### 3.2 Medio de cultivo

En todos los experimentos de la investigación se usó el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) (MS) adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), agar (Merck®, 6.3 g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (200 mg L<sup>-1</sup>) y tiamina (2 mg L<sup>-1</sup>). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N, mediante un potenciómetro (Orion pH meter modelo 420). La esterilización del medio de cultivo se hizo en una autoclave vertical (AESAs, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min.

### 3.3 Condiciones de incubación

Los frascos de cultivo con el material sembrado de todos los experimentos se mantuvieron en un cuarto de incubación con fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad proporcionado por lámparas de luz blanca fría fluorescente de 75 W, cuya irradiancia fotosintética es de  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 30 %.

### 3.4 Establecimiento del cultivo aséptico

#### 3.4.1 Origen de los explantes

Se evaluaron ápices de inflorescencias, frutos inmaduros y yemas laterales.

##### 3.4.1.1 Ápices de inflorescencias y frutos inmaduros

El cultivo aséptico se estableció a partir de frutos inmaduros (10 mm de longitud) y ápices de inflorescencias (10 mm de longitud) de *H. nickeriensis*, *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’ y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ (Figura 5), los cuales se lavaron por 5 min con detergente comercial en agitación continua y, después de cinco enjuagues con agua destilada se sumergieron en una solución fungicida compuesta por Benlate<sup>®</sup> (4 g L<sup>-1</sup>) + Captán<sup>®</sup> (4 g L<sup>-1</sup>) durante 20 min, y enseguida se enjuagaron con agua destilada estéril. Luego se colocaron en una mezcla compuesta por bactericida a base de plata coloidal estable a 0.048% (Microdyn<sup>®</sup>, 3% v/v) + hipoclorito de sodio comercial Cloralex<sup>®</sup> (6% de cloro activo; 20% v/v) + Tween<sup>®</sup> 20 (4%, v/v), durante 15 min. Por último, se enjuagaron ocho veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos de los agentes desinfectantes.

Los explantes esterilizados se colocaron de forma individual en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 10 mL del medio básico MS (1962) (inciso 3.2) adicionado con diferentes concentraciones de BA (0, 5.0, 10.0 y 15.0 mg L<sup>-1</sup>), y se incubaron en las condiciones señaladas en el inciso 3.3.

### 3.4.1.2 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Los datos reunidos en los experimentos se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño completamente al azar, con 15 repeticiones por tratamiento; cada repetición estuvo constituida por un frasco de vidrio con un fruto inmaduro o un ápice de inflorescencia. Tal análisis se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ ).

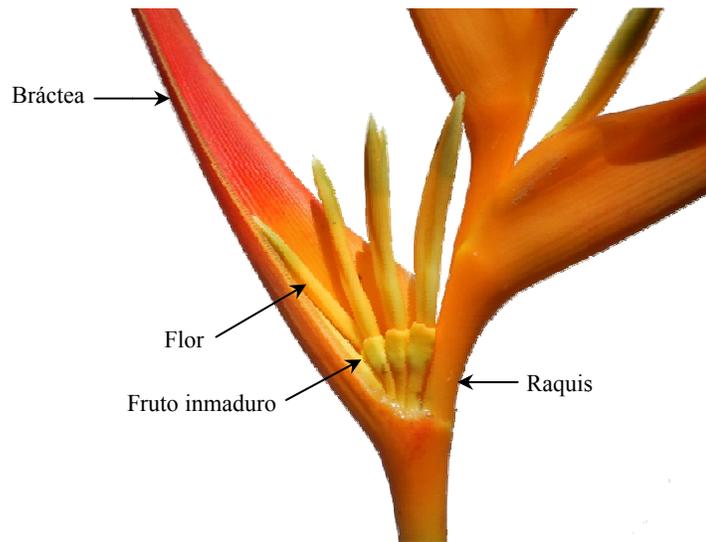


Figura 5. Frutos inmaduros de *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' usados como explantes.

### 3.4.1.3 Yemas laterales

Se utilizaron plantas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis*, *H. psittacorum* cv. 'Sassy', *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y *H. wagneriana*. Sin embargo, por la disponibilidad de material vegetal las pruebas de esterilización de yemas laterales se llevaron a cabo con *H. nickeriensis*. Las pruebas se condujeron de forma independiente a intervalos de 30 d y cada una de ellas se planteó en función de los resultados obtenidos en la anterior. Se extrajeron yemas laterales con una longitud entre 1.5–2.0 cm (Figura 6) y se lavaron con detergente comercial por 5 min en agitación continua. Se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y

se sometieron a tratamientos de esterilización con fungicidas (Captan® y Benlate®), hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®), bactericida (plata coloidal) y surfactante (Tween® 20) (Cuadro 3).

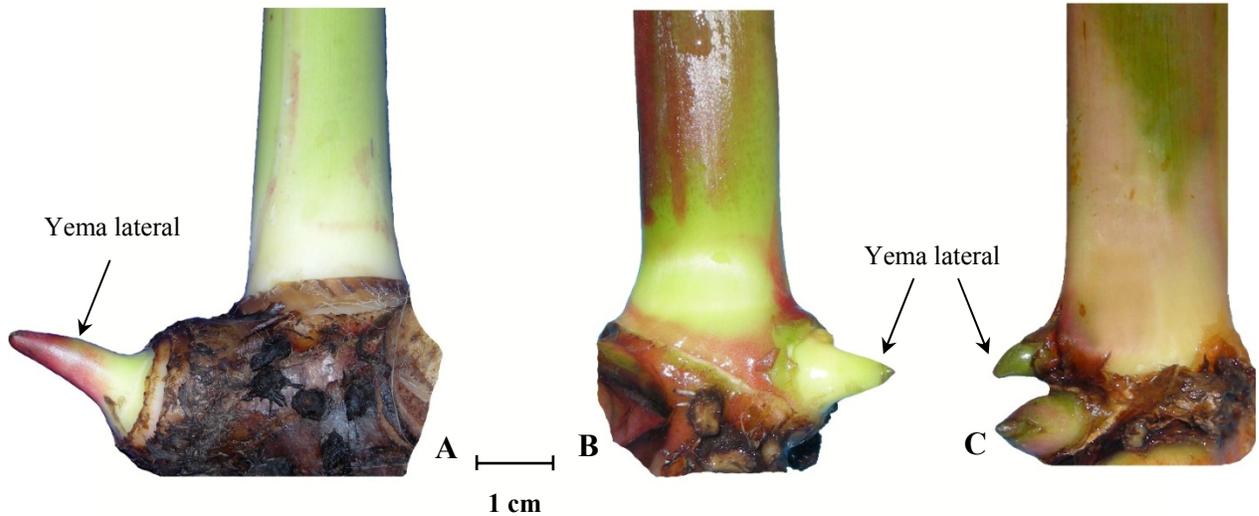


Figura 6. Rizomas con yemas laterales después de su almacenamiento durante 10 d en bolsas de polietileno a temperatura ambiente. (A) *H. collinsiana*; (B) *H. nickeriensis*, (C) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’.

Cuadro 3. Tratamientos probados para la desinfección de yemas laterales de *H. nickeriensis*.

Tratamiento	Procedencia de rizomas	Benlate® (4 g L <sup>-1</sup> ) + Captán® (4 g L <sup>-1</sup> ) (min)	Benlate® (4 g L <sup>-1</sup> ) (min)	NaClO (30%, v/v) + Tween® 20 (4%, v/v)	
				+ Plata coloidal (1.5 % v/v) (min)	+ Plata coloidal (3%, v/v) (min)
1	Campo <sup>+</sup>	20	15	10	-
2	Bolsas polietileno <sup>++</sup>	20	15	10	-
3	Campo <sup>+</sup>	20	15	15	-
4	Bolsas polietileno <sup>++</sup>	20	15	15	-
5	Campo <sup>+</sup>	20	15	20	-
6	Bolsas polietileno <sup>++</sup>	20	10	10	-
7	Bolsas polietileno <sup>++</sup>	15	-	-	15
8	Bolsas polietileno <sup>++</sup>	-	-	-	15

<sup>+</sup> Las yemas se extrajeron de rizomas que procedían directamente del campo.

<sup>++</sup> Las yemas se extrajeron de rizomas que procedían de campo y que se almacenaron durante 10 d en bolsas de polietileno a una temperatura de 27 ± 2 °C.

**Tratamiento 1.** Las yemas laterales de *H. nickeriensis*, provenientes de rizomas extraídos directamente del campo, se sumergieron en una solución fungicida de Benlate® (4 g L<sup>-1</sup>) + Captán® (4 g L<sup>-1</sup>) durante 20 min; después se colocaron por 15 min en una solución de Benlate® (4 g L<sup>-1</sup>) y finalmente se pasaron a una solución compuesta por NaClO (30%, v/v) + plata coloidal (1.5 % v/v) + Tween® 20 (4%, v/v) durante 10 min. Al término de cada tiempo en las soluciones, en todos los métodos probados, las yemas se enjuagaron ocho veces con agua destilada estéril.

**Tratamiento 2.** Los rizomas de *H. nickeriensis*, provenientes directamente del campo, se lavaron con agua corriente y detergente comercial hasta retirarles residuos de suelo. Posteriormente se sumergieron durante 30 min en una solución fungicida compuesta de Benlate® (4 g L<sup>-1</sup>) + Captán® (4 g L<sup>-1</sup>). Enseguida se colocaron en bolsas de polietileno y se almacenaron por 10 d a una temperatura de 27 ± 2 °C. Después de este tiempo se extrajeron yemas laterales y se aplicó el procedimiento del Tratamiento 1.

**Tratamiento 3.** Las yemas laterales de *H. nickeriensis*, provenientes de rizomas extraídos directamente del campo, se procesaron de forma similar al Tratamiento 1, excepto que en el último paso de la solución compuesta por NaClO (30%, v/v) + plata coloidal (1.5 % v/v) + Tween® 20 (4.0 %, v/v) el tiempo de inmersión fue de 15 min.

**Tratamiento 4.** Se siguieron los pasos del Tratamiento 3, con la diferencia que las yemas laterales de *H. nickeriensis* provenían de rizomas almacenados en bolsas de polietileno durante 10 d a una temperatura de 27 ± 2 °C.

**Tratamiento 5.** Las yemas laterales de *H. nickeriensis*, provenientes de rizomas extraídos directamente del campo, se procesaron de forma similar al Tratamiento 1, excepto que en el último paso de la solución compuesta por NaClO (30%, v/v) + Plata coloidal (1.5% v/v) + Tween® 20 (4%, v/v) el tiempo de inmersión fue de 20 min.

**Tratamiento 6.** Se emplearon yemas laterales de *H. nickeriensis* que procedían de rizomas almacenados en bolsas de polietileno durante 10 d a una temperatura de 27 ± 2 °C. Se sumergieron en una solución fungicida de Benlate® (4 g L<sup>-1</sup>) + Captán® (4 g L<sup>-1</sup>) durante 20 min; después se colocaron por 10 min en una solución de Benlate® (4 g L<sup>-1</sup>) y finalmente se pasaron a

una solución compuesta por NaClO (30%, v/v) + plata coloidal (1.5% v/v) + Tween<sup>®</sup> 20 (4%, v/v) durante 10 min.

**Tratamiento 7.** Las yemas laterales de *H. nickeriensis*, procedentes de rizomas almacenados en bolsas de polietileno, se sumergieron en la solución compuesta de Benlate<sup>®</sup> (4 g L<sup>-1</sup>) + Captán<sup>®</sup> (4 g L<sup>-1</sup>) durante 15 min y enseguida se pasaron a la solución compuesta por NaClO (30%, v/v) + plata coloidal (3%, v/v) + Tween<sup>®</sup> 20 (4%, v/v), durante un tiempo de inmersión de 15 min. En este tratamiento se aumentó la concentración del bactericida a 3.0 % v/v.

**Tratamiento 8.** En este tratamiento se eliminaron los pasos por las soluciones fungicidas y las yemas laterales de *H. nickeriensis*, procedentes de rizomas almacenados en bolsas de polietileno, sólo se sumergieron durante 15 min en la solución compuesta por NaClO (30%, v/v) + plata coloidal (3%, v/v) + Tween<sup>®</sup> 20 (4%, v/v).

Para las especies *H. collinsiana*, *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. wagneriana* se escogió el tratamiento de esterilización que mayor porcentaje de explantes libres de microorganismos permitiera obtener en *H. nickeriensis*. Las yemas laterales se extrajeron de rizomas almacenados en bolsas de polietileno durante 10 d a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C y se sometieron a los pasos del Tratamiento 8 evaluado en *H. nickeriensis*.

Después del paso por hipoclorito de sodio y el bactericida, las yemas de todas las especies se disecaron hasta obtener explantes de 5 mm de longitud y 3 mm de grosor. Los explantes se sembraron de forma individual en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 10 mL de medio de cultivo básico MS (1962) sin fitohormonas.

#### 3.4.1.4 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Cada tercer día, durante un período de 20 d después de la siembra *in vitro*, se evaluó el porcentaje de contaminación (explantes contaminados por hongos o bacterias), porcentaje de oscurecimiento de los explantes e inicio y término de la contaminación en días. Se establecieron 15 repeticiones por tratamiento distribuidos de acuerdo con un diseño completamente al azar, con cada repetición constituida por un frasco de vidrio con un explante. El análisis de varianza se hizo con el Sistema

de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y en la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

### 3.4.2 Efecto del tamaño del explante de yemas laterales

Después de definir el método de esterilización para el establecimiento del cultivo aséptico a partir de yemas laterales, se evaluó el efecto del tamaño de las yemas usadas como explantes, en la contaminación *in vitro*. Para este experimento se utilizaron yemas laterales de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' provenientes de rizomas almacenados durante 10 d en bolsas de polietileno a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Los tratamientos utilizados fueron tres tamaños de ápice (0.5, 1.0 y 1.5 cm de longitud) (Figura 7). Los explantes se sembraron en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 10 mL de medio de cultivo MS (1962), y se incubaron en las condiciones mencionadas en el inciso 3.3.

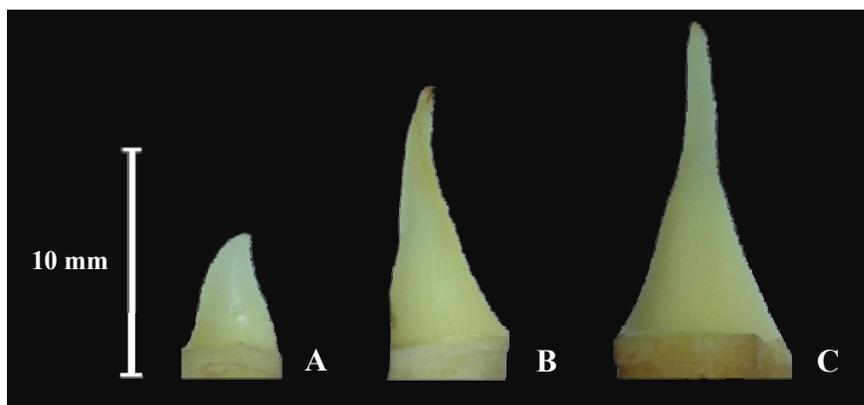


Figura 7. Yemas laterales de *H. nickeriensis* después de la esterilización y de la disección usadas como explantes. (A) 5 mm, (B) 10 mm y (C) 15 mm.

#### 3.4.2.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Cada tercer día, durante un período de 15 d después del establecimiento *in vitro*, se contabilizó el número de explantes contaminados por hongos o bacterias. Los datos colectados se analizaron con un diseño completamente al azar con 15 repeticiones, donde cada repetición la constituyó un frasco de vidrio con un explante. El análisis de varianza se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y en la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

### 3.5 Inducción de brotes

Como explantes se usaron yemas laterales de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y se sembraron en el medio básico MS (1962) (inciso 3.2) suplementado con nueve concentraciones de 6-benciladenina (BA) (Cuadro 4). Los frascos sembrados se mantuvieron en las condiciones señaladas en el inciso 3.3.

**Cuadro 4. Relación de concentraciones de 6-benciladenina (BA) adicionadas al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) para evaluar su efecto en la inducción de brotes a partir de yemas laterales de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’.**

Tratamiento (Núm.)	BA (mg L <sup>-1</sup> )	BA (μM)
1 (testigo)	0	0
2	1.0	4.44
3	1.5	6.66
4	2.0	8.88
5	2.5	11.10
6	3.0	13.32
7	3.5	15.54
8	4.0	17.76
9	4.5	19.98

#### 3.5.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Ocho semanas después de la siembra se contabilizó, en cada especie evaluada, el número de explantes con brotes para, posteriormente, determinar la brotación (B, %), el número de brotes por explante (BE) y la longitud (cm) de los brotes (LB). El número de EB y B corresponden a variables de brotación. Los datos obtenidos se analizaron con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 9 correspondiente a las combinaciones de tres especies (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’) y nueve concentraciones de BA, con 12 repeticiones y cada repetición estuvo constituida por un frasco de vidrio 45 mL de capacidad con 10 mL de medio de cultivo y un explante. El análisis de los datos se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ ).

### **3.6 Análisis histológico de brotes adventicios**

Este estudio hizo en cortes de parafina según Zavaleta-Mancera *et al.* (2003). Se tomaron muestras de tejido del explante durante la fase de inducción de brotes a la primera, cuarta y décima semana después de la siembra *in vitro*.

#### **3.6.1 Fijación y deshidratación**

Los tejidos se fijaron en FAA: 50% alcohol isopropílico, 5 % ácido acético glacial, 10 % formaldehído (36-40 %) en agua destilada por un período de 24 h. Después las muestras se deshidrataron e infiltraron en parafina mediante un procesador de tejidos automático (FISHER Tissuematon<sup>®</sup>) programado con la siguiente secuencia de soluciones: alcohol isopropílico (30 %, 40 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 % y 100 %), isopropílico-xileno 3:1, 1:1, 1:3 y dos cambios en xileno por espacio de 6 h en cada solución.

#### **3.6.2 Inclusión en parafina**

Los tejidos se transfirieron a parafina líquida (60 °C) con dos cambios (12 h) y luego se colocaron en moldes de aluminio con parafina para ser orientados y así obtener cortes medianos del meristemo. Las muestras se dejaron solidificar por 4 h.

#### **3.6.3 Microtomía**

Para hacer los cortes de las muestras incluidas en parafina, se utilizó un micrótopo rotatorio (American Optical Modelo 820). Se obtuvieron cortes medianos de 10 µm que se colocaron en porta objetos con adhesivo de cromo (1 % de gelatina, 0.2 % fenol y 0.1 % alumbre de cromo) donde se extendieron sobre una platina caliente (58 °C) durante 1 min. Después se dejaron escurrir por 20 min para eliminar el exceso de adhesivo. Posteriormente los portaobjetos con los cortes se colocaron en una estufa de secado a 60 °C por 24 h.

### 3.6.4 Remoción de la parafina e hidratación del tejido

Los cortes de parafina adheridos al portaobjetos se desparafinaron en una secuencia de tres cambios en xileno (3 min en cada cambio). Luego se hidrataron en una serie de alcohol etílico (100, 70, 50 %) con 3 min en cada cambio.

### 3.6.5 Tinción

Se usó la tinción policromática de safranina-verde rápido. Los cortes se tiñeron primero en 0.05 % de safranina 0 en una solución de 2 % de cloruro de sodio por 12 h. Los cortes se enjuagaron dos veces en agua destilada para retirar los residuos de la sal. Se deshidrataron en una serie de alcohol isopropílico (50 %, 70 %, y 100 %) con 1 min en cada cambio. Luego se aplicó el verde rápido FCF (Merck®) por 1 min y se eliminó el exceso antes de pasarlas por alcohol isopropílico (100 %) y tres cambios en xilenos con 1 min en cada cambio. Los cortes se montaron en resina sintética y colocaron en una parrilla a 60 °C por 24 h para después observarlos en un microscopio óptico (Zeiss® modelo Axiostar Plus) y fotografiarlos con una cámara Sony® (modelo Mpegmovieex).

### 3.7 Multiplicación de brotes

Se sembraron brotes de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ de una longitud aproximada de 1.5-2.0 cm y se colocaron en frascos de vidrio de 140 mL de capacidad con 30 mL de medio básico de cultivo MS (1962) (inciso 3.2). A dicho medio se le adicionaron varias concentraciones de BA en combinación con ácido indolacético (AIA) (Cuadro 5). También se evaluó el efecto del tiazurón (TDZ) (Cuadro 6), sólo y en combinación con AIA. El pH se ajustó de acuerdo con el inciso 3.2, y los frascos sembrados se mantuvieron en las condiciones señaladas en el inciso 3.3.

**Cuadro 5. Relación de concentraciones de 6-benciladenina (BA) y ácido indol-3-acético (AIA) adicionadas al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) para evaluar su efecto en la multiplicación de brotes de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’.**

Tratamiento (Núm.)	BA		AIA	
	mg L <sup>-1</sup>	μM	mg L <sup>-1</sup>	μM
1 (testigo)	0	0	0	0
2	2.5	11.1	0.17	1
3	3.5	15.5	0.17	1
4	4.5	20.0	0.17	1
5	5.5	24.4	0.17	1

**Cuadro 6. Relación de concentraciones de tiazurón (TDZ) y ácido indol-3-acético (AIA) adicionadas al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) para evaluar su efecto en la multiplicación de brotes de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’.**

Tratamiento (Núm.)	BA		TDZ		AIA	
	mg L <sup>-1</sup>	μM	mg L <sup>-1</sup>	μM	mg L <sup>-1</sup>	μM
1 (testigo)	2.5	11.1	0	0	0.17	1
2	0	0	0.24	1.0	0	0
3	0	0	0.34	1.5	0	0
4	0	0	0.44	1.9	0	0
5	0	0	0.54	2.4	0	0
6	0	0	0.64	2.9	0	0
7	0	0	0.24	1.0	0.17	1
8	0	0	0.34	1.5	0.17	1
9	0	0	0.44	1.9	0.17	1
10	0	0	0.54	2.4	0.17	1
11	0	0	0.64	2.9	0.17	1

### 3.7.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Después de ocho semanas, en cada experimento se registró la B (%), BE (Núm.) y LB (cm). Los datos obtenidos se analizaron mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial. En el caso del experimento de multiplicación con BA fue un factorial 3 x 5 correspondiente a las combinaciones de tres especies (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’) y cinco concentraciones de BA. En el experimento con TDZ

el arreglo factorial fue 3 x 6 x 2 correspondiente a las combinaciones de tres especies (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’), seis concentraciones de TDZ y dos de AIA. Para cada experimento se usaron 12 repeticiones, en donde la unidad experimental fue un brote sembrado en un frasco de 140 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo. El análisis de los datos se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ ).

### 3.8 Enraizamiento *in vitro* de plántulas

Se seleccionaron plántulas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’, de 3-4 cm de altura, y se colocaron en frascos de 250 mL de capacidad con 40 mL del medio de cultivo básico MS (1962) (inciso 3.2) suplementado con ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) (Cuadro 7). El pH se ajustó de acuerdo con lo indicado en el inciso 3.2 y las condiciones de incubación empleadas fueron las señaladas en el inciso 3.3.

**Cuadro 7. Relación de concentraciones de ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) adicionadas al medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (MS) para evaluar su efecto en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’.**

Tratamiento (Núm.)	ANA		AIB	
	mg L <sup>-1</sup>	μM	mg L <sup>-1</sup>	μM
1 (testigo)	0	0	0	0
2	0.18	1.0	0	0
3	0	0	0.20	1.0

#### 3.8.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

A las cuatro semanas después de la siembra se registró el número de raíces (R), longitud de raíz (L, cm) y altura de plántula (AP, cm). El diseño experimental fue completamente al azar y cada tratamiento estuvo compuesto por 12 repeticiones, cuya unidad experimental fue una plántula sembrada en cada frasco. Los datos colectados se analizaron mediante un arreglo factorial 3 x 3 correspondiente a las combinaciones de tres especies (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis*, *H.*

*psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’) y tres auxinas [MS (testigo), AIA y AIB]. El análisis de los datos se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

### 3.9 Germinación *in vitro* de semillas

#### 3.9.1 Material vegetal

Para los experimentos de germinación se usaron semillas de *H. bihai* cv. ‘Pink Peach’, *H. collinsiana* y *H. platystachys* cv. ‘Sexy Orange’ (Figura 8) que producen semillas y se descartaron las que son estériles (*H. nickeriensis*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’). Se eligieron semillas sanas, sin daños mecánicos ni de insectos y de tamaño uniforme (0.5-1 cm, según la especie).



Figura 8. Semillas de heliconias utilizadas para la germinación *in vitro*. (A) *H. bihai* cv. ‘Pink Peach’, (B) *H. collinsiana*, (C) *H. platystachys* cv. ‘Sexy Orange’.

#### 3.9.2 Método de esterilización de semillas

Las semillas se lavaron con detergente comercial por 5 min y después se sumergieron en una solución fungicida compuesta por Benlate<sup>®</sup> (4 g L<sup>-1</sup>) + Captán<sup>®</sup> (4 g L<sup>-1</sup>) durante 20 min, y en seguida se enjuagaron con agua destilada estéril. Luego se establecieron cuatro tratamientos con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3.0% (v/v), para evaluar su efecto escarificador (Cuadro 8).

Posteriormente, en condiciones asépticas, las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en una mezcla compuesta por bactericida a base de plata coloidal (3%, v/v), hipoclorito de sodio (30%, v/v) y Tween<sup>®</sup> 20 (4%, v/v), durante 30 min. Por último, se

enjuagaron ocho veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos de los agentes desinfectantes.

**Cuadro 8. Tratamientos de escarificación de semillas de *H. bihai* cv ‘Pink Peach’, *H. collinsiana* y *H. platystachys* cv. ‘Sexy Orange’ empleando 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v).**

Tratamiento (Núm.)	Tiempo (min)
1	0 (testigo)
2	30
3	45
4	60

Las semillas desinfectadas se sembraron de forma individual en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 10 mL del medio básico MS (1962) a la mitad de concentración de sales. Para la siembra, las semillas se sumergieron en el medio de cultivo a una profundidad de 5 mm, manteniendo la polaridad de las mismas.

### 3.9.3 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Cada tercer día, durante un período de 15 d después del establecimiento del cultivo aséptico *in vitro*, se evaluó el porcentaje de contaminación (semillas contaminadas por hongos o bacterias) y el porcentaje de germinación (plántulas con raíz y vástago). Las semillas se mantuvieron en observación durante 7 meses con subcultivos a medio de cultivo fresco cada mes.

Los datos obtenidos en los experimentos se analizaron con un diseño completamente al azar, con 20 repeticiones, donde cada una estuvo constituida por una semilla por frasco. El análisis de varianza se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

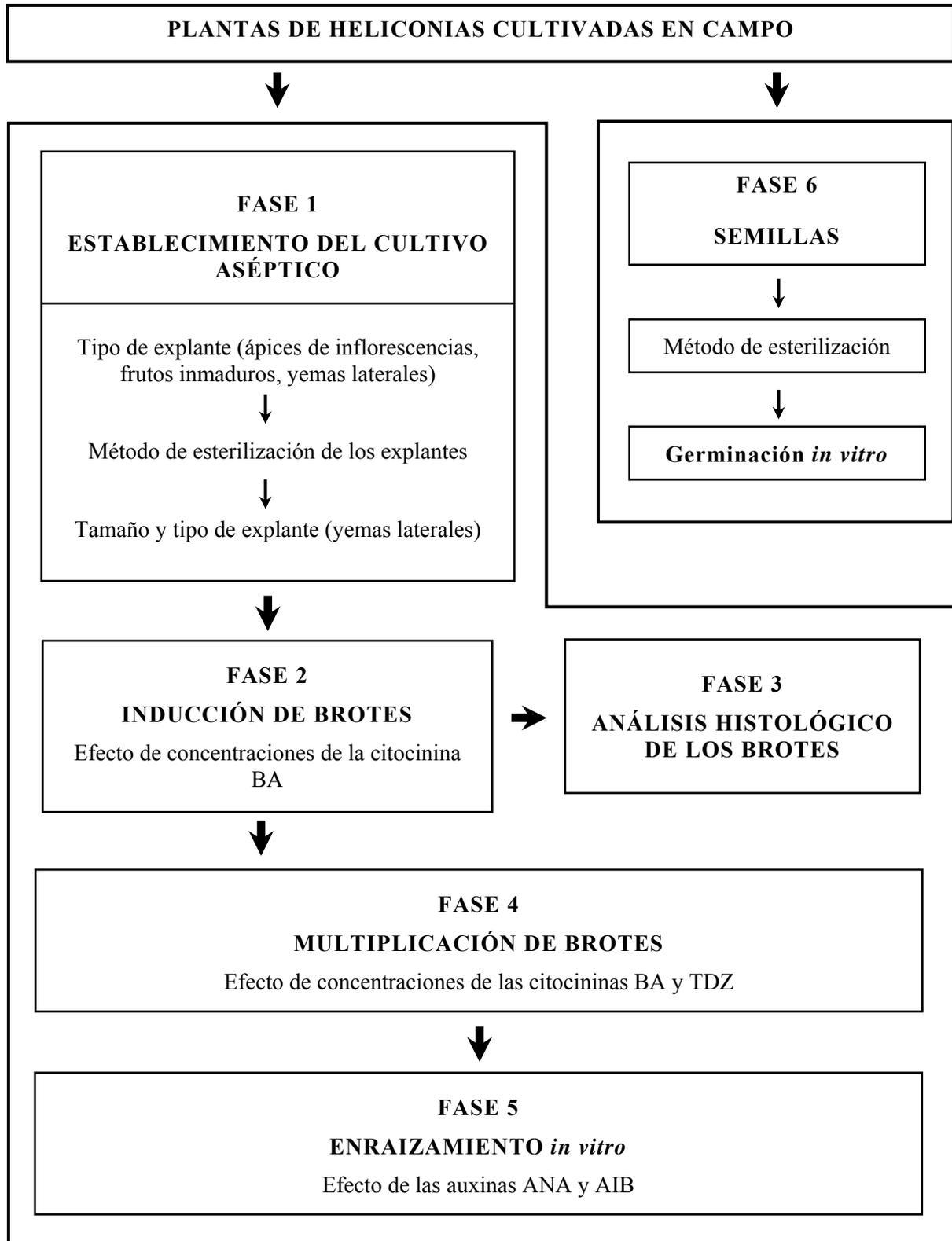


Figura 9. Protocolo empleado en la regeneración *in vitro* de *Heliconia* vía organogénesis directa, análisis histológico de los brotes (Fases 1-5) y germinación de semillas (Fase 6).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Establecimiento del cultivo aséptico

#### 4.1.1 Origen de los explantes

##### 4.1.1.1 Ápices de inflorescencias y frutos inmaduros

En la presente investigación se evaluó el potencial de otras partes de la planta como posible fuente de explantes en la propagación *in vitro* de heliconias. Los resultados mostraron que los explantes de ápices de inflorescencias y frutos inmaduros de *H. nickeriensis*, *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’ y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ no produjeron respuesta morfogénica y, aunque no se presentaron problemas de contaminación, en todos ellos hubo un oscurecimiento del tejido. En los ápices de inflorescencias este fenómeno se observó durante los primeros 8 d después de la siembra, que progresó del ápice hacia la base hasta tornarse totalmente oscuros al término de 15 d. En los frutos inmaduros el comportamiento fue similar, sólo que la finalización del oscurecimiento ocurrió 20 d después de la siembra.

En algunas especies vegetales se han desarrollado sistemas de regeneración a partir de inflorescencias pero ninguno en *Heliconia*. Krikorian *et al.* (1993) emplearon ápices de inflorescencias masculinas y regeneraron plantas de *Musa* AAB en medio MS (1962) adicionado con BA (5.0 mg L<sup>-1</sup>). En el mismo tipo de explante, Sebastian y Mathew (2004) reportaron la inducción de múltiples brotes en los cultivares ‘Nendran’ (AAB) y ‘Poovan’ (AAB) en medio MS suplementado con BA (3 mg L<sup>-1</sup>). De igual forma, Resmi y Nair (2007) regeneraron plantas de *Musa acuminata* de los cultivares diploides y triploides en medio MS (1962) adicionado con BA (2.0 y 5.0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente). Sin embargo, en *Musa* spp cv. ‘Pacovan’ el uso de este tipo de explante no respondió a la inducción de brotes (Ibrahim *et al.*, 2002).

También en *Curcuma longa* se consiguió la organogénesis directa *in vitro* a través de inflorescencias inmaduras, y en *Alstroemeria* cv. ‘Yellow King’ este tipo de explante fue una vía eficiente para la regeneración *in vitro* (Salvi *et al.*, 2000; Pedraza-Santos *et al.*, 2006).

La organogénesis directa *in vitro* a partir de frutos inmaduros es más compleja, aunque la regeneración puede ser factible mediante organogénesis indirecta o embriogénesis somática. Por la nula respuesta morfogénica presentada en los ápices de inflorescencias y frutos inmaduros en todos los tratamientos hormonales probados, éstos se descartaron como fuente de explantes para la organogénesis directa.

#### 4.1.1.2 Yemas laterales de *H. nickeriensis*

Otro tipo de explante evaluado para inducir la organogénesis directa *in vitro* en *Heliconia* fue el de yemas laterales. Para lograr el establecimiento del cultivo aséptico, primero se tuvo que desarrollar un tratamiento de esterilización de explantes que redujera la contaminación por lo menos a 10 %. Para ello se diseñaron ocho tratamientos a partir de yemas laterales de *H. nickeriensis*, y cada uno de ellos arrojó resultados diferentes.

Los porcentajes de contaminación en explantes de yemas laterales variaron entre los tratamientos de esterilización empleados. El mejor tratamiento de esterilización fue aquel donde se emplearon yemas laterales procedentes de rizomas almacenados en bolsas de polietileno, mismas que se sumergieron durante 15 min en la solución compuesta por NaClO (30%, v/v) + plata coloidal (3%, v/v) + Tween<sup>®</sup> 20 (4%, v/v) (Tratamiento 8). Con este tratamiento la contaminación se redujo a 6.67 % y, por ende, la supervivencia del explante fue mayor de 90 % (Apéndice 2A).

La tasa de contaminación estuvo asociada con el origen de las yemas, ya que las extraídas de rizomas provenientes directamente del campo mostraron porcentajes altos de contaminación (Tratamientos 1, 3 y 5) debido al contacto directo con el suelo. En cambio, cuando se extrajeron de rizomas desinfectados y almacenados en bolsas de polietileno los porcentajes de contaminación disminuyeron (tratamientos 4, 5, 7 y 8) (Figura 10). Esta respuesta se debió a que la inmersión de los rizomas en la mezcla de Benlate<sup>®</sup> (4 g L<sup>-1</sup>) + Captán<sup>®</sup> (4 g L<sup>-1</sup>), previo al almacenamiento en bolsas de polietileno, favoreció la obtención de nuevas yemas laterales libres de contacto con el suelo. Este procedimiento aplicado en *H. psittacorum* cv. ‘Choconiana’ permitió obtener 60 % de explantes libres de contaminación (Nathan *et al.*, 1992).

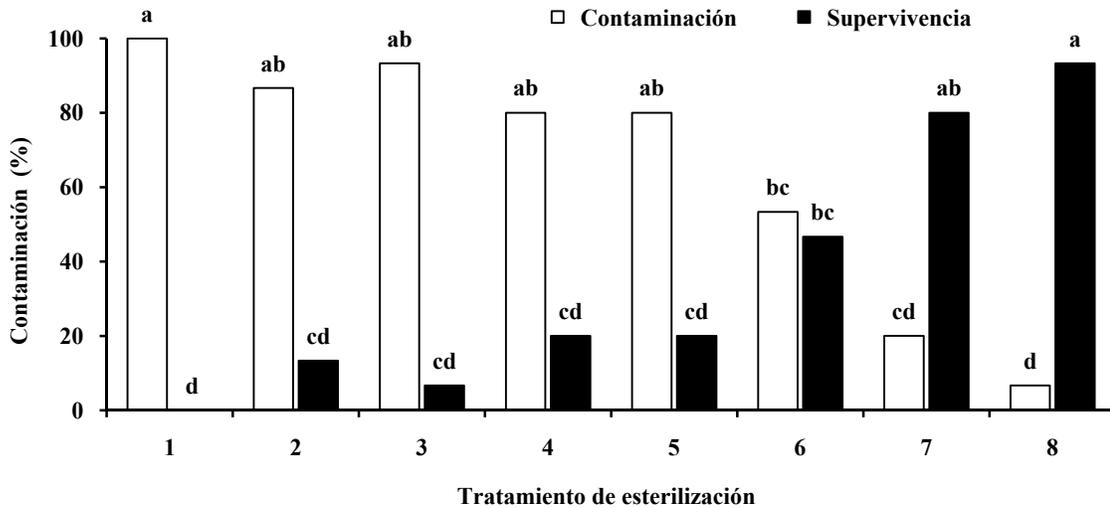


Figura 10. Porcentajes de contaminación y supervivencia *in vitro* en explantes de *H. nickeriensis* evaluados 15 d después de la siembra en medio de cultivo MS (1962).

En los Tratamientos 7 y 8 se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación (20.0 y 6.7 %, respectivamente). Se consideró al Tratamiento 8 como el más eficiente y se tomó como referencia para evaluarlo en *H. collinsiana*, *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. wagneriana*.

Las bacterias fueron el agente causante de la contaminación en todos los tratamientos, razón por la cual no es necesario el uso de fungicidas en la esterilización; por ello, el tratamiento que se obtuvo la mayor cantidad de explantes libres de contaminación (Tratamiento 8) sólo se empleó NaClO, Tween<sup>®</sup> 20 y plata coloidal (bactericida). Las bacterias son el mayor obstáculo para el establecimiento del cultivo aséptico en heliconias, e incluso algunas investigaciones en este género se han enfocado sólo a la eliminación de la contaminación con resultados poco satisfactorios (Gayosso, 2001; Marulanda e Isaza, 2004; Rodríguez, 2005).

La ubicación del explante en la planta afecta el establecimiento del cultivo aséptico de cualquier especie vegetal, la cual es capaz de alojar una diversidad abundante de microorganismos. Las heliconias no escapan a este problema y la elevada tasa de contaminación en el cultivo *in vitro* se debe a bacterias de tipo endógeno presentes en el explante y su origen se debe a la posición subterránea del cormo (Pedersen y Brandt, 1992; Leifert y Cassells, 2001; Pedraza-Santos *et al.*, 2006).

Para eliminar o reducir la contaminación por bacterias se ha recurrido al empleo de antibióticos, ya sea en el medio de cultivo o durante la esterilización superficial de los explantes. Estos antibióticos se usan principalmente por sus efectos bactericidas lo que permite el cultivo de células vegetales libre de bacterias, además de que también se han usado para controlar o remover microorganismos contaminantes (Pollock *et al.*, 1983; Holford y Newbury, 1992).

Debido a que en algunas especies vegetales los antibióticos pueden ser tóxicos para los explantes e interferir con la respuesta morfogénica (Pollock *et al.*, 1983; Leifert y Waites, 1992; Teixeira *et al.*, 2003), en la presente investigación se prescindió del uso de ellos en todas las pruebas de esterilización y la asepsia se logró con el uso de NaClO, Tween<sup>®</sup> 20 y plata coloidal. En *H. rauliniana* se encontró que el cloramfenicol (150 mg L<sup>-1</sup>) fue efectivo para eliminar las bacterias, pero fue tóxico para el explante (Rodríguez, 2005). También en *Musa*, los antibióticos ampicilina, gentamicina, vancomicina, tetraciclina o doxiciclina no disminuyen la contaminación (Surga y Guevara, 1994; Carneiro *et al.*, 2000; Habiba *et al.*, 2002).

En el Tratamiento 1, al tercer d después de la siembra *in vitro*, la contaminación fue de 53 % y al término de 15 d llegó a 100 %. Esto se atribuyó a que fue el primer intento para obtener explantes libres y a que las yemas procedían de rizomas extraídos directamente del campo (Apéndice 3A). Algunas plantas parecen más predispuestas a albergar bacterias latentes en el interior de los tejidos. En algunas musáceas las bacterias sobreviven en asociación con el huésped, aunque sean incapaces de persistir en estado libre en el suelo por períodos extensos; en los sistemas *in vitro* impiden el desarrollo del explante (Surga y Guevara, 1994).

En los Tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6 los porcentajes de contaminación al tercer d fueron de 20-26 % y al d 15 se detuvo en un rango de 53 a 84 % (Apéndice 3A). Esta leve reducción de la contaminación se logró con el aumento del tiempo de inmersión de los explantes en el bactericida (1.5 %, v/v). En los Tratamientos 7 y 8, el incremento en la concentración del bactericida (3.0 %, v/v) permitió reducir sustancialmente la contaminación, la cual se presentó hasta el d 6 y terminó el d 9 con porcentajes de 20.0 y 6.7 %, respectivamente. También esta respuesta se debió a la disminución del tiempo de manipulación de los explantes al eliminar los pasos por la solución fungicida (Apéndice 3A).

Por haberse obtenido la menor tasa de contaminación y los valores más altos de supervivencia con yemas laterales procedentes de rizomas almacenados en bolsas de polietileno, mismas que se sumergieron durante 15 min en la solución compuesta por NaClO (30%, v/v) + plata coloidal (3%, v/v) + Tween<sup>®</sup> 20 (4%, v/v) (Tratamiento 8), se eligió este procedimiento como el más eficiente para lograr el establecimiento del cultivo aséptico a partir de yemas laterales en *H. nickeriensis* (Figura 11).

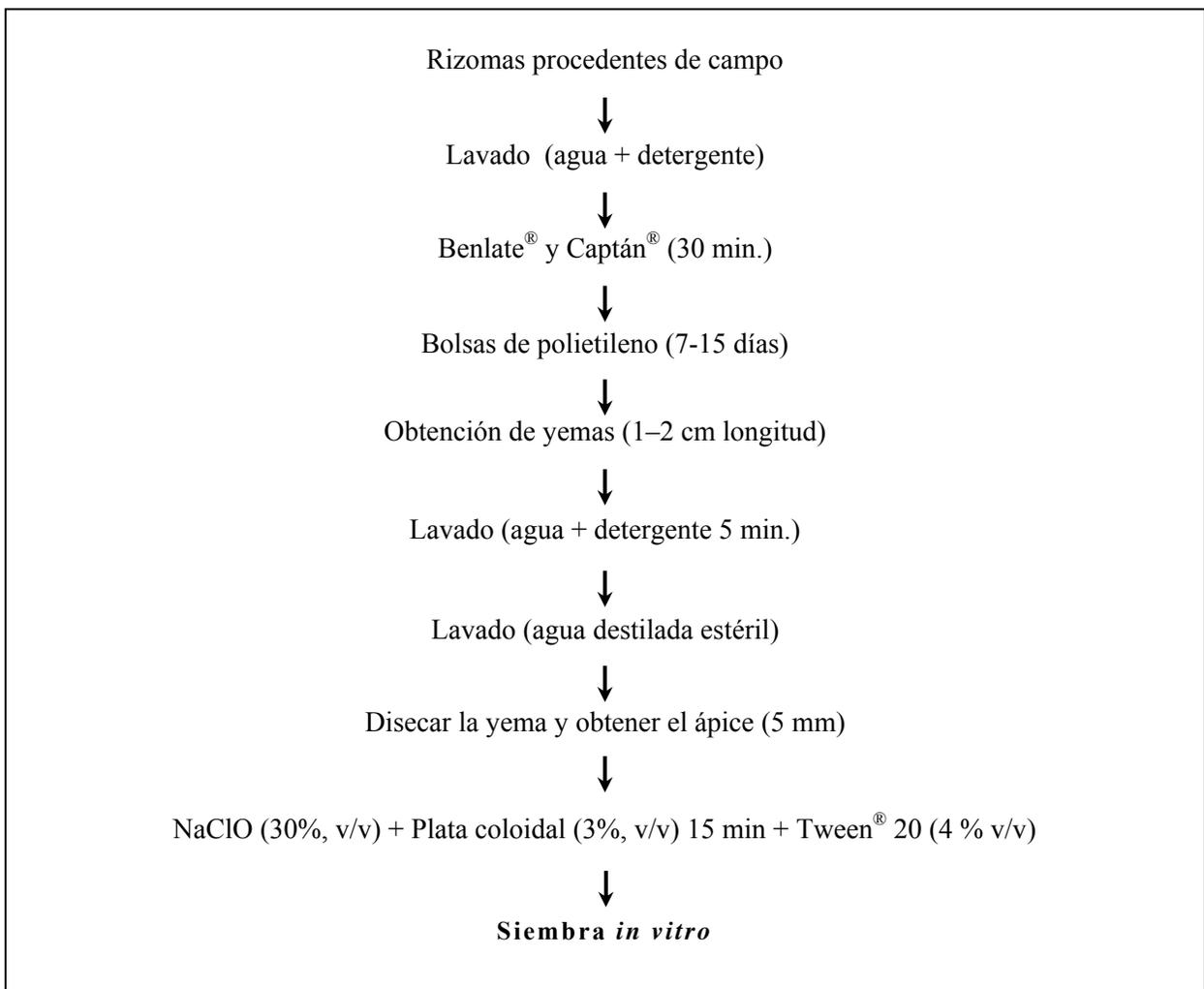


Figura 11. Establecimiento del cultivo aséptico de yemas laterales de *H. nickeriensis*.

#### 4.1.1.3 Yemas laterales de *H. collinsiana*, *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. wagneriana*

Después de desarrollar un tratamiento de esterilización que redujera la contaminación a menos de 10 % en explantes de yemas laterales de *H. nickeriensis*, se evaluó la eficiencia de éste para el mismo tipo de explante en las especies *H. collinsiana*, *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. wagneriana*. Las cuatro especies respondieron de forma diferente (Apéndice 4A). Después de 15 d de la siembra *in vitro*, en los explantes de *H. collinsiana* y el cultivar ‘Golden Torch’ se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación (6.67 % en cada una) mientras que en *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’ y *H. wagneriana* la contaminación alcanzó valores de 46.7 y 60.0 %, respectivamente (Figura 12).

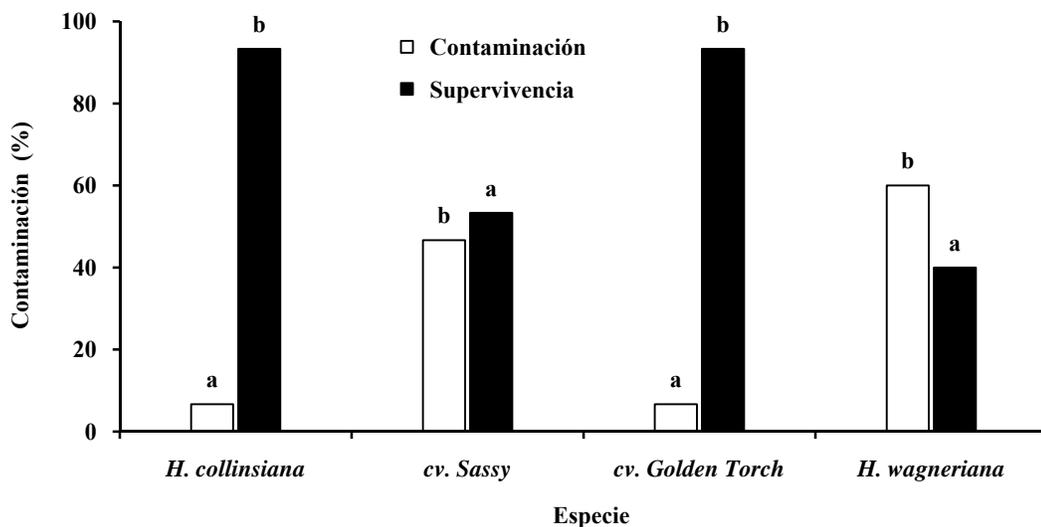


Figura 12. Porcentajes de contaminación y supervivencia *in vitro* en explantes de *H. collinsiana*, *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. wagneriana* evaluados 15 d después de la siembra en medio de cultivo MS (1962).

La alta tasa de contaminación obtenida en *H. wagneriana* se debió a la presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum*. De forma natural, esta bacteria está asociada con esta especie vegetal a cualquier edad de la planta, pero durante el cultivo aséptico ésta se sobreexpresa e inhibe el crecimiento del explante. En *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’ también se obtuvo una alta tasa de contaminación ocasionada por bacterias. *Ralstonia solanacearum* constituye el mayor obstáculo en el establecimiento del cultivo aséptico en muchos cultivos, principalmente en especies de

*Musa* y *Heliconia* (Gayosso, 2001; Marulanda e Isaza, 2004; Rodríguez, 2005; Wicker *et al.*, 2007).

Los explantes sobrevivientes de estas dos especies se subcultivaron cada 30 d, y después de 2 ó 3 meses de cultivo algunos explantes se contaminaron con una bacteria de color amarillo, lo que indica que la contaminación observada fue la producida por microorganismos endofíticos que escapan a la esterilización superficial (Cassells, 1993). Estos microorganismos permanecen cubiertos o latentes sin que su aparición sea obvia en el medio de cultivo y pueden pasar inadvertidos en ausencia de un indicador bacteriano específico (Leifert y Woodward, 1998; Van Den Houwe y Swennen, 2000; Thomas, 2004).

Debido a la alta tasa de contaminación mostrada en explantes de yemas laterales de *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’ y *H. wagneriana*, estas especies se descartaron en los posteriores experimentos de inducción y multiplicación de brotes y sólo se trabajó con *H. collinsiana*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis*, en las que la contaminación fue menor de 10 %.

#### **4.1.2 Efecto del genotipo y tamaño de explante de yemas laterales sobre la contaminación**

Si bien ya se había obtenido un tratamiento de esterilización que redujo la contaminación a menos del 10 %, se evaluó el efecto del tamaño del explante y el efecto del genotipo. Para ello, se evaluaron tres especies de heliconias (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’) y tres tamaños de explantes (5, 10 y 15 mm de longitud). Las especies utilizadas se seleccionaron por ser las que menor porcentaje de contaminación mostraron en las pruebas de esterilización. Las tres especies mostraron porcentajes de contaminación similares en cada tamaño de explante (Apéndice 6A), pero este último factor tuvo efecto significativo.

El tamaño de explante de 5 mm de longitud presentó la menor tasa de contaminación (6.67 %) en las tres especies de heliconias, mientras que los de 10 y 15 mm mostraron una contaminación mayor de 50 %. Es decir, al aumentar el tamaño del explante se incrementa de forma lineal el porcentaje de contaminación (Figura 13).

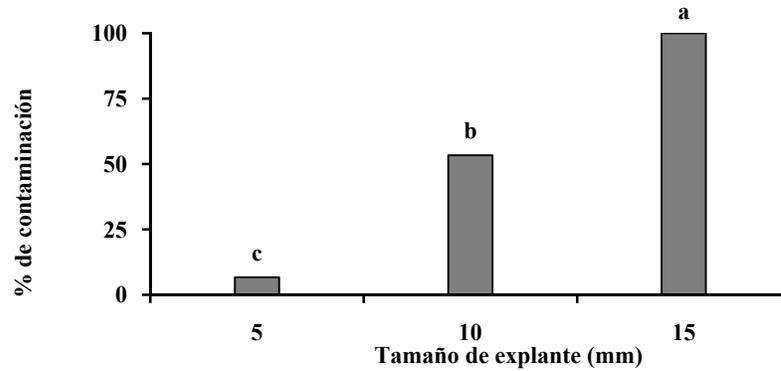


Figura 13. Porcentajes de contaminación *in vitro* en tres tamaños de yemas laterales en promedio, de tres especies de heliconias, después de 15 d de la siembra en medio MS (1962).

Las menores tasas de contaminación obtenidas en explantes de 5 mm se atribuye a que las células de los ápices se encuentran aún en condición meristemática y sin conexión vascular, lo que permite controlar, en cierta medida, la diseminación de bacterias en los vasos vasculares, y por ello son mejores explantes para obtener plantas libres de patógenos (Pedersen y Brandt, 1992; Cassells, 1993).

La contaminación está estrechamente relacionada con el tamaño del explante. Frecuentemente existe un tamaño óptimo de explante para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Explantes pequeños (< 2 mm), ya sea de ápices de brotes, fragmentos o tejidos completos, o piezas de callos, no sobreviven bien al cultivo. Explantes grandes (10 mm) son difíciles de esterilizar y manipular de forma efectiva. En la mayoría de los casos la mejor respuesta se obtiene a partir de explantes de un tamaño de 5 mm; además, los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios de cultivo más complejos (George y Sherrington, 1984; Taji *et al.*, 2002). En algunas especies de *Musa*, un explante de 5 mm resulta ser el tamaño más eficiente para el establecimiento del cultivo aséptico y reducir la contaminación a 10 % (Wong, 1986; Sandoval y Müller, 1992; Van Den Houwe y Swennen, 2000; Utino *et al.*, 2001).

Los menores porcentajes de contaminación obtenidos con explantes de 5 mm en las tres especies de heliconias, apuntan a éste como el tamaño ideal para la inducción de brotes adventicios en *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'.

## 4.2 Inducción de brotes vía organogénesis directa

Después de definir que los explantes de ápices de inflorescencias y frutos inmaduros, tienen una respuesta morfogénica nula, se evaluó el potencial morfogénico de las yemas laterales para la inducción de brotes de forma directa. En este experimento se probaron 27 tratamientos resultantes de tres especies de heliconias (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch') y nueve concentraciones de BA (0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 mg L<sup>-1</sup>) en cuanto a su efecto en la inducción de brotes. Después de una semana de la siembra, los explantes cambiaron de un color blanco crema a verde (Figura 14).

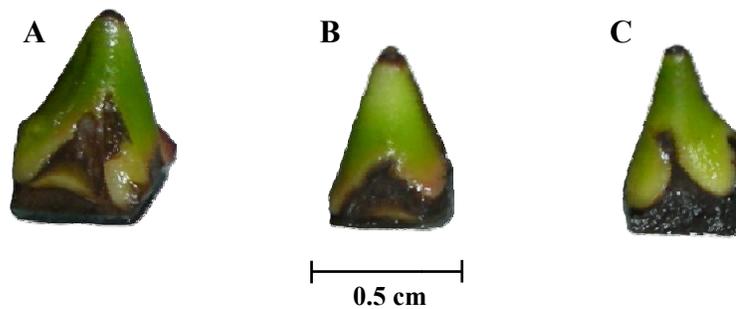


Figura 14. Yemas laterales después de una semana de siembra *in vitro*. (A) *H. collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch', (C) *H. nickeriensis*.

En las variables indicadoras de la brotación (B y BE), la especie, concentración de BA y la interacción especie x concentración de BA tuvieron efectos significativos ( $p \leq 0.05$ ), mientras que en la LB los efectos significativos los produjeron las concentraciones de BA y la interacción especie x concentración de BA. Si bien, todos los factores tuvieron efectos en las variables de brotación, el mayor efecto lo produjo la concentración de BA tanto en B como número de BE con 86.8 y 74.0 %, respectivamente. En la LB, no hubo diferencia entre las tres especies, y la concentración de BA fue el factor que tuvo mayor influencia (90.7 % de la variación total) (Apéndice 7A).

La BA es una de las citocininas más usadas para la inducción de brotes ya sea sola o en combinación con alguna auxina. La capacidad organogénica del BA se ha reportado en *Heliconia* (Nathan *et al.*, 1992; Nogueira *et al.*, 2004) y en especies relacionadas filogenéticamente como *Curcuma* (Prakash *et al.*, 2004), *Estrelitzia* (Paiva *et al.*, 2004), *Musa* (Cronauer y Krikorian,

1984; Wong, 1986; Arinaitwe, 1999; Resmi y Nair, 2007) y *Zingiber* (Faria e Illg, 1995). Además, se ha confirmado mediante marcadores moleculares que en *Musa* spp cv. ‘Nanjanagudu Rasabale’ (AAB), esta citocinina no produce variación genética aún en concentraciones altas (Venkatachalam *et al.*, 2007).

*H. collinsiana* y el cv. ‘Golden Torch’ presentaron la mejor respuesta morfogénica medida como B, mientras que en número de BE la primera de ellas superó a las otras dos especies. *H. nickeriensis* presentó los valores más bajos tanto de B como de número de BE (Figura 15). Los primeros nuevos brotes se originaron después de 10 semanas de cultivo en *H. collinsiana* y cv. ‘Golden Torch’, mientras que en *H. nickeriensis* los brotes aparecieron hasta la semana 12. Estas diferencias demuestran la influencia del genotipo sobre la capacidad morfogénica, y es uno de los factores que más influye en la morfogénesis *in vitro*, diferencias que pueden existir incluso entre cultivares (Tiwari *et al.*, 2004; Poonam *et al.*, 2005).

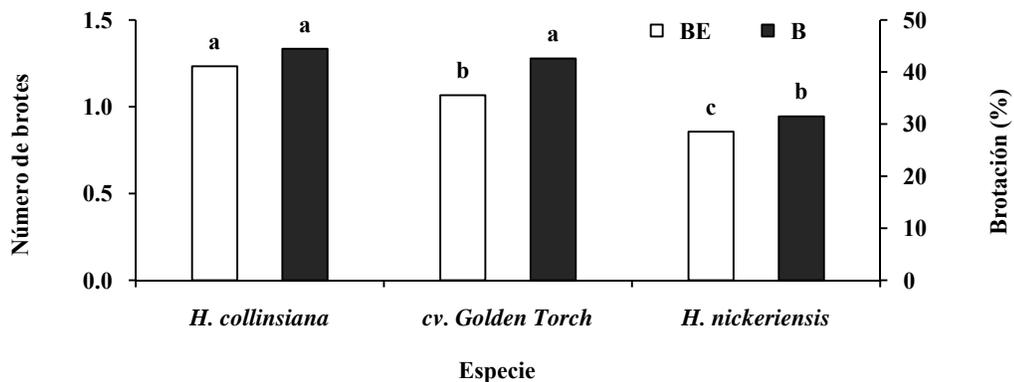


Figura 15. Porcentaje de brotación (B) y número de brotes por explante (BE) de tres especies de heliconias cultivadas *in vitro* a partir de explantes de yemas laterales durante la etapa de inducción de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

De las nueve concentraciones de BA probadas, la de  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  fue en la que se expresó la mejor respuesta para porcentaje de B, número de BE y LB. La concentración de  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BA produjo un efecto similar a  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  en la LB. Por el contrario, las concentraciones que produjeron el menor efecto morfogénico corresponden a  $1.0$ ,  $4.0$  y  $4.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y al testigo sin hormonas. Se observó que al aumentar la concentración de BA a más de  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$ , la

respuesta tanto en la B como en el número de BE fue nula y los explantes sólo se alargaron (Figura 16).

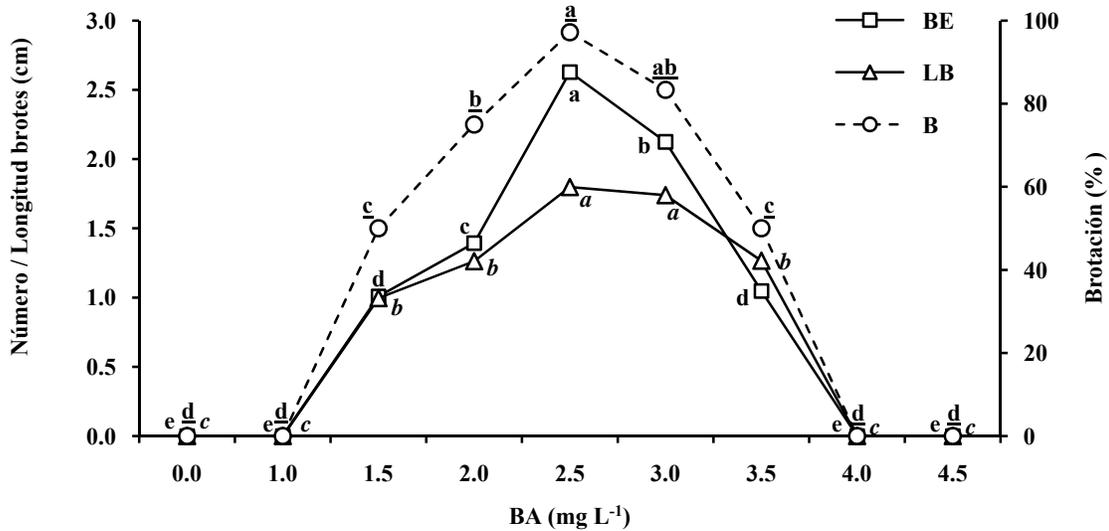


Figura 16. Efecto de concentraciones de 6-benciladenina (BA) en la respuesta organogénica medida en porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB), de tres especies de heliconias en la etapa de inducción de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey, p<0.05).

Estos resultados son consistentes con los reportados por Nathan *et al.* (1992), quienes al evaluar la influencia de BA en combinación con AIA sobre la inducción de brotes en yemas laterales de *H. psittacorum* cv. ‘Choconiana’, encontraron que el AIA no afecta significativamente y que 2.5 mg L<sup>-1</sup> de BA fueron óptimos para inducir la respuesta; en *H. stricta* la mayor eficiencia para la inducción de brotes se logró con 2 y 4 mg L<sup>-1</sup> de BA (Nogueira *et al.*, 2004).

Cuando el BA se omitió del medio de cultivo los explantes no prosperaron y ocurrió el oscurecimiento, y cuando se empleó la concentración de 1.0 mg L<sup>-1</sup> el explante sólo se ensanchó sin emitir brotes. Este mismo efecto observaron Wong (1986) y Priyono (2001) en *Musa* spp. y *M. paradisiaca* cuyos explantes no produjeron brotes en ausencia de citocininas.

En la interacción especie x concentración de BA también se detectaron diferencias significativas en las variables B, BE y LB. El mayor porcentaje de B se obtuvo en las concentraciones de 2.0, 2.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup> de BA en las tres especies. Para el número de BE, la concentración de 3.0 mg L<sup>-1</sup> de BA resultó la mejor en *H. collinsiana* (4.26 brotes), mientras que en cv. ‘Golden Torch’ y *H.*

*nickeriensis* fue  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (3.17 y 2.32 brotes, respectivamente). En las tres especies, los mayores valores de LB se obtuvieron con la concentración de BA que indujo el mayor número de BE (Apéndice 8A; Figura 17).

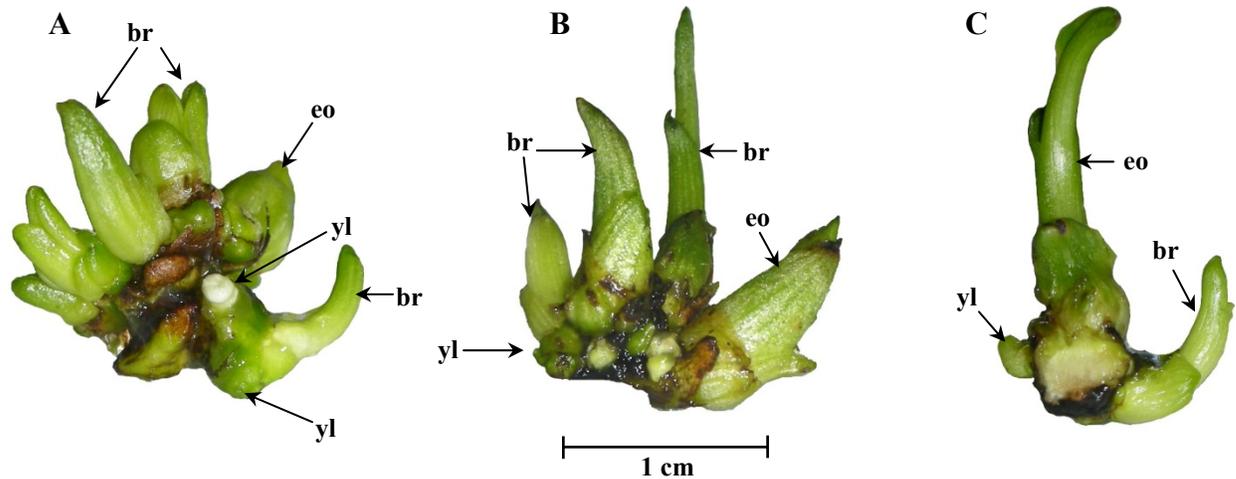


Figura 17. Inducción de brotes adventicios *in vitro* en explantes de yemas laterales de heliconias después de 12 semanas de su siembra en medio MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA,  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y (C) *H. nickeriensis*. br = brote; eo = explante original; yl = yema lateral.

Referente al tipo de explante, los escasos reportes sobre cultivo *in vitro* de heliconias revelan que su estudio se basó en protocolos desarrollados en banano debido a su estrecha relación filogenética (Atehortua, 1997). En estos protocolos se emplearon yemas axilares de rizomas por lo que en heliconias también se partió de este tipo de explante. Además, tanto en *Heliconia* como en *Musa* las yemas axilares han sido los únicos explantes que aseguran la estabilidad genética (Cronauer y Krikorian, 1984; Wong, 1986; Nathan *et al.*, 1992; Nogueira *et al.*, 2004; Promsorn y Kanchanapoom, 2006).

Los resultados derivados de la etapa de inducción de brotes en *H. collinsiana*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y *H. nickeriensis* indican que la regeneración *in vitro* en heliconias es factible a partir de explantes de yemas laterales. Por ser el explante un meristemo, se asegura la estabilidad genética de las plantas propagadas.

### 4.3 Análisis histológico de los brotes adventicios

El estudio histológico se hizo durante la fase de inducción de brotes en *H. collinsiana*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis*. Los cortes se efectuaron en explantes de yemas laterales cultivadas en medio MS (1962) suplementado con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de BA a la primera, cuarta y décima semana después de la siembra *in vitro* (Figura 18).

Las observaciones en explantes de una semana de edad tuvieron la finalidad de caracterizar los tejidos en el explante. En los tres genotipos estudiados se observó que no se generaron brotes a la primera semana. Se apreció que el crecimiento de las hojas es alterno y la túnica 1 del meristemo apical está conformada por una sola capa de células. Así mismo, los primordios de hoja que envainan al meristemo se alargaron mientras que los haces vasculares se disponen en dirección al medio de cultivo (Figura 18A, 18D y 18G).

Después de cuatro semanas de la siembra se observaron primordios de yemas que emergían en la axila entre la cuarta y quinta hoja en *H. collinsiana* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ (Figura 18B y 18E). Estas yemas fueron inducidas por la acción del BA, cuya función principal es modificar la dominancia apical y promover el crecimiento de yemas laterales (Taiz y Zeiger, 2006). Una respuesta similar fue observada en *Musa* spp cv. ‘Grande Naine’ cuyos explantes presentaron primordios de yema a las nueve semanas de edad (Zaffari *et al.*, 2000).

En los explantes de 10 semanas después de la siembra se observaron yemas laterales y primordios de brote que se originaron en la base de los explantes de *H. collinsiana* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’. En explantes de *H. collinsiana* los primordios de brote se originaron a partir del procámbium en la base del explante (Figura 18C). En *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ hubo crecimiento de yemas laterales en la axila foliar (Figura 18F). Nathan *et al.* (1992) reportaron que los brotes de heliconias *in vitro* se originaron en la base de los explantes. El estudio histológico aquí realizado permitió identificar y describir con mayor detalle la inducción de yemas a las cuatro semanas y el inicio de la diferenciación de brotes nuevos a partir de células de procámbium en la base del explante.

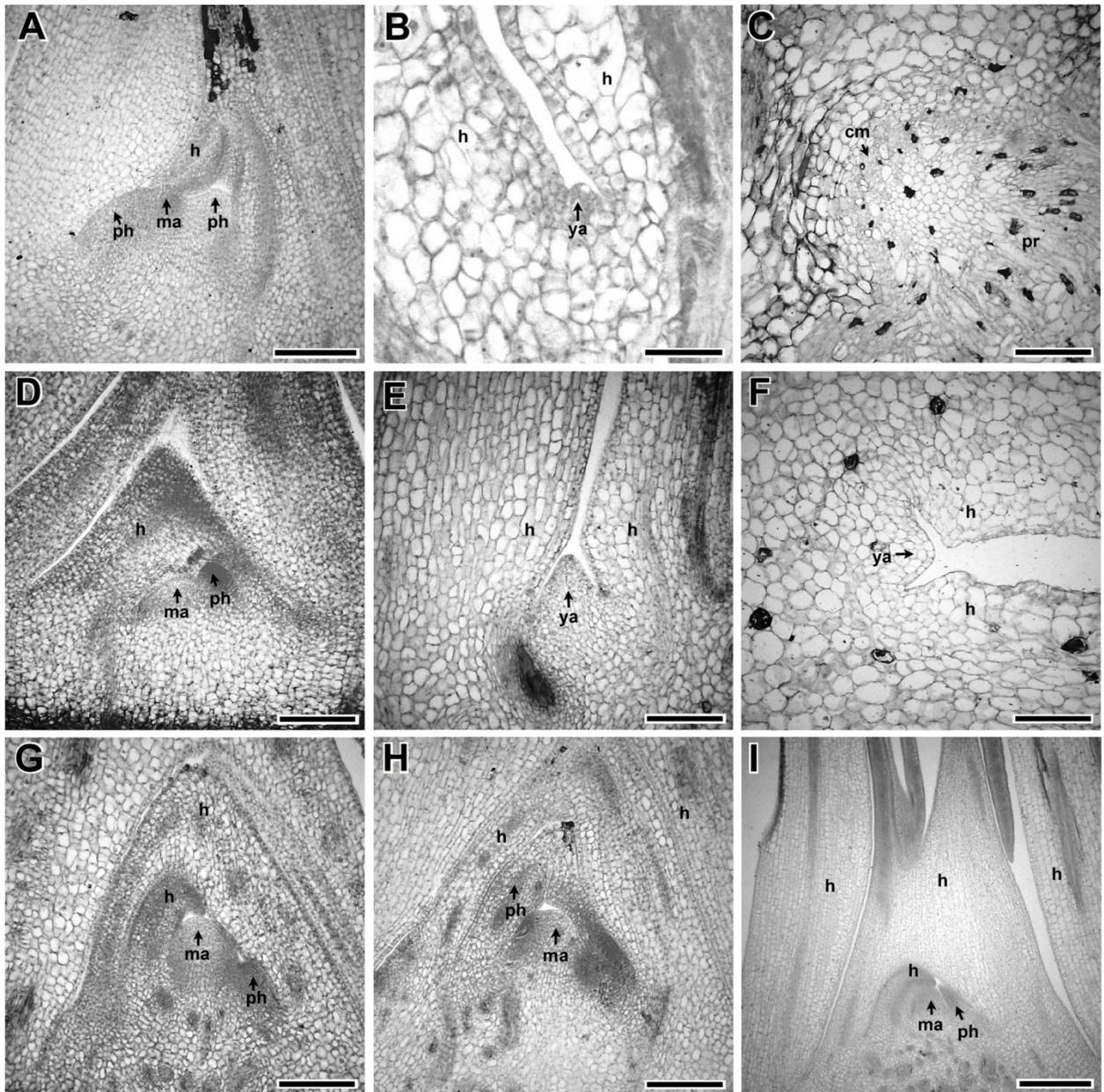


Figura 18. Origen histológico de los brotes de *H. collinsiana* (A, B, C), *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ (D, E, F) y *H. nickeriensis* (G, H, I) generados en explantes de yemas laterales. Cortes medianos del explante (A, D y G) una semana después de la siembra *in vitro* (barra=100 µm). B) Yema axilar a las cuatro semanas después de la siembra (barra=25 µm). C) Primordio de brote originado a partir de procambium en la base del explante 10 semanas después de la siembra (barra=100 µm). E) Yema axilar a las cuatro semanas después de la siembra (barra=100 µm). F) Yema axilar latente en la base del explante (barra=100 µm). H) Explante a las cuatro semanas (barra=100 µm). I) Alargamiento de la yema lateral a las 10 semanas (barra=150 µm). cm=células meristemáticas; h=hoja; ma=meristemo apical; ph=primordio de hoja; pr=procambium; ya=yema axilar.

En los explantes de *H. nickeriensis* sólo se observó alargamiento de las hojas (Figura 18H y 18I) pero no la diferenciación de yemas axilares, que posteriormente dieron origen a brotes laterales. Estas diferencias coinciden con el número de brotes obtenidos en la etapa de inducción, respuesta que se debió a que a las 10 semanas de edad las yemas laterales aún no emitían los primordios de brotes. No obstante, *in vitro* pudo observarse que los escasos brotes también aparecieron en la base de los explantes, y esta especie fue la que presentó los menores valores de inducción y multiplicación de brotes.

#### 4.4 Multiplicación de brotes

Los brotes generados en la fase de inducción se usaron en la etapa de multiplicación en donde se evaluó el efecto de BA y TDZ, ambos en combinación con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>).

##### 4.4.1 Efecto de la concentración de BA

En este experimento se probaron 15 tratamientos resultantes de tres especies de heliconias (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’) y cinco concentraciones de BA (0, 2.5, 3.5, 4.5 y 5.5 mg L<sup>-1</sup>) combinadas con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>), en cuanto a su efecto en la multiplicación de brotes. Las diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) detectadas revelan que la especie, concentración de BA y la interacción especie x concentración de BA afectan al número de BE, pero que el factor de mayor peso es la concentración de BA (86.0 % de la variación total); la concentración de BA también fue la que mayor efecto tuvo sobre B (%) y LB (cm), mientras que la especie y la interacción especie x concentración de BA tuvieron un comportamiento similar en la B y LB (Apéndice 9A).

Los brotes adventicios aparecieron después de ocho semanas en *H. collinsiana* y cv. ‘Golden Torch’, en tanto que en *H. nickeriensis* fue en la semana 10. *H. collinsiana* presentó la mejor respuesta morfogénica medida como BE (Núm.), seguida del cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis* (Cuadro 9). De forma similar a lo sucedido en la etapa de inducción de brotes, durante la fase de multiplicación se observó que el genotipo influyó en el número de BE.

**Cuadro 9. Respuesta organogénica medida en porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) en concentraciones de 6-benciladenina (BA) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA) (0.17 mg L<sup>-1</sup>), durante la multiplicación de brotes de tres especies de *Heliconia*.**

Tratamientos	B (%)	BE (Núm.)	LB (cm)
<b>Especie</b>			
<i>H. collinsiana</i>	70.00 a	2.09 a	1.88 a
cv. ‘Golden Torch’	65.00 a	1.76 b	1.60 a
<i>H. nickeriensis</i>	56.67 a	1.39 c	1.62 a

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (p≤0.05). n=12 repeticiones.

De las cinco concentraciones de BA probadas, todas en combinación con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>), la de 2.5 mg L<sup>-1</sup> fue donde se registró la mejor respuesta para B (%), BE (Núm.) y LB (cm). Las concentraciones de 3.5 y 4.5 mg L<sup>-1</sup> produjeron un efecto similar a la concentración de 2.5 mg L<sup>-1</sup> sobre la B, pero en éstas, el número de BE fue menor. La ausencia de BA en el medio de cultivo (Tratamiento testigo) no produjo brotes y en su lugar, todos los explantes generaron raíces. Las concentraciones de BA mayores de 3.5 mg L<sup>-1</sup> provocaron una disminución del número de BE, y estos fueron más cortos (Figura 19).

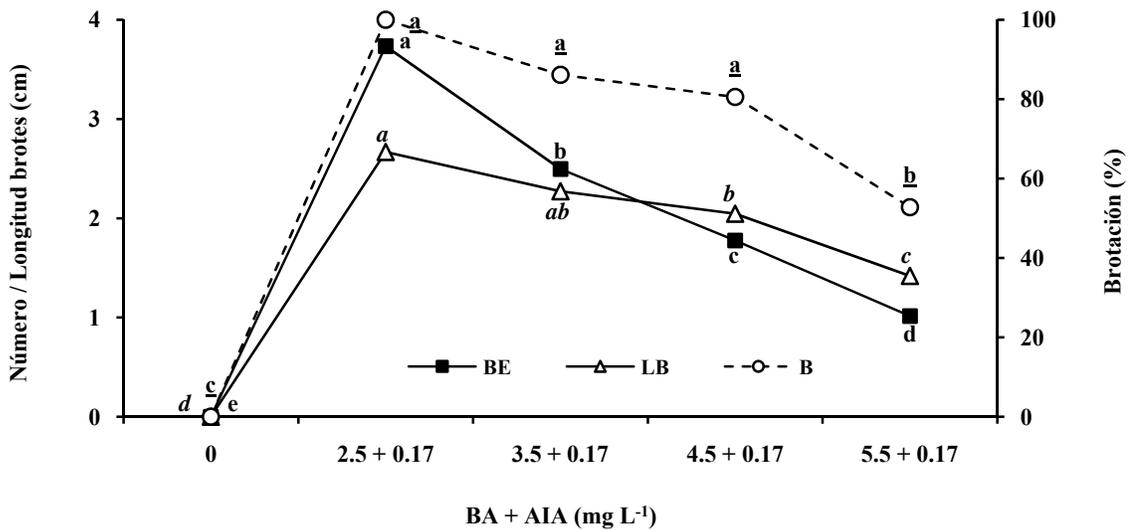


Figura 19. Efecto de concentraciones de 6-benciladenina (BA) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>) en la respuesta organogénica medida en porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB) en tres especies de heliconias en la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey, p≤0.05).

Si bien el tipo y concentración de citocinina a utilizarse en la etapa de multiplicación está en función de la tasa de multiplicación, longitud de brote y frecuencia de la variación genética, la BA es la citocinina más usada durante la multiplicación (Gaspar *et al.*, 1996). Al igual que en la fase de inducción de brotes, esta citocinina ha sido la que mejores resultados ha producido en la etapa de multiplicación en *H. psittacorum* cv. ‘Choconiana’ y *H. stricta* (Nathan *et al.*, 1992; Nogueira *et al.*, 2004), y en especies del género *Musa* (Wong, 1986; Mukunthakumar y Seeni, 2005; Kalimuthu *et al.*, 2007).

La adición de auxinas al medio de cultivo puede o no incrementar la proliferación de brotes axilares inducida por citocininas, según la especie. Todos los tratamientos de BA probados se combinaron con AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ) por considerarse que las auxinas a menudo mitigan el efecto inhibitorio de las citocininas sobre el alargamiento del brote, e incrementan el número de brotes útiles de longitud suficiente para el enraizamiento (Kane, 2005). Estos efectos de las auxinas han sido reportados en la mayoría de las especies micropropagadas de *Musa* (Mukunthakumar y Seeni, 2005; Kalimuthu *et al.*, 2007).

Las diferencias estadísticas encontradas en la interacción especie x concentración de BA sólo se observaron en la variable número de BE, donde la mayor cantidad se obtuvo en la concentración de  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA en combinación con  $0.17 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA, en *H. collinsiana* con 4.63 brotes, seguida del cv. ‘Golden Torch’ (3.71 brotes) y *H. nickeriensis* (2.95 brotes) (Figura 20 y 21).

Estos resultados son concordantes con los reportados por Nathan *et al.* (1992) quienes obtuvieron cinco brotes por explante al usar  $2.25 \text{ mg L}^{-1}$  de BA en *H. psittacorum* cv. ‘Choconiana’. Por su parte, Nogueira *et al.* (2004) alcanzaron el máximo número de brotes con 2 y  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (2.4 y 2.3 brotes, respectivamente) en *H. stricta*. Estas diferencias entre autores manifiestan la variación de la capacidad genética de las especies y cultivares de *Heliconia* medida como número de BE.

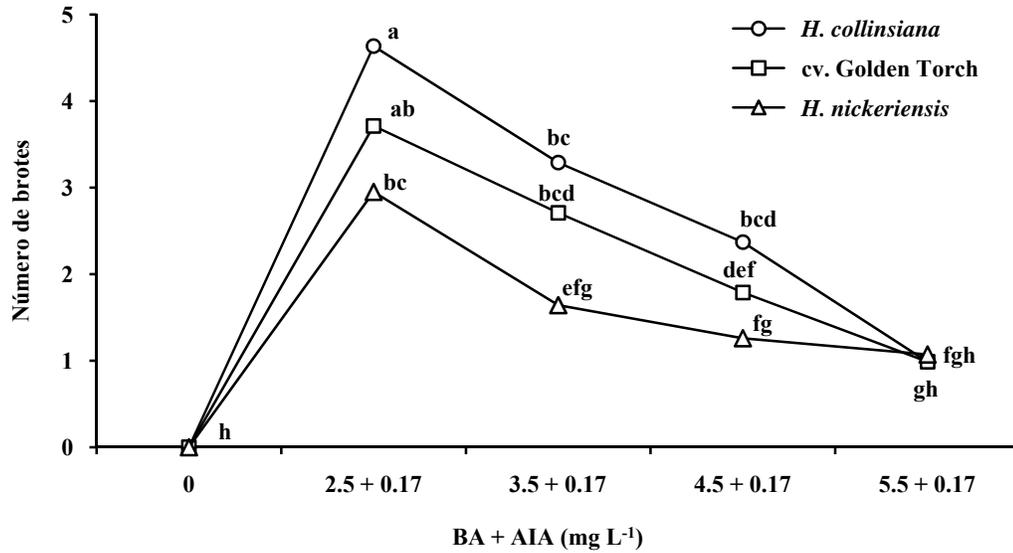


Figura 20. Efecto de la interacción especie y concentración de 6-benciladenina (BA) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante en tres especies de heliconias en la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey, p≤0.05).

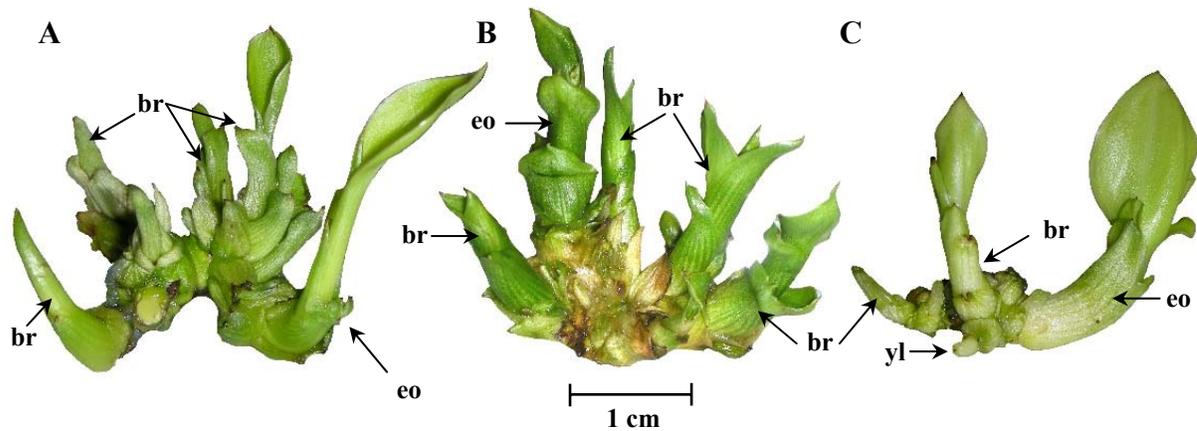


Figura 21. Multiplicación de brotes en tres especies de heliconias después de 10 semanas de cultivo en medio MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L<sup>-1</sup>) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’, y (C) *H. nickeriensis*. br = brote; eo = explante original; yl = yema lateral.

Aunque hubo diferencias estadísticas (p≤0.05) en las variables de brotación (B y BE) en *H. collinsiana*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis*, se puede afirmar que todas ellas son susceptibles de propagarse mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* vía organogénesis directa al usar yemas laterales como explantes.

Los brotes obtenidos en la etapa de multiplicación se sometieron a tres subcultivos, a intervalos de 28 d, al medio MS (1962) adicionado con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) combinado con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>), por ser esta combinación en la que se obtuvo el mayor número de BE. Con estas concentraciones hormonales es posible obtener hasta 156 brotes por explante en *H. collinsiana*, 78 en el cultivar ‘Golden Torch’, y 50 en *H. nickeriensis*, en un período de 12 semanas (84 d) vía organogénesis directa a partir de yemas laterales (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Promedios de brotes por explante (BE) en la etapa de multiplicación de brotes de tres especies de heliconias después de 4, 8 y 12 semanas de la siembra *in vitro* en medio de cultivo MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L<sup>-1</sup>) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>).**

Especie	BE (Núm.)		
	4 semanas (1er subcultivo)	8 semanas (2do. Subcultivo)	12 semanas (3er. subcultivo)
<i>H. collinsiana</i>	5.82	5.21	5.17
cv. ‘Golden Torch’	4.56	4.12	4.17
<i>H. nickeriensis</i>	3.84	3.67	3.55

Esta forma de propagación *in vitro* puede aplicarse para aquellas especies y cultivares de heliconias comerciales que tienen una tasa de propagación muy baja en campo y en las que se puedan encontrar amenazadas o en peligro de extinción. También tiene un amplio potencial para la propagación clonal *in vitro* de especies que se encuentran relacionadas filogenéticamente con *Heliconia* y, en general, para especies cuya principal fuente de explantes sean yemas laterales de rizomas subterráneos.

#### 4.4.2 Efecto de la concentración de tidiazurón (TDZ)

A pesar de que la citocinina BA resultó eficiente para la multiplicación de brotes, se investigó, de forma independiente, el uso del tidiazurón para aumentar la cantidad de brotes por explante. Para ello se probaron 33 tratamientos resultantes de las combinaciones de tres especies de heliconias (*H. collinsiana*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis*), cinco concentraciones de TDZ (0.24, 0.34, 0.44, 0.54 y 0.64 mg L<sup>-1</sup>) y dos concentraciones de AIA (0.0 y 0.17 mg L<sup>-1</sup>), en cuanto a su efecto en la multiplicación de brotes. El tratamiento testigo para cada especie estuvo constituido por BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>), que fue la

combinación que mayor número de brotes por explante produjo en el experimento de multiplicación con BA.

Se detectaron diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) de los tres factores evaluados y de sus interacciones en los BE (Núm.), éstas fueron generadas por los factores principales (especie, concentración de TDZ y concentración de AIA) que en conjunto explicaron 96.3 % de la variación total. En la LB las diferencias estadísticas fueron producidas por la especie, concentración de TDZ y la interacción especie x TDZ. En todos los tratamientos de TDZ probados el porcentaje de brotación fue de 100 % (Apéndice 10A).

*H. collinsiana* fue la especie donde se dio la mejor respuesta en BE comparada con cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis* (Apéndice 11A). La diferencia en la capacidad morfogénica entre especies se expresó desde la etapa de inducción y multiplicación de brotes en BA y, de forma consistente, *H. collinsiana* fue la mejor seguida de cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis*. En banano se encontraron diferencias genotípicas en la tasa de proliferación de brotes, que se explican por las diferentes tasas de absorción (Blakesley, 1991), tasas de translocación a regiones meristemáticas, y de procesos metabólicos, en los que las citocininas pueden ser degradadas o conjugadas con azúcares o aminoácidos para formar compuestos biológicamente inertes.

Después de ocho semanas de cultivo, todas las concentraciones de TDZ superaron el número de brotes obtenido en el testigo [BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>)], independientemente de su combinación con el AIA; sin embargo, con TDZ se redujo la longitud de los brotes. El mayor número de BE se obtuvo en la concentración de 0.44 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, ya que en concentraciones superiores o inferiores los valores fueron menores. Estos resultados obtenidos en la proliferación de brotes en *H. collinsiana*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis* revelaron que el TDZ duplicó la tasa de multiplicación en comparación con el BA (Figura 22).

La mayor multiplicación de brotes inducida por el TDZ, probablemente se debe a su habilidad para incrementar la biosíntesis de citocininas endógenas de tipo adenina (Huetteman y Preece, 1993). No obstante la popularidad del TDZ como hormona vegetal por más de tres décadas de investigación, su modo específico de acción bioquímica aún no se ha descubierto. Jones *et al.* (2007) propusieron que la morfogénesis inducida por el TDZ involucra una cascada metabólica

que incluye: una señalización inicial, acumulación y transporte de señales endógenas como auxinas y melatonina, acción de un sistema de mensajeros secundarios y una respuesta a estrés concurrente que puede o no manifestarse como morfogénesis.

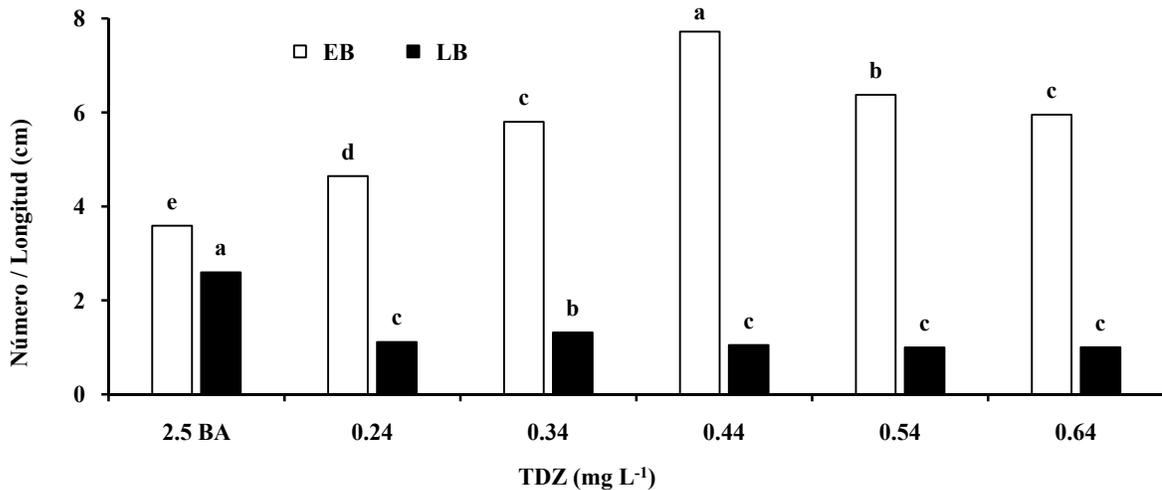


Figura 22. Efecto de concentraciones de tiazurón (TDZ) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (EB) y longitud de brote (LB) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones. Letras iguales no difieren significativamente (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, el TDZ se ha usado eficientemente para inducir la formación de brotes adventicios y la proliferación de brotes axilares. Su actividad citocinínica lo hace más efectivo que las citocininas tipo purinas en la micropropagación, y actúa en concentraciones bajas. Si bien se descubrió su efectividad en especies leñosas, el TDZ también ha facilitado el incremento de brotes en claveles y rosas (Lu, 1993).

Debido a que esta investigación constituye el primer reporte del uso del TDZ en la multiplicación de brotes de *Heliconia*, las concentraciones evaluadas se fundamentaron en el hecho de que su actividad citocínica en la micropropagación puede alcanzarse en concentraciones del orden de 0.1-1.0  $\mu\text{M}$ . Por ello, las comparaciones directas entre el TDZ y las citocininas amino purinas en concentraciones equimolares complican el análisis de las respuestas obtenidas, ya que las diferentes citocininas amino purinas tienen rangos de actividad efectivos de 1-10  $\mu\text{M}$ . El uso del TDZ en estos intervalos provoca una excesiva formación de callos y disminución del crecimiento

de los brotes (Huetteman y Preece, 1993). Por tanto, en la etapa de multiplicación de brotes de heliconias el BA y el TDZ se probaron de manera independiente.

El TDZ produjo la mejor respuesta en el número de BE cuando se combinó con el AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ) que cuando se aplicó solo (Apéndices 11A y 13A). En la propagación *in vitro* de *Echinacea purpurea* a partir de explantes de hoja, se determinó que los inhibidores de la biosíntesis, transporte, acción y modulación simultánea del AIA endógeno, suprimen la regeneración inducida por el TDZ, y evidencian que las auxinas están involucradas en la morfogénesis mediada por el tidiazurón (Jones *et al.*, 2007). Un efecto similar producido por las auxinas fue observado por Gubbuk y Pekmezci (2004), quienes obtuvieron la mayor cantidad de brotes en los cultivares de banano ‘Alanya 5’, ‘Anamur 10’ y ‘Bozyazi 14’, cuando combinaron TDZ con AIA, que cuando el TDZ se aplicó solo. El mismo comportamiento también se obtuvo en los cultivares de banano ‘Anamur 2’, ‘Dwarf Cavendish’ y ‘Gazipasa 6’ (Gubbuk y Pekmezci, 2006).

*H. collinsiana* fue la especie donde se obtuvo el mayor número de BE en la concentración de  $0.44 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ en combinación con AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ), seguida del cv. ‘Golden Torch’ y *H. nickeriensis*; en tanto que la mayor LB se obtuvo en el tratamiento testigo ( $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  BA +  $0.17 \text{ mg L}^{-1}$  AIA) en las tres especies de heliconias (Apéndices 12A y 14A).

En los cultivares de banano ‘Alanya’, ‘Anamur 10’ y ‘Bozyazi 14’ el TDZ en la concentración de  $0.44 \text{ mg L}^{-1}$  en combinación con AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ), también fue eficiente para inducir la mayor tasa de multiplicación (Gubbuk y Pekmezci, 2004). En cambio, Youmbi *et al.* (2006) reportaron que el TDZ es requerido en concentraciones menores de  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  para conseguir la máxima multiplicación en los cultivares de banano ‘Topala’, ‘Dwarf-Kalapua 2’, ‘Pelipita’ y ‘Gros-Michel’. En los cultivares ‘Kibuzi’ y ‘Ndisiwemiti’, se requieren de concentraciones de TDZ ocho veces superiores a los cultivares anteriores para obtener la mejor respuesta ( $1.25$  y  $1.49 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente) (Arinaitwe *et al.*, 2000).

En las tres especies de heliconias evaluadas, el tidiazurón incrementó notablemente la tasa de multiplicación, independientemente de su combinación con el AIA. Comparadas con la mejor concentración de multiplicación obtenida con el BA [ $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  + AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ )], el TDZ combinado con AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ) duplicó la tasa de multiplicación. Así en *H. collinsiana* el

número de BE fue 2.6 veces mayor, 2.5 en el cv. ‘Golden Torch’ y 2.4 en *H. nickeriensis* (Apéndice 15A, Figura 23). Es importante resaltar que en esta última especie se obtuvieron los valores más bajos de inducción y multiplicación de brotes al usar el BA, pero con TDZ se pudieron aumentar. La efectividad del TDZ también se ha observado en la propagación *in vitro* de cultivares recalcitrantes de banano y en el incremento de la tasa de proliferación en cultivares no recalcitrantes (Arinaitwe *et al.*, 2000; Youmbi *et al.*, 2006).

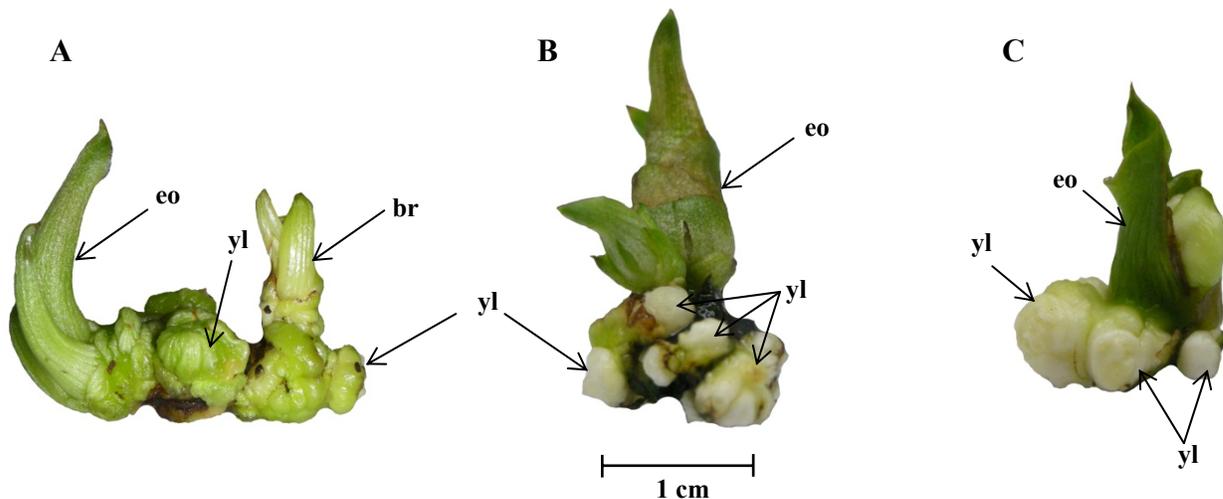


Figura 23. Multiplicación de brotes en tres especies de heliconias después de ocho semanas de cultivo en medio MS (1962) suplementado con tiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’, (C) *H. nickeriensis*. br = brote; eo=explante original; yl = yema lateral.

Además de la disminución en la longitud de los brotes provocada por el TDZ, aproximadamente 50 % de los explantes establecidos mostraron brotes fasciados (arrosetados). Estos efectos no deseados son consecuencia intrínseca del TDZ ya que al aumentar la proliferación de brotes adventicios también inhibe su elongación (Huetteman y Preece, 1993).

Para propiciar el alargamiento, los brotes se transfirieron a un medio con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>), durante seis semanas, y los brotes fasciados no tuvieron problemas para su desarrollo (Figura 24). La fasciación comúnmente se asocia con el uso prolongado del TDZ en algunas especies, y los brotes fasciados difieren marcadamente de los normales y, posiblemente, el grupo fenil del TDZ pueda ser la causa (Huetteman y Preece, 1993).

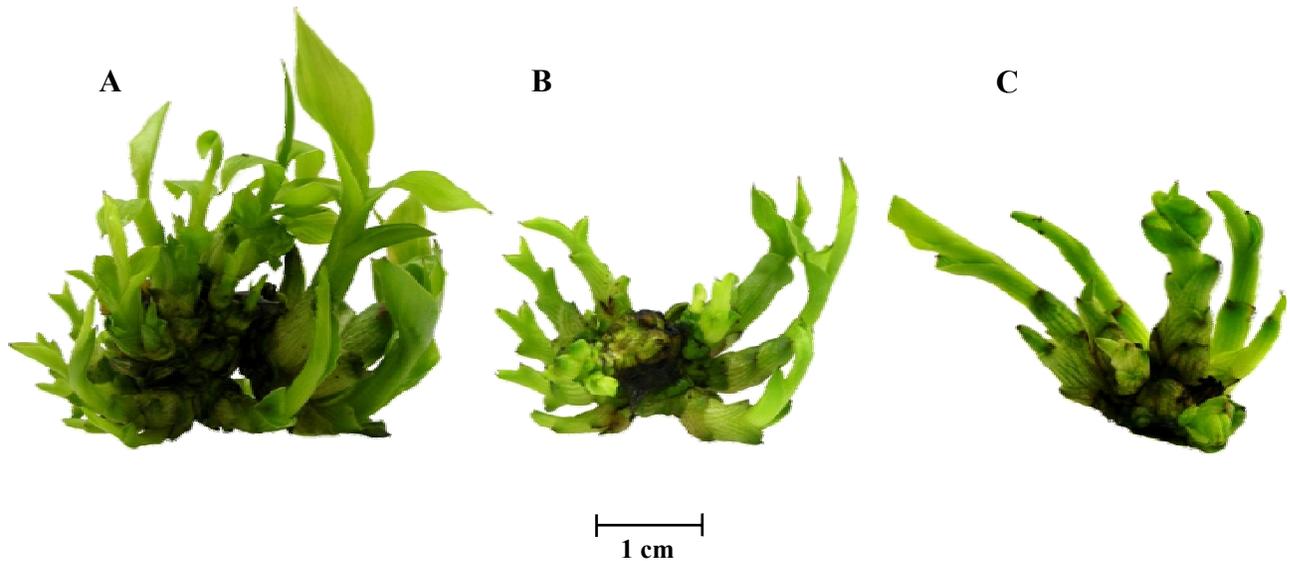


Figura 24. Alargamiento de brotes en tres especies de heliconias después de seis semanas de cultivo en medio MS (1962) suplementado con 6-benciladenina (BA,  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA,  $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y (C) *H. nickeriensis*. Los brotes permanecieron ocho semanas en un medio de cultivo MS (1962) suplementado con tiazurón (TDZ,  $0.44 \text{ mg L}^{-1}$ ) en combinación con AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ), antes de ser transferidos al medio con BA.

En los cultivares de banano 'Ndziwemiti' y 'Cavendish' los brotes fasciados proliferaron eficientemente cuando se transfirieron a un medio sin hormonas (Arinaitwe *et al.*, 2000; Lee, 2005). Sin embargo, Chen y Yeh (2007) reportaron que en *Aglaoenema* la fasciación de brotes inhibió su desarrollo posterior cuando se transfirieron a un medio sin fitohormonas o con otra citocinina.

Se ha reportado que el tiazurón conduce a la formación de muchos brotes cortos *in vitro* en varias especies leñosas. Esta inhibición del alargamiento por el TDZ puede ser consistente con su alta actividad citocínica, ya que las citocininas comúnmente estimulan la proliferación de brotes e inhiben su alargamiento, y no debe considerarse como un efecto tóxico. Como ocurrió en las tres especies de heliconias, este problema de elongación del brote puede solucionarse si los brotes se transfieren a un medio sin hormonas o con una citocinina diferente (Huetteman y Preece, 1993; Lu, 1993).

Al igual que en la multiplicación con BA, los brotes generados con el TDZ se subcultivaron tres veces, a intervalos de 28 d al medio MS (1962) suplementado con BA ( $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) combinado

con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>). Este cambio de medio se hizo porque no es recomendable el uso del TDZ por períodos mayores de ocho semanas. Así se logró que los brotes en los subcultivos conservaran la alta tasa de multiplicación inducida por el TDZ (Cuadro 11). El uso de estas concentraciones hormonales, después del TDZ, es factible para la obtención de hasta 823 brotes por explante en *H. collinsiana*, 322 en el cultivar ‘Golden Torch’, y 171 en *H. nickeriensis*, en un período de 12 semanas (84 d) vía organogénesis directa a partir de yemas laterales (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Promedios de brotes por explante (BE) en la etapa de multiplicación de brotes de tres especies de heliconias después de 4, 8 y 12 semanas de la siembra *in vitro* en medio de cultivo MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L<sup>-1</sup>) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>). Los brotes procedían de medio de cultivo MS suplementado con tidiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>).**

Especie	BE (Núm.)		
	4 semanas (1er subcultivo)	8 semanas (2do. subcultivo)	12 semanas (3er. subcultivo)
<i>H. collinsiana</i>	10.50	9.15	8.57
cv. ‘Golden Torch’	7.14	7.51	6.01
<i>H. nickeriensis</i>	6.16	5.53	5.03

Los resultados obtenidos en la multiplicación de brotes de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’, demuestran que el TDZ (0.44 mg L<sup>-1</sup>) en combinación con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>), es más efectivo que el BA para incrementar el número de brotes por explante. A pesar de que los brotes obtenidos con TDZ son más pequeños que con BA y que puede presentarse fasciación, estos brotes se desarrollan bien cuando se transfieren a un medio de cultivo con BA.

#### 4.5 Enraizamiento *in vitro* de plántulas

Todos los brotes establecidos en el medio libre de hormonas (Tratamiento testigo) durante la etapa de multiplicación generaron raíces, pero aún así se evaluó el efecto de las auxinas ANA y AIB para aumentar el enraizamiento. Para ello, en este experimento se probaron nueve tratamientos resultantes de tres especies de heliconias (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’) y tres tipos de auxinas, [MS (testigo), ANA (0.18 mg L<sup>-1</sup>) y AIB (0.2 mg L<sup>-1</sup>)] en cuanto a su efecto en el enraizamiento de plántulas.

Se detectaron diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos en el número de raíces (R), longitud de raíces (LR) y altura de plántula (AP) por efecto de los dos factores: especies y tipo de auxina, y de la interacción especie x tipo de auxina (Apéndice 16A). El enraizamiento de las plántulas en las tres heliconias estudiadas ocurrió después de cuatro semanas de incubación. La especie *H. nickeriensis* presentó la mejor respuesta morfogénica en R, LR y AP. Para la LR, en el cv. 'Golden Torch' también se obtuvieron los mayores valores. Respecto a los tratamientos con auxinas, con el ANA fue donde se expresó la mejor respuesta para R, LR y AP, comparada con el AIB y el testigo (MS) (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Respuesta organogénica medida en número de raíces (R), longitud (LR) y altura de plántula (AP) con diferentes auxinas durante el enraizamiento *in vitro* de plántulas de tres especies de heliconia.**

Tratamientos	R (Núm.)	LR (cm)	AP (cm)
<b>Especie</b>			
<i>H. collinsiana</i>	6.06 b	4.10 b	6.93 b
cv. 'Golden Torch'	5.86 b	4.80 a	6.33 c
<i>H. nickeriensis</i>	6.44 a	4.59 a	8.83 a
<b>Auxina</b>			
MS (testigo)	5.00 b	2.34 c	6.89 b
ANA (0.18 mg L <sup>-1</sup> )	9.06 a	7.48 a	9.27 a
AIB (0.20 mg L <sup>-1</sup> )	4.31 c	3.66 b	5.93 c

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=12 repeticiones.

Los brotes generados *in vitro* frecuentemente se necesitan enraizar para convertirlos en una planta funcional que pueda ser trasladada al invernadero. En muchas especies vegetales los brotes generan raíces *in vitro* fácilmente después de transferirlos de un medio de regeneración, el cual generalmente tiene una alta concentración de citocininas, a un medio libre de fitohormonas. Para lograr un enraizamiento *in vitro* eficaz se requiere del uso de auxinas y su eficiencia depende, principalmente, de la especie vegetal (Gaba, 2005).

El enraizamiento obtenido en el medio libre de hormonas indica que las heliconias tienen la habilidad para generar raíces fácilmente. Esta respuesta también se ha observado en *H. psittacorum* cv. 'Choconiana', *Alstroemeria* y *Musa*, en las que el enraizamiento ocurrió en un medio sin hormonas (Nathan *et al.*, 1992; Mukunthakumar y Seení, 2005; Pedraza-Santos *et al.*, 2006; Promsorn y Kanchanapoom, 2006).

El enraizamiento de *H. collinsiana*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y *H. nickeriensis* fue mejor en presencia del ANA (Apéndice 17A, Figura 25). ANA también fue la auxina que mejor enraizamiento produjo en plántulas de *Musa* sp. cv. 'Maçã' y *Musa paradisiaca* (Domingues *et al.*, 1995; Priyono, 2001).

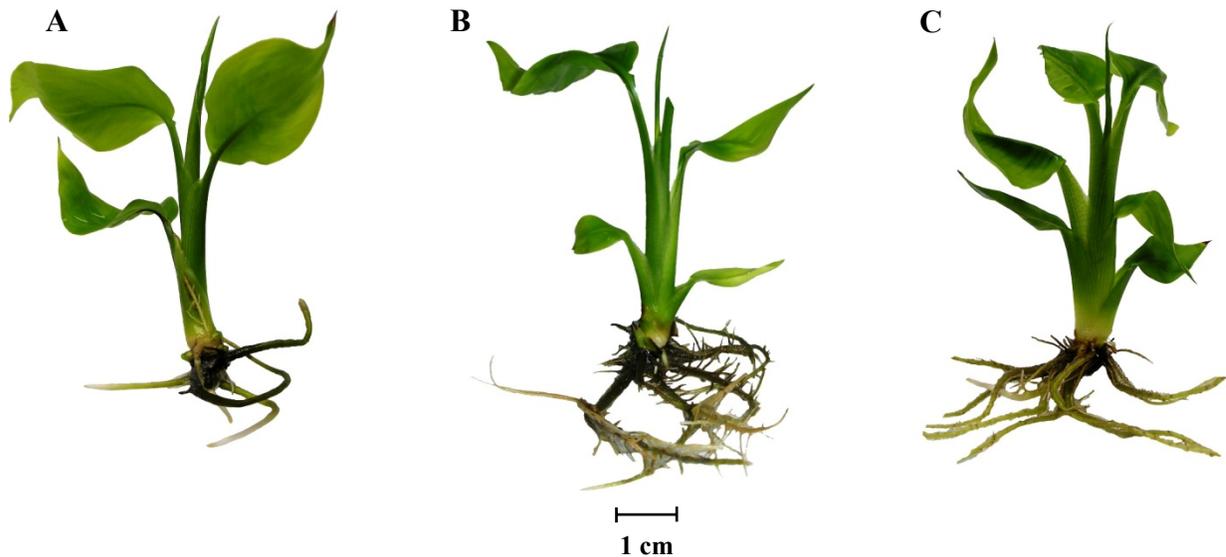


Figura 25. Enraizamiento de plántulas de tres especies de heliconias después de cuatro semanas de cultivo en medio de cultivo MS (1962) suplementado con ácido 1-naftalenacético (ANA,  $0.18 \text{ mg L}^{-1}$ ). (A) *H. collinsiana*, (B) *H. nickeriensis* y (C) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'.

En la presente investigación se logró el desarrollo de un protocolo para la producción de plántulas de tres especies de heliconias (*H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch') vía organogénesis directa a partir de yemas laterales de plantas cultivadas en campo (Figura 26-29). Es posible que esta metodología puede ser usada en la propagación clonal de otros cultivares comerciales de heliconias e incluso en los recalcitrantes. También podría servir para la propagación de especies relacionadas filogenéticamente con *Heliconia* (*Musa*, *Zingiber*, *Strelitzia*, entre otras).

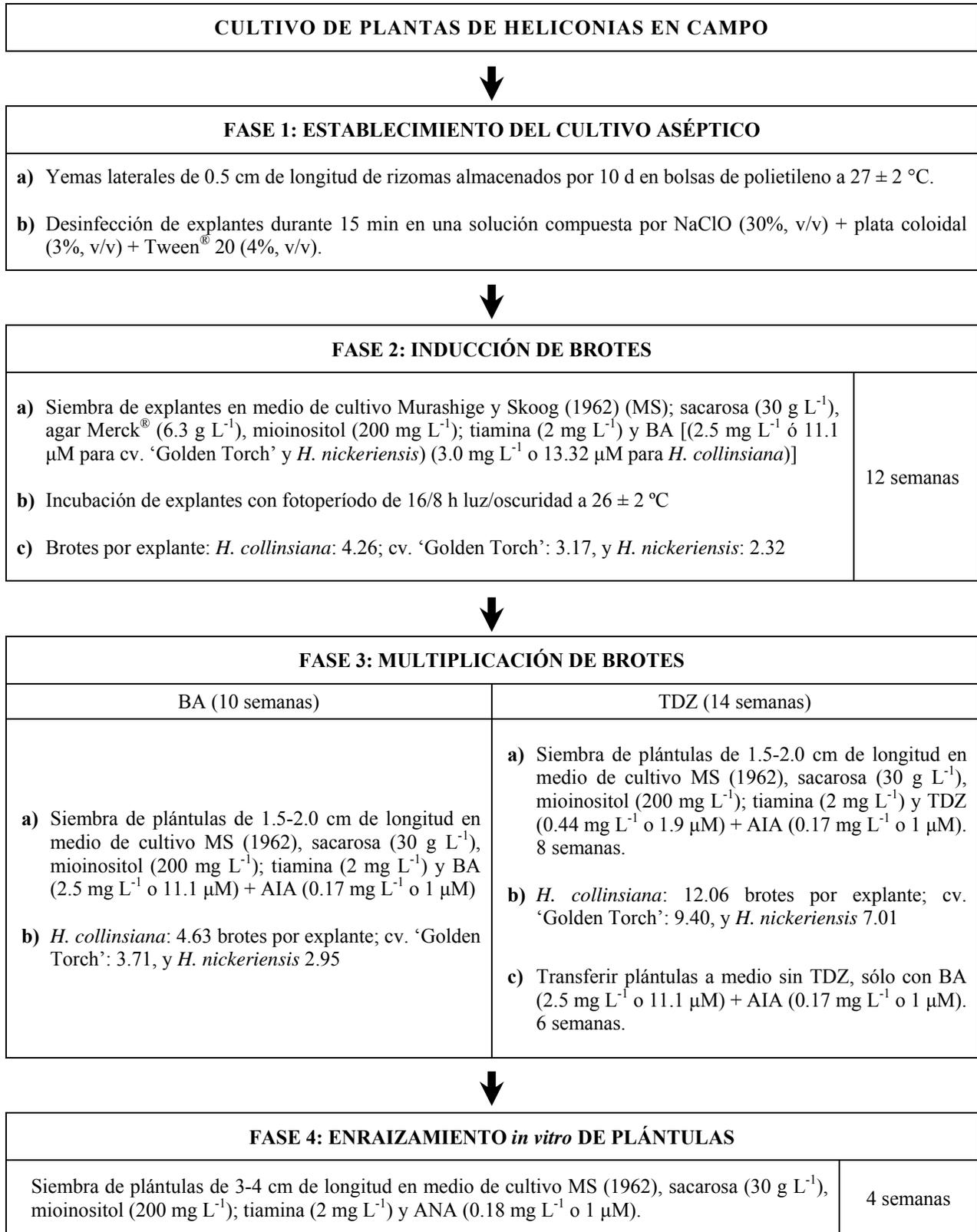


Figura 26. Representación esquemática de la regeneración *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ vía organogénesis directa.

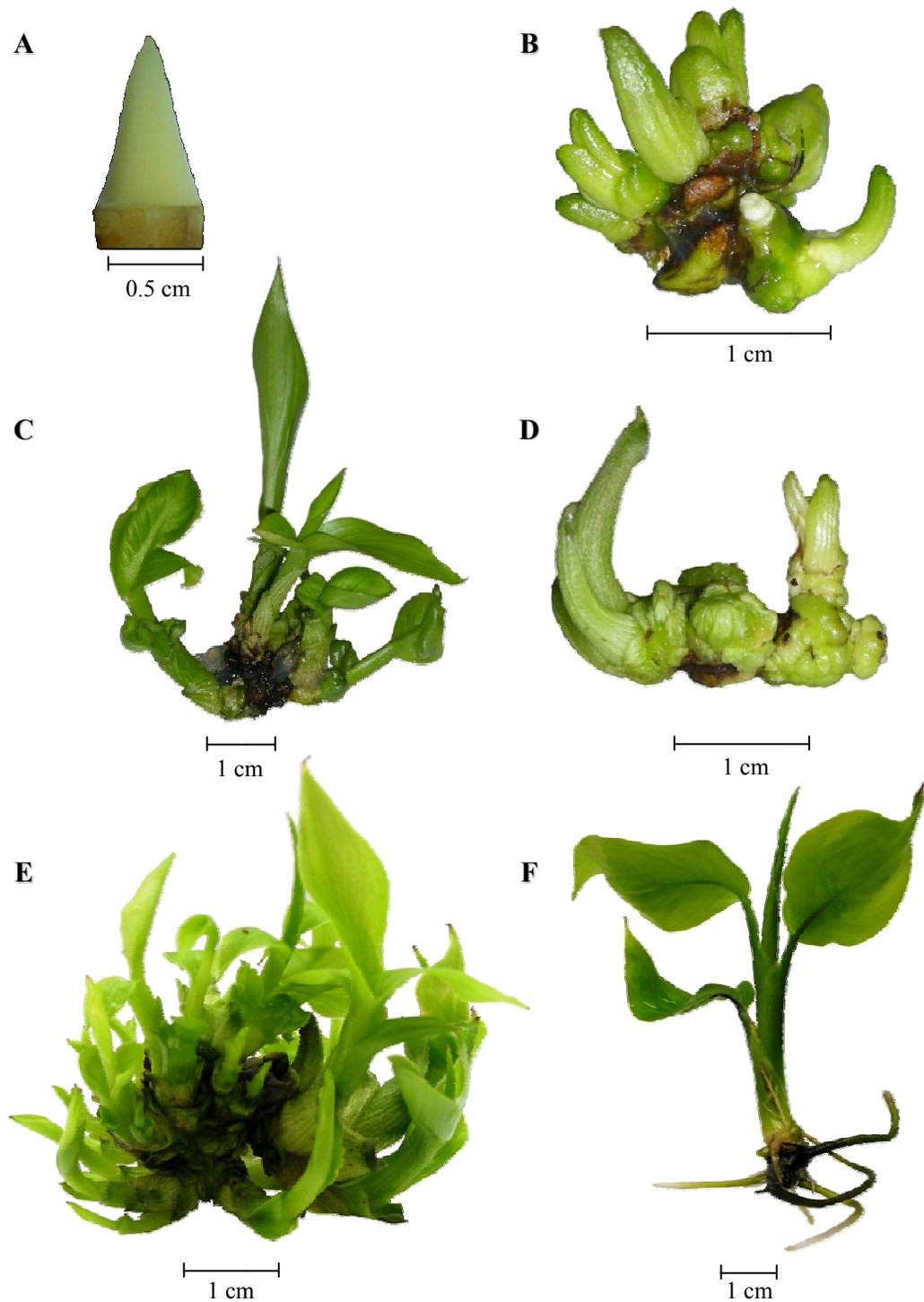


Figura 27. Regeneración *in vitro* de *H. collinsiana* vía organogénesis directa. A) Explante inicial (yema lateral); B) Inducción de brotes en medio MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 3.0 mg L<sup>-1</sup>); C) Multiplicación de brotes en BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>); D) Multiplicación de brotes en tiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); E) Alargamiento de brotes inducidos por TDZ en medio con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); F) Enraizamiento *in vitro* de plántulas con ácido 1-naftalenacético (ANA, 0.18 mg L<sup>-1</sup>).

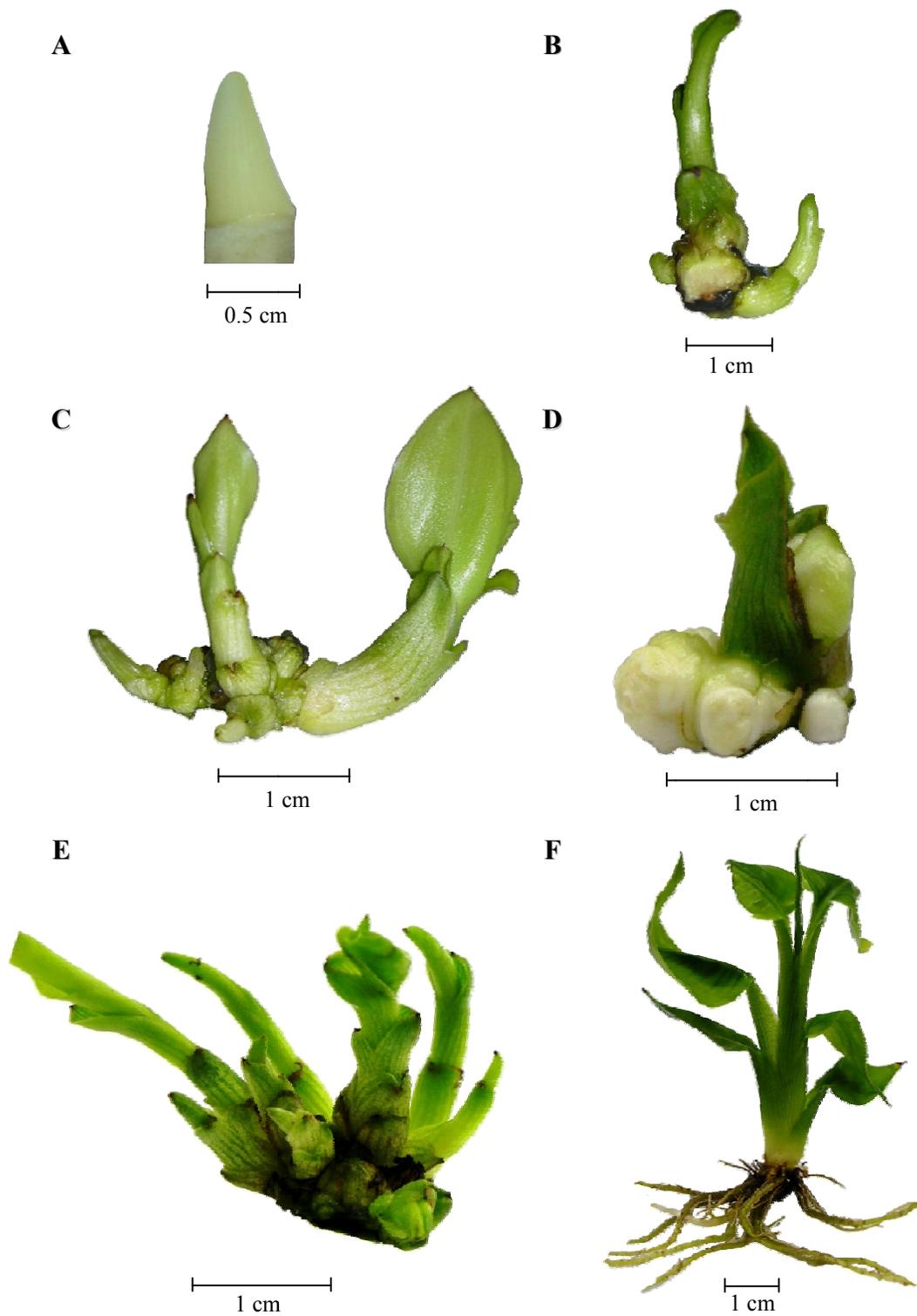


Figura 28. Regeneración *in vitro* de *H. nickeriensis* vía organogénesis directa. A) Explante inicial (yema lateral); B) Inducción de brotes en medio MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA, 2.5 mg L<sup>-1</sup>); C) Multiplicación de brotes en BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>); D) Multiplicación de brotes en tidiazurón (TDZ, 0.44 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); E) Alargamiento de brotes inducidos por TDZ en medio con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>); F) Enraizamiento *in vitro* de plántulas con ácido 1-naftalenacético (ANA, 0.18 mg L<sup>-1</sup>).

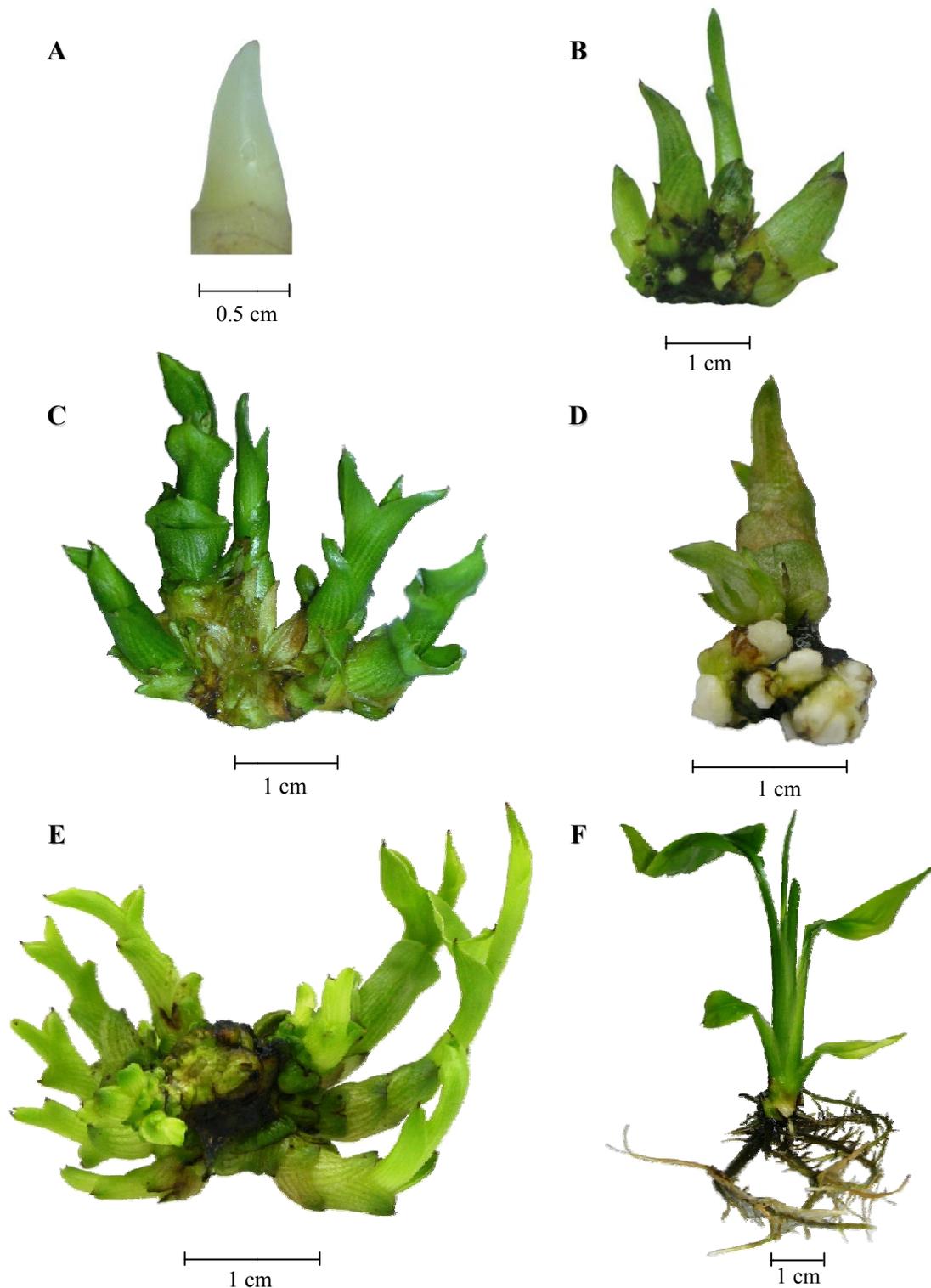


Figura 29. Regeneración *in vitro* de *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' vía organogénesis directa. A) Explante inicial (yema lateral); B) Inducción de brotes en medio MS (1962) adicionado con 6-benciladenina (BA,  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ ); C) Multiplicación de brotes en BA ( $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) + ácido indol-3-acético (AIA,  $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ); D) Multiplicación de brotes en tiazurón (TDZ,  $0.44 \text{ mg L}^{-1}$ ) + AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ); E) Alargamiento de brotes inducidos por TDZ en medio con BA ( $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) + AIA ( $0.17 \text{ mg L}^{-1}$ ); F) Enraizamiento *in vitro* de plántulas con ácido 1-naftalenacético (ANA,  $0.18 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 4.6 Germinación *in vitro* de semillas

El método de esterilización empleado con las semillas resultó ser eficiente para el establecimiento del cultivo aséptico, ya que se logró 100 % de semillas libres de contaminación. No obstante, la germinación fue nula en las tres especies evaluadas. Las semillas se subcultivaron a medio fresco cada 30 d y del total de semillas establecidas de las tres heliconias, sólo se observó la germinación de una semilla (1.6 %) en *H. bihai* cv. 'Pink Peach' después de 45 semanas de incubación (10.5 meses) en el tratamiento de 60 min en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, v/v) (Figura 30). En *H. collinsiana* y *H. platystachys* cv. 'Sexy Orange' la respuesta fue nula. El lapso de observación se debió a que la germinación de las semillas de heliconias *in vivo* puede perdurar de tres meses hasta tres años (Montgomery, 1986).

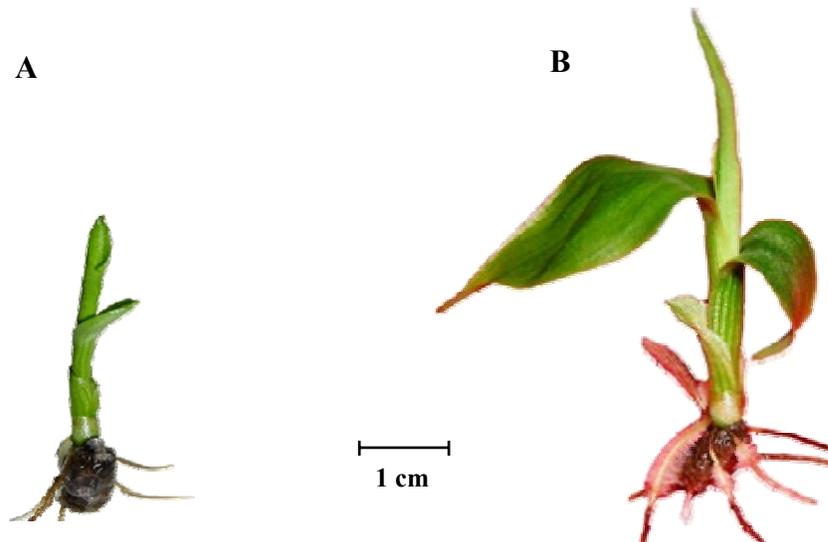


Figura 30. Plántulas desarrolladas a partir de semilla germinada de *H. bihai* cv. 'Pink Peach' durante 45 semanas (10.5 meses) de incubación en la mitad de concentración de sales del medio MS (1962). (A) Plántula a las 46 semanas (B) Plántula a las 50 semanas.

El período de germinación *in vivo* de *Heliconia* puede tomar de cuatro meses hasta tres años, según el grado de desarrollo del embrión al momento de la maduración del fruto (Montgomery, 1986). Además, es necesaria la escarificación de la semilla para romper la barrera y liberar al embrión para que éste pueda germinar (Torres *et al.*, 2005). Sin embargo, la escarificación no necesariamente incrementa o acelera la germinación en especies de heliconias debido a que el

embrión de las heliconias presenta latencia al momento de la maduración del fruto (Criley, 1988; Simão y Scatena, 2003).

Quizá la limitante más importante en la propagación de heliconias mediante semillas es que las características fenotípicas deseables no se pueden mantener. La progenie por semillas puede ser muy variable, aunque en especies como *H. stricta* cv. 'Dwarf Jamaican' las plantas obtenidas a partir de semillas son uniformes como la planta madre, pero su crecimiento es menor que las propagadas por rizomas (Criley, 1989; Criley y Broschat, 1992).

La hibridización puede ser otro factor limitante en la propagación de heliconias mediante semillas. Aunque de manera natural, la hibridización interespecífica en heliconias es rara y el ejemplo más común es el híbrido entre *H. lathispata* y *H. imbricata* encontrado en Centroamérica. La mayoría de los híbridos se presentan en áreas perturbadas por el hombre. La hibridización llega a ser común en especies cultivadas porque están estrechamente cercanas y por la acción de los polinizadores (Kress, 1983).

Por los largos tiempos de germinación, la variabilidad de la progenie, el crecimiento lento, la hibridización y el bajo porcentaje de germinación, se prefiere la propagación vegetativa mediante rizomas. La propagación por semillas sólo puede ser práctica para investigaciones enfocadas al desarrollo de nuevos cultivares.

## V. CONCLUSIONES

El establecimiento del cultivo aséptico a partir de yemas laterales de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' es posible con NaClO (30%, v/v), Tween<sup>®</sup> 20 (4 % v/v) y plata coloidal (3%, v/v).

La regeneración *in vitro* de *H. nickeriensis*, *H. psittacorum* cv. 'Sassy' y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' a partir de ápices de inflorescencias y frutos inmaduros no es viable.

El uso de explantes de yemas laterales de 5 mm de longitud permiten reducir la tasa de contaminación a menos de 10 % en *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch', en comparación con yemas  $\geq 1.0$  cm.

La regeneración *in vitro* en *H. psittacorum* cv. 'Sassy' y *H. wagneriana* es difícil debido a la alta tasa de contaminación producida por bacterias endógenas en explantes de yemas laterales (46.7 y 60.0 %, respectivamente).

El proceso de regeneración *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' sólo es posible vía organogénesis directa a partir de yemas laterales como explantes.

La capacidad organogénica en la inducción de brotes vegetativos fue expresada de manera diferencial en las tres especies de heliconias. Fue mayor en *H. collinsiana* con 4.26 brotes por explante, seguida de *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' con 3.17, y *H. nickeriensis* presentó la menor capacidad con 2.32 brotes por explante.

La mejor respuesta a la inducción de brotes en las tres especies de heliconias ocurrió en presencia de la citocinina BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>).

Histológicamente se confirmó que los brotes de *H. collinsiana* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' se originaron en la base del explante a partir de yemas axilares y de primordios de brote diferenciados a partir de procámbium. En ambas especies la

iniciación de primordios de brote se dio a las cuatro semanas después de la siembra. En *H. nickeriensis* sólo se observó el alargamiento de las hojas del explante y no se apreció el origen histológico de los brotes.

También hubo diferencias entre las especies de heliconias en la tasa de multiplicación de brotes vegetativos, ya que *H. collinsiana* superó a *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y a *H. nickeriensis*.

La multiplicación de brotes en las tres especies de heliconias es posible ya sea con el uso de BA o TDZ, ambas en combinación con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>). La multiplicación de brotes en *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' se logró con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de BA + 0.17 mg L<sup>-1</sup> AIA. Con TDZ a 0.44 mg L<sup>-1</sup> en combinación con AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>) la tasa de multiplicación de *H. collinsiana* fue 2.6 veces mayor que con BA, 2.53 veces en *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y 2.38 veces en *H. nickeriensis*.

El enraizamiento *in vitro* de plántulas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' se consiguió en un medio de cultivo libre de hormonas y se puede incrementar con el uso de ANA (0.18 mg L<sup>-1</sup>).

La germinación *in vitro* de las semilla de heliconias no es práctica debido a los largos tiempos de germinación, la variabilidad de la progenie, el crecimiento lento, la hibridización y el bajo porcentaje de germinación.

Con el sistema de regeneración *in vitro* desarrollado es posible obtener, en un lapso de seis meses, 156 brotes por explante en *H. collinsiana*, 78 en cv. 'Golden Torch', y 50 en *H. nickeriensis* con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>). Esta tasa de multiplicación se puede aumentar hasta 5.2 veces en *H. collinsiana*; 4.1 veces en cv. 'Golden Torch', y 3.4 veces en *H. nickeriensis* con TDZ (0.44 mg L<sup>-1</sup>) + AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>).

Este sistema de regeneración *in vitro* puede servir de base para la propagación potencial de especies con hábito de crecimiento similar a las heliconias (*Cúrcuma*, *Etlíngera*, *Musa*, *Ravenala*, *Strelitzia*, entre otras), cuya única fuente de explante sean yemas laterales de rizomas.

## VI. RECOMENDACIONES

Para inducir la regeneración *in vitro* en heliconias a partir de explantes de frutos inmaduros y ápices de inflorescencias, se deben probar otras condiciones de cultivo.

La regeneración *in vitro* en *H. psittacorum* cv. ‘Sassy’ y *H. wagneriana* podría lograrse si se desarrolla un método de esterilización de explantes más eficiente, en el que los porcentajes de contaminación puedan reducirse considerablemente.

Para reducir al máximo la contaminación *in vitro* sería conveniente el establecimiento de una etapa previa en la que las plantas donadoras de explantes se cultiven en condiciones de invernadero.

La tasa de germinación de semillas se puede mejorar al solucionar el problema de escarificación, sin olvidar que la propagación de las heliconias por vía sexual puede ser útil sólo si se desea el desarrollo de nuevas variedades por mejoramiento genético.

## VII. LITERATURA CITADA

- Abalo, J. 1999. Heliconias for the ornamental industry. *Acta Hort.* 486: 313-316.
- Aké, A., B. Maust, A. Orozco-Segovia, and C. Oropeza. 2007. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 43: 247–253.
- Altman, A. 2003. From plant tissue culture to biotechnology: Scientific revolutions, abiotic stress tolerance, and forestry. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 39: 75–84.
- Andersson, L. 1998. Heliconiaceae. In: The families and genera of vascular plants. IV. Flowering Plants. Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). (Ed.) K. Kubitzki. Springer, Berlin. Pp. 226-230.
- Arigita, L., R. S. Tames, and A. Gonzalez. 2003. 1-Methylcyclopropene and ethylene as regulators of *in vitro* organogenesis in kiwi explants. *Plant Growth Regul.* 40: 59–64.
- Arinaitwe, G., P. R. Rubaihayo, and M. J. Magambo. 1999. Effects of auxin/cytokinin combinations on shoot proliferation in banana cultivars. *African Crop Science Journal* 7: 605-611.
- Arinaitwe, G., P. R. Rubaihayo, and M. J. Magambo. 2000. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. *Scientia Hort.* 86: 13-21.
- ASERCA. 2006. La floricultura mexicana, el gigante que está despertando. *Claridades Agropecuarias* 54: 3-38.
- Aswath, C., S. M. Deepa, and M. L. Choudhary. 2003. Commercial multiplication of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) through *in vitro* shoot tip culture. *Journal of Ornamental Horticulture* 6:303-309.
- Atehortua, L. 1997. Heliconias: A new challenge for the Colombian floricultural industry. *Biotechnology and Development Monitor* 31: 2021-2025.
- Berry, F., and W. J. Kress. 1991. *Heliconia*: An identification guide. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 335 pp.
- Biddington, N. L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.* 11: 173–178.
- Blakesley, D. 1991. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot proliferation of *Musa* and *Rhododendron*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25: 69-74.
- Campos, C. L., S. Fávoro, and V. L. Esteves. 2001. Thidiazuron as a promoter of multiple shoots in cotton explants (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Scientiarum* 23: 1195-1197.
- Carman, J. G. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 746-753.

- Carneiro, M. F., G. D. da Silva, P. A. Ximenes, I. Fernandes, and J. Divino. 2000. Evaluation of descontamination products, in explants of banana (*Musa* AAB cv. MAÇÃ). *Pesquisa Agropecuária Tropical* 30: 29-35.
- Cassells, A. C. 1993. Problems in tissue culture: culture contamination. In: *Micropropagation: Technology and application*. (Ed.) Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. Kluwer Academic. London. Pp 31-44.
- Castro, C. E. F. 1995. *Helicônia* para exportação: aspectos técnicos da produção. EMBRAPA-SPI, Brasília, DF. 43 p.
- Castro, C. E. F., and T. T. Graziano. 1997. Espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae) no Brasil. *Rev. Bras. Hortic. Orn.* 3: 15-28.
- Chandler, S. F., and C. Lu. 2005. Biotechnology in ornamental horticulture. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 41: 591-601.
- Che, P., S. Lall, and S. H. Howell. 2007. Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta* 226: 1183-1194.
- Chen, W. L., and D. M. Yeh. 2007. Elimination of *in vitro* contamination, shoot multiplication, and *ex vitro* rooting of *Aglaonema*. *Hort Science* 42: 629-632.
- Chiancone, B., A. Tassoni, N. Bagni, and M. A. Germanà. 2006. Effect of polyamines on *in vitro* anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87: 145-153.
- Christianson, M. L., and D. A. Warnick. 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev. Biol.* 95: 288-293.
- Chugh, A., and P. Khurana. 2002. Gene expression during somatic embryogenesis –recent advances. *Current Science* 83: 715-730.
- Couselo, J. L., P. Varela, and M. Rey. 2006. Effect of benzyladenine concentration and double-phase culture system on *in vitro* multiplication of adult albariño plants. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 109-112.
- Criley, R. A. 1988. Propagation of tropical cut flowers: *Strelitzia*, *Alpinia* and *Heliconia*. *Acta Hort.* 226: 509-517.
- Criley, R. A. 1989. Development of *Heliconia* and *Alpinia* in Hawaii: Cultivar selection and culture. *Acta Hort.* 246: 247-258.
- Criley, R. A., and T. K. Broschat. 1992. *Heliconia*: Botany and horticulture of a new floral crop. *Hort. Rev.* 14: 1-55.
- Criley, R. A., J. Y. Uchida, and Z. Fu. 2003. Productivity of flowering in *Heliconia orthotricha* cultivars. *Acta Hort.* 624: 207-212.
- Cronauer, S. S., and A. D. Krikorian. 1984. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. *Ann. Bot.* 53: 321-328.
- De Klerk, G. J., B. Arnholdt-Schmitt, R. Lieberei, and K. H. Neumann. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biol. Plant.* 39: 53-66.

- Debergh, P. C. 1994. The *in vitro* techniques: Their contribution to breeding and multiplication of ornamentals. *Acta Hort.* 353: 122-133.
- Debergh, P. C., and L. J. Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sientia Hort.* 14: 335-345.
- Dhaliwal, H. S., N. S. Ramesar-Fortner, E. C. Yeung, and T. A. Thorpe. 2003. Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis *in vitro*. *Can. J. Bot.* 81: 611–621.
- Domingues, E. T., A. T. Neto, and B. M. Mendes. 1995. Shoot tip culture of *Musa* sp., var. Maçã: Establishment, micropropagation and rooting. *Sci. Agric. Paracicaba* 52: 387-394.
- Endress, R. 1994. *Plant cell biotechnology*. Springer-Verlag. Washington, D.C. 330 p.
- Ezhova, T. A. 2003. Genetic control of totipotency of plant cells in an *in vitro* culture. *Russian Journal of Developmental Biology* 34: 197-204.
- Faria, R. T., and R. D. Illg. 1995. Micropropagation of *Zingiber spectabile* Griff. *Scientia Hort.* 62: 135-137.
- Fehér, A. 2005. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? *In: Somatic Embryogenesis*. (Ed.) A. Mujib & J. Samaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 85-101.
- Fitch, M.M., P. H. Moore, T. C. Leong, L. A. Akashi, A. K. Yeh, S. A. White, A. S. Cruz dela, L. T. Santo, S. A. Ferreira, and L. J. Poland. 2005. Clonally propagated and seed-derived papaya orchards: II. Yield comparison. *HortScience* 40: 1291-1297.
- Gaba, V. P. 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. *In: Plant development and Biotechnology*. (Ed.) R.N. Trigiano and D.J. Gray. CRC Press. Boca Raton, FL. Pp 87-99.
- Gamborg, O. L. 2002. Plant tissue culture. *Biotechnology. Milestones. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38: 84-62.
- Garcia, R., D. Cidade, A. Castellar, A. Lips, C. Magioli, C. Callado, and E. Mansur. 2007. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 90: 181-190.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid, and T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 32: 305–315.
- Gasparotto, L., J. C. Pereira, A. F. Urben, R. E. Hanada, and M. C. Pereira. 2005. *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da sigatoka-negra da bananeira. *Fitopatologia Brasileira* 30: 423-425.
- Gayosso R., S. 2001. Efecto del manejo de factores físicos y químicos sobre la contaminación por bacterias en *Heliconia wagneriana in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 101 pp.
- Geertsens, V. 1989. Effect of photoperiod and temperature on the growth and flower production of *Heliconia psittacorum* ‘Tay’. *Acta Hort.* 252: 117-122.
- George, E. F., and P. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. England, Exgetics. 709 p.

- Goh, C., M. J. Nathan, and P. P. Kumar. 1995. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. *Sci. Horti.* 62: 113-120.
- Gübbük, H., and M. Pekmezci. 2004. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). *Turk J. Agric. For.* 28: 355-361.
- Gübbük, H., and M. Pekmezci. 2006. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.) using thidiazuron and activated charcoal. *Acta Agriculturae Scandinavica Sect. B-Soil and Plant Sci.* 56: 65-69.
- Habiba, U., S. Reza, M. L. Saha, M. R. Khan, and S. Hadiuzzaman. 2002. Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana: identification and prevention. *Plant Tissue Cult.* 12: 117-124.
- Holford, P., and H. J. Newbury. 1992. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. *Plan Cell Rep.* 11:93-96.
- Hoque, M. E., and J. W. Mansfiel. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of *indica* rice genotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 78: 217-223.
- Huetteman, C. A., and J. E. Preece. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 105-119.
- Ibrahim, A. M., C. E. Costa, P. A. Vianna, A. Deyvison, and C. H. Bezerra. 2002. Evaluation of the use of inflorescences of banana plant variety 'Pacovan' (*Musa* spp) as explants source for the culture *in vitro* in the presence of different antioxidant agents. *Ciênc. Agrotec. Lavras.* 26: 1092-1096.
- Ikeda, M., M. Umehara, and H. Kamada. 2006. Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* 23: 153-161.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47: 91-110.
- Jones, M. P., Cao, J., and R. O'Brien. 2007. The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. *Plant Cell Rep.* 26: 1481-1490.
- Josekutty, P.C., S. S. Cornelius, and T. N. Kilafwasru. 2003. Micropropagation of four banana cultivars in Micronesia. *Micronesica* 7: 77-81.
- Kakimoto, T. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 605-627.
- Kalimuthu, K., M. Saravanakumar, and R. Senthilkumar. 2007. *In vitro* micropropagation of *Musa sapientium* L. (Cavendish Dwarf). *African Journal of Biotechnology* 6: 1106-1109.
- Kane, M. E. 2005. Shoot Culture Procedures. In: *Plant development and Biotechnology.* (Ed.) R.N. Trigiano and D.J. Gray. CRC Press. Boca Raton, FL. Pp 145-157.
- Khare, P. B., and S. P. Shukla 2003. *In vitro* shoot regeneration in stolon explant of an ornamental fern, *Nephrolepis biserrata*. *Phytomorphology* 53: 229-233.

- Kim, S. J., E. J. Hahn, K. Y. Paek, and H. N. Murthy. 2003. Application of bioreactor culture for large scale production of chrysanthemum transplants. *Acta Hort.* 625: 187-191.
- Kress, W. J. 1983. Crossability barriers in neotropical *Heliconia*. *Ann. Bot.* 52: 131-147.
- Kress, W. J. 1990. The diversity and distribution of *Heliconia* (Heliconiaceae) in Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 4: 159-167.
- Krikorian, A. D. 1993. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.* (Ed.) William M.R. y Luis A.M. CIAT. Cali, Colombia.
- Krikorian, A. D., H. Irizarry, S. S. Cronauer-Mitra, and E. Rivera. 1993. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa* spp.) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Ann. Bot.* 71: 519-535.
- Krikorian, A., and K. Simola. 1999. Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1983-1973). *Physiol. Plant.* 105: 348-355.
- Kumar, V., M. M. Naidu, and G. A. Ravishankar. 2006. Developments in coffee biotechnology—*in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87: 49-65.
- Lakshmanan, P., R. J. Geijskes, L. Wang, A. Elliott, C. P. Grof, N. Berding, and G. R. Smith. 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Rep.* 25: 1007-1015.
- Lee, S. 2005. Thidiazuron in the improvement of banana micropropagation. *Acta Hort.* 692: 67-74.
- Leifert, C., and A. C. Cassells. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 37: 133-138.
- Leifert, C., and S. Woodward. 1998. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 52: 83-88.
- Leifert, C., and W. M. Waites. 1992. Bacterial growth in plant tissue cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 460-466.
- Lekawatana, S., and R. A. Criley. 1989. Pot culture of *Heliconia stricta* 'Dwarf Jamaican'. *Acta Hort.* 252: 123-128.
- Litz, R. E. 1993. Organogenesis and somatic embryogenesis. *Acta Hort.* 336: 199-205.
- Lu, C. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 29: 92-96.
- Madriz R., Smits B. G. y Noguera R. 1991. Principales hongos patógenos que afectan algunas especies ornamentales del género *Heliconia*. *Agronomía Trop.* 41: 265-274.
- Marulanda, M. L., y V. Isaza L. 2004. Establecimiento *in vitro* de heliconias con fines de producción masiva. *Scientia et Technica*, 26: 193-197.
- Matsubara, S. 1990. Structure-activity relationships of cytokinins. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9: 17-57.

- Meins, F., and A. N. Binns. 1979. Cell determination in plant development. *Bioscience* 29: 221-225.
- Miller, L. R., and T. Murashige. 1976. Tissue culture propagation of tropical foliage plants. *In vitro* 12: 797-813.
- Mohamed-Yasseen, Y. 2001. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 37: 204–205.
- Molina, D. M., M. E. Aponte, H. Cortina, and G. Moreno. 2002. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 117-123.
- Montgomery, R. 1986. Propagation of *Heliconia* from seeds. *Bull. Heliconia Soc. Inter.* 1: 6-7.
- Morel, G. 1960. Producing virus-free *cymbidium*. *American Orchid Society Bulletin* 29: 495-497.
- Mukunthakumar, S., and S. Seeni. 2005. *In vitro* cloning and homestead cultivation of primitive *Musa* cultivars. *Indian Journal of Experimental Biology* 43: 90-95.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-493.
- Murthy, B. N., S. J. Murch, and P. K. Saxena. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 34: 335-346.
- Nathan, M. J., C. Goh, and P. P. Kumar. 1992. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. *HortScience* 27: 450-452.
- Nathan, M. J., P. P. Kumar, and C. Goh. 1993. High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum* L.f. *Plant Science* 90: 63-71.
- Nhut, D. T., T. T. An, N. T. Huong, N. T. Don, N. T. Hai, N. Q. Thien, and N. H. Vu. 2007. Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture. *Scientia Hort.* 111: 146-151.
- Niedz, R. P. and T. J. Evens. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 43: 370-381.
- Nogueira, D. J., S. O. Gomes, R. Innecco, J. L. Almeida, and J. T. Costa. 2004. Evaluation of the apical dominance break and the BAP actions on *in vitro* multiplication of *Heliconia stricta* Huber. *Rev. Ciência Agronômica* 35: 232-237.
- Ogas, J. 1999. Gibberellins. *Current Biology* 10: 24-25.
- Paiva, P. D., R. Paiva, M. Pasqual, and L. V. Paiva. 2004. *In vitro* establishment of strelitzia (*Strelitzia reginae* Banks.). *Ciênc. Agrotec. Lavras* 28: 1031-1037.
- Pedersen, C., and K. Brandt. 1992. A method for disinfection of underground rhizome tips of *Alstroemeria* and *Heliconia*. *Acta Hort.* 325: 499–504.
- Pedraza-Santos, M. E., M. C. López-Peralta, V. González-Hernández, E. M. Engleman-Clark, and P. Sánchez-García. 2006. *In vitro* regeneration of *Alstroemeria* cv. ‘Yellow King’ by direct organogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84: 169-178.

- Phillips, G. C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 40: 342-345.
- Pierik, R. L. M. 1999. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publisher. London. 360 p.
- Pollock, K., D. G. Barfield, and R. Shields. 1983. The Toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Rep.* 2:36-39.
- Poonam, B., A. Nanjappa, and D. J. Midmore. 2005. Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 41: 457-464.
- Prabakaran, G., N. Chezhiyan, and G. J. Rani. 2003. Influence of season and genotype on *in vitro* culture of tamarind (*Tamarindus indica* L.). *South Indian Horticulture* 51: 76-82.
- Prakash, S., R. Elangomathavan, S. Seshadri, K. Kathiravan, and S. Ignacimuthu. 2004. Efficient regeneration of *Curcuma amada* Roxb. Plantlets from rhizome leaf sheath explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 78: 159-165.
- Priyono. 2001. Micropropagation of banana (*Musa paradisiaca*) through cormlet initiation by *in vitro* culture of apical meristem slices. *Jurnal ILMU DASAR* 2: 41-8.
- Proexport Colombia e Instituto Alexander Von Humboldt. 2003. Estudio de heliconias y follajes en el estado de la Florida – Estados Unidos. Bogotá, Colombia. 106 p.
- Promsorn, N. and K. Kanchanapoom. 2006. Conservation and micropropagation of *Musa balbisiana* ‘Kluai Hin’. *BRT Research Reports* 2549: 127-130.
- Radice, S. 2004. Morfogénesis *in vitro*. In: *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal*. (Ed.) Echenique, V., Rubistein, C. y Mroginski, L. INTA. Buenos Aires, Argentina. Pp 27-36.
- Ramage, C. M., and R. R. Williams. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro* Cell. Dev. Biol.—Plant 38: 116–124.
- Rashotte, A. M., H. S. Chae, B. B. Maxwell, and J. J. Kieber. 2005. The interaction of cytokinin with other signals. *Physiol. Plant.* 123: 184-194.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2nd ed. Science Publishers. Inc. Enfield, NH, USA. 388 p.
- Resmi, L., and A. S. Nair. 2007. Plantlet production from the male inflorescence tips of *Musa acuminata* cultivars from South India. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 88: 333-338.
- Reuvenil, M., and D. Evenor. 2007. On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 89: 49-54.
- Ribnicky, D. M., J. D. Cohen, and W. Hu. 2002. An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* 214: 505-509.
- Rodriguez, P. H. 2005. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). *Scientia Agricola* 62: 69-71.

- Rout, G. R., A. Mohapatra, and J. S. Mohan. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24: 531-560.
- SAGARPA. 1998. Norma Oficial Mexicana NOM-007-FITO-1998, Por la que se establecen los requisitos fitosanitarios y especificaciones para la importación de material vegetal propagativo. Secretaría de Agricultura, Recursos Naturales, Pesca y Agricultura. México. 44 p.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 431-449.
- Salazar, E. G., and J. G. Surga. 1988. Methods of disinfection of sugarcane explants cultured *in vitro*. *Caña de Azúcar* 6: 105-112.
- Salvi, N. D., G. Leela, and S. Eapen. 2000. Direct regeneration of shoots from immature inflorescence cultures of turmeric. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 62: 235-238.
- Sandoval, J. A. y E. Müller L. 1992. Influencia del tamaño de explante en la propagación *in vitro* de cuatro cultivares de *Musa*. *Turrialba* 42: 243-248.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT User's Guide. (Release 9.1). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Sebastian, L., and M. M. Mathew. 2004. Micropropagation of Nendran and Poovan varieties of *Musa* through inflorescence tip culture. *Plant Cell Biotech. Mol. Biol.* 5: 141-148.
- Simão D. G. and V. L. Scatena. 2003. Morphological aspects of the propagation in *Heliconia velloziana* L. Emygd. (Zingiberales: Heliconiaceae). *Brazilian archives of Biology and Technology.* 46: 65-72.
- Singh, A. K., V. K. Gupta, K. Tanveer, M. W. Ansari, and R. C. Pant. 2004. Optimization of micropropagation protocol for sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 5: 21-26.
- Skoog F., and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.
- Stasolla, C., and E. C. Yeung. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74: 15-35.
- Stasolla, C., M. S. Lam, and E. C. Yeung. 2006. Exogenous applications of ascorbic acid enhance shoot apical meristem growth and induce shoot organogenesis in germinating white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *International Journal of Plant Sciences* 167: 429-436.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis *in vitro*. *Curr. Opi. Plant Biol.* 2: 61-64.
- Sugiyama, M. 2000. Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. *Int. Rev. Cytol.* 196: 67-84.
- Surga, J. G. and Y. Guevara. 1994. Disinfection trials to control bacterial contamination in *in vitro* culture of banana (*Musa* AAA) apexes. *Fitopatol. Venez.* 7: 14-17.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc. USA. 705 p.
- Taji, A., and P. Lakshmanan. 2006. Emerging themes in *in vitro* culture and their applications to horticulture. *Acta Hort.* 725: 241-253.

- Taji, A., P. P. Kumar, and P. Lakshmanan. 2002. *In vitro* plant breeding. Food Products Press. New York, USA. 167 pp.
- Teixeira, D. S., D. T. Nhut, M. Tanaka and S. Fukai. 2003. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). *Sci. Horti.* 97: 397-410.
- Tétu, T., R. S. Sangwan, and B. S. Sangwan-Norreel. 2003. Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus. *Journal of Experimental Botany* 38: 506-517.
- Thomas, C. and V. M. Jiménez. 2005. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. *In: Somatic Embryogenesis.* (Ed.) A. Mujib & J. Samaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 157-175.
- Thomas, J. C., and F. R. Katterman. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiol.* 81: 681-683.
- Thomas, P. 2004. *In vitro* decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77: 173-179.
- Thorpe, T. A. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.
- Thorpe, T. A., and I. S. Harry. 1997. Application of tissue culture to horticulture. *Acta Hort.* 447: 39-45.
- Tiwari, S., V. Sarathe, and M. Tripathi. 2004. Effect of genotype and culture medium on morphogenesis of linseed (*Linum usitatissimum* L.) immature embryo culture. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 5: 155-160.
- Tomsone, S., D. Gertnere, and D. Novikova. 2004. The influence of thidiazuron on shoot regeneration and proliferation of rhododendrons *in vitro*. *Acta Universitatis Latviensis Biology* 676: 239-242.
- Torres, A. C., F. G. Duval, D. G. Ribeiro, A. F. Barros, and F. A. Aragão. 2005. Effect of sucrose, kinetin, isopentenyl adenine and zeatin on the development of embryos of *Heliconia rostrata in vitro*. *Horticultura Brasileira* 23: 789-792.
- Utino, S., I. Fernandes, C., and J.C. Lázaro. 2001. Explants growth and oxidation of banana cv. Prata (*Musa* spp) *in vitro*. I. Iron, copper, and zinc salts concentrations. *Rev. Bras. Frutic.* 23: 225-229.
- Van Den Houwe, I., and R. Swennen. 2000. Characterization and control of bacterial contaminants in *in vitro* cultures of banana (*Musa* spp.). *Acta Hort.* 530: 69-79.
- Van Standen, J., and N. R. Crouch. 1996. Benzyladenine and derivatives-their significance and interconversion in plants. *Plant Growth Regul.* 19: 153-175.
- Venkatachalam, L., R. V. Sreedhar, and N. Bhagyalakshmi. 2007. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. *Plant Growth Regul.* 51: 193-205.
- von Aderkas, P., R. Rohr, B. Sundberg, M. Gutmann, N. Dumont-BéBoux, and M. Lelu. 2002. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 111-120.

- von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, and L. Filanova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 233-249.
- Wicker, E., L. Grassart, R. Coranson-Beaudu, D. Mian, C. Guilbaud, M. Fegan, and P. Prior. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6790-6801.
- Williams, E. S., and B. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.
- Williams, R. R. 1993. Mineral nutrition *in vitro* – A mechanistic approach. *Aust. J. Bot.* 41: 237-251.
- Wong, W. C. 1986. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): Initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 6: 159-166.
- Yamaguchi, M., H. Kato, S. Yoshida, S. Yamamura, H. Uchimiya, and M. Umeda. 2003. Control of *in vitro* organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *PNAS* 100: 8019-8023.
- Youmbi, E., B. Ella, and K. Tomekpe. 2006. Effect of thidiazuron on *in vitro* proliferation capacities of some banana (*Musa* spp.) cultivars with weak multiplication potential. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 19: 255-259.
- Zaffari, G. R., G. B. Kerbaui, J. E. Kraus, and E. C. Romano. 2000. Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63:187-192.
- Zavaleta-Mancera, H., M. Hernández-Villarreal, J. Cuevas-Sánchez y E. M. Engleman. 2003. Anatomía de la semilla de *Cupania dentate* (Sapindaceae) con énfasis en la semilla madura. *Anales del Inst. Biol. UNAM Serie Bot.* 74: 17-29.
- Zeng, F., X. Zhang, S. Jin, L. Cheng, S. Liang, L. Hu, X. Guo, Y. Nie, and J. Cao. 2007. Chromatin reorganization and endogenous auxin/cytokinin dynamic activity during somatic embryogenesis of cultured cotton cell. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 90: 63-70.
- Zhang, S., and P. G. Lemaux. 2004. Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23: 325-335.
- Zhang, Z. J., W. J. Zhou, H. Z. Li, G. Q. Zhang, K. Subrahmanian, and J. Q. Yu. 2006. Effect of jasmonic acid on *in vitro* explant growth and microtuberization in potato. *Biología Plantarum* 50: 453-457.
- Ziv, M. 1999. Developmental and structural patterns of *in vitro* plants. In: *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures vol. 9.* (Ed.) S. Woong-Young and S. Sant Bhojwani. Kluwer Academic Publishers. London. pp. 235–249.
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 277-285.

## VIII. APÉNDICE

1A. Componentes del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) empleados para la inducción, multiplicación y enraizamiento de brotes de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' *in vitro*.

Macronutrientes (mg L <sup>-1</sup> )		Micronutrientes (mg L <sup>-1</sup> )			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	KI	0.83	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025
KNO <sub>3</sub>	1900	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	15.60	Na <sub>2</sub> EDTA	37.30
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.60	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25	ó EDTA	50.00

2A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de contaminación y supervivencia *in vitro* de yemas laterales de *H. nickeriensis*. Las variables de contaminación y supervivencia se transformaron usando  $\sqrt{Y + 0.5}$ .

Fuente de variación	Contaminación	Supervivencia
Tratamiento	0.47 *	0.47 *
Repetición	0.03 NS	0.03 NS
Error	0.03	0.03
C.V.	17.45	20.48
R <sup>2</sup>	0.54	0.54
Media	1.04	0.88

\*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

3A. Comportamiento de la contaminación *in vitro* en explantes de yemas laterales de *H. nickeriensis* evaluados durante 15 d a partir de la siembra.

Tratamiento (Núm.)	Días después de la siembra <i>in vitro</i> (%)					Contaminación total (%)
	3	6	9	12	15	
1	60.00	80.00	80.00	86.67	100.00	100.00 a
2	20.00	53.33	73.33	80.00	86.67	86.67 ab
3	6.67	60.00	86.67	93.33	93.33	93.33 ab
4	20.00	53.33	73.33	73.33	80.00	80.00 ab
5	20.00	60.00	80.00	80.00	80.00	80.00 ab
6	20.00	46.67	53.33	53.33	53.33	53.33 bc
7	0.00	6.67	20.00	20.00	20.00	20.00 cd
8	0.00	0.00	6.67	6.67	6.67	6.67 d

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=15 repeticiones.

**4A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de contaminación y supervivencia *in vitro* de yemas laterales de *H. collinsiana*, *H. psittacorum* cv. 'Sassy', *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y *H. wagneriana*. Las variables de contaminación y supervivencia se transformaron usando  $\sqrt{Y + 0.5}$ .**

Fuente de variación	Contaminación	Supervivencia
Tratamiento	0.29 *	0.29 *
Repetición	0.06 NS	0.06 NS
Error	0.03	0.03
C.V.	21.57	14.45
R <sup>2</sup>	0.55	0.55
Media	0.86	1.06

**5A. Comportamiento de la contaminación *in vitro* en explantes de yemas laterales de *H. collinsiana*, *H. psittacorum* cv. 'Sassy', *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch' y *H. wagneriana* evaluados durante 15 d a partir de la siembra.**

Tratamiento (Núm.)	Días después de la siembra <i>in vitro</i> (%)					Contaminación total (%)
	3	6	9	12	15	
<i>H. collinsiana</i>	0.00	0.00	6.67	6.67	6.67	6.67 b
cv. Sassy	33.33	40.00	46.67	46.67	46.67	46.67 a
cv. 'Golden Torch'	0.00	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67 b
<i>H. wagneriana</i>	26.67	40.00	53.33	60.00	60.00	60.00 a

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=15 repeticiones.

**6A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de tres tamaños de explante en la tasa de contaminación y supervivencia *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'. Las variables de contaminación y supervivencia se transformaron usando  $\sqrt{Y + 0.5}$ .**

Fuente de variación	Contaminación	Supervivencia
Especie	0.15 NS	0.15 NS
Tamaño explante	9.80 *	9.80 *
Especie*Tamaño explante	0.08 NS	0.08 NS
Error	0.10	0.10
C.V.	60.99	69.70
R <sup>2</sup>	0.60	0.60
Media	0.53	0.46

\*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

7A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de nueve concentraciones de 6-benciladenina (BA) en la inducción de brotes *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'. Las variables de porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) se transformaron usando  $\sqrt{Y + 0.5}$ .

Fuente de variación	B (%)	BE (Núm.)	LB (cm)
Especie	0.13 *	0.96 *	0.08 NS
Concentración de BA	1.51 *	4.18 *	2.44 *
Especie*Concentración de BA	0.10 *	0.51 *	0.17 *
Error	0.02	0.03	0.04
C.V.	15.73	19.15	21.38
R <sup>2</sup>	0.69	0.80	0.64
Media	0.91	1.00	0.96

\*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

**8A. Respuesta organogénica de tres especies de heliconias sometidas a diferentes concentraciones de 6-benciladenina (BA), medida en porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB), durante la inducción de brotes.**

Especie	BA (mg L <sup>-1</sup> )	B (%)	BE (Núm.)	LB (cm)
<i>H. collinsiana</i>	0 (testigo)	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	1.0	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	1.5	50.00 bcde	0.97 fg	0.85 def
	2.0	83.33 abc	1.54 def	1.29 abcde
	2.5	91.67 ab	2.44 bc	1.45 abcd
	3.0	100.00 a	4.26 a	1.87 ab
	3.5	75.00 abcd	1.51 efg	1.71 ab
	4.0	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	4.5	0.00 f	0.00 i	0.00 f
cv. 'Golden Torch'	0 (testigo)	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	1.0	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	1.5	83.33 abc	1.47 efg	1.51 abcd
	2.0	100.00 a	1.84 cde	1.56 abc
	2.5	100.00 a	3.17 ab	1.91 ab
	3.0	58.33 abcde	1.18 efgh	1.40 abcd
	3.5	41.67 cdef	0.89 ghi	1.20 bcde
	4.0	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	4.5	0.00 f	0.00 i	0.00 f
<i>H. nickeriensis</i>	0 (testigo)	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	1.0	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	1.5	16.67 ef	0.67 hi	0.71 ef
	2.0	41.67 cdef	0.89 ghi	0.97 cdef
	2.5	100.00 a	2.32 bcd	2.07 a
	3.0	91.67 ab	1.50 efg	1.98 ab
	3.5	33.33 def	0.81 hi	0.95 cdef
	4.0	0.00 f	0.00 i	0.00 f
	4.5	0.00 f	0.00 i	0.00 f

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=12 repeticiones.

**9A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de cinco concentraciones de 6-benciladenina (BA) en combinación con ácido indol-3-acético (AIA, 0.17 mg L<sup>-1</sup>) en la multiplicación de brotes *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'. Las variables de porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) se transformaron usando  $\sqrt{Y + 0.5}$ .**

Fuente de variación	B (%)	BE (Núm.)	LB (cm)
Especie	0.07 NS	1.10 *	0.21 NS
Concentración de BA	1.47 *	8.10 *	4.51 *
Especie* Concentración de BA	0.04 NS	0.22 *	0.07 NS
Error	0.02	0.05	0.08
C.V.	15.84	17.92	22.77
R <sup>2</sup>	0.58	0.80	0.58
Media	1.03	1.29	1.27

\*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

**10A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de cinco concentraciones de tidiazurón (TDZ) y dos concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA) en el número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) durante la multiplicación de brotes *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'.**

Fuente de variación	BE (Núm.)	LB (cm)
Especie	11.96 *	0.04 *
Concentración de TDZ	6.91 *	4.11 *
Concentración de AIA	10.73 *	0.03 NS
Especie* Concentración de TDZ	0.19 *	0.03 *
Especie* Concentración de AIA	0.19 *	0.01 NS
Concentraciones de TDZ*AIA	0.65 *	0.002 NS
Especie*TDZ*AIA	0.11 *	0.003 NS
Error	0.03	0.01
C.V.	8.27	11.03
R <sup>2</sup>	0.83	0.77
Media	2.36	1.13

\*: Significativo; NS: No significativo; C.V. Coeficiente de variación.

**11A. Respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) en diversas concentraciones de tiazurón (TDZ) y ácido indol-3-acético (AIA) durante la multiplicación de brotes de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'.**

Tratamientos	BE (Núm.)	LB (cm)
<b>Especie</b>		
<i>H. collinsiana</i>	6.57 a	1.34 a
cv. 'Golden Torch'	6.25 b	1.27 b
<i>H. nickeriensis</i>	4.15 c	1.28 ab
<b>Concentración de AIA (mg L<sup>-1</sup>)</b>		
0.00	4.89 b	1.32 a
0.17	6.36 a	1.28 a

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=12 repeticiones.

**12A. Efecto de la interacción entre especie y concentraciones de tiazurón (TDZ) en la respuesta organogénica medida en el número de brotes por explante (BE) y longitud de brote (LB) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones.**

Especie	TDZ (mg L <sup>-1</sup> )	BE (Núm.)	LB (cm)
<i>H. collinsiana</i>	2.5 BA (testigo)	2.10 ghi	1.64 a
	0.24	2.33 ef	1.11 bcd
	0.34	2.58 cd	1.14 bc
	0.44	3.10 a	1.01 de
	0.54	2.61 cd	0.98 e
	0.64	2.60 cd	1.04 cde
cv. 'Golden Torch'	2.5 BA (testigo)	1.91 ij	1.55 a
	0.24	2.28 fg	0.99 de
	0.34	2.52 de	1.17 b
	0.44	2.86 b	1.03 cde
	0.54	2.72 bc	0.99 de
	0.64	2.66 cd	0.98 e
<i>H. nickeriensis</i>	2.5 BA (testigo)	1.64 k	1.64 a
	0.24	1.83 jk	1.04 cde
	0.34	2.09 ghi	1.11 bcd
	0.44	2.36 ef	1.01 de
	0.54	2.22 fgh	1.01 de
	0.64	2.03 hi	0.96 e

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=12 repeticiones.

**13A. Efecto de la interacción entre especie y concentración de ácido indol-3-acético (AIA) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones.**

Especie	AIA (mg L <sup>-1</sup> )	BE (Núm.)
<i>H. collinsiana</i>	0.0	2.36 c
	0.17	2.75 a
cv. 'Golden Torch'	0.0	2.38 c
	0.17	2.61 b
<i>H. nickeriensis</i>	0.0	1.87 e
	0.17	2.19 d

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=12 repeticiones.

**14A. Efecto de la interacción entre concentraciones de tiazurón (TDZ) y de ácido indol-3-acético (AIA) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones.**

TDZ (mg L <sup>-1</sup> )	AIA (mg L <sup>-1</sup> )	BE (Núm.)
2.5 BA (testigo)	0.0	1.88 e
	0.17	2.28 d
0.24	0.0	2.02 e
	0.17	2.28 d
0.34	0.0	2.24 d
	0.17	2.56 c
0.44	0.0	2.49 c
	0.17	3.06 a
0.54	0.0	2.31 d
	0.17	2.72 b
0.64	0.0	2.28 d
	0.17	2.58 c

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=12 repeticiones.

**15A. Efecto de la interacción entre especie, concentraciones de tiazurón (TDZ) y de ácido indol-3-acético (AIA) en la respuesta organogénica medida en número de brotes por explante (BE) en tres especies de heliconias durante la etapa de multiplicación de brotes. n=12 repeticiones.**

Especie	Tratamiento (mg L <sup>-1</sup> )			BE (Núm.)
	TDZ		AIA	
<i>H. collinsiana</i>	2.5 BA (testigo)	+	0.17	4.44 jklmno
	0.24	+	0.0	4.28 klmno
	0.24	+	0.17	6.85 defg
	0.34	+	0.0	5.60 ghijk
	0.34	+	0.17	7.93 bcd
	0.44	+	0.0	7.48 cdef
	0.44	+	0.17	12.06 a
	0.54	+	0.0	5.94 fghi
	0.54	+	0.17	7.88 bcde
	0.64	+	0.0	6.24 efghi
cv. 'Golden Torch'	2.5 BA (testigo)	+	0.17	3.70 nop
	0.24	+	0.0	4.85 ijklmn
	0.24	+	0.17	5.60 ghijk
	0.34	+	0.0	5.77 ghij
	0.34	+	0.17	7.08 cdefg
	0.44	+	0.0	7.09 cdefg
	0.44	+	0.17	9.40 b
	0.54	+	0.0	6.76 defg
	0.54	+	0.17	8.14 bc
	0.64	+	0.0	6.34 defgh
<i>H. nickeriensis</i>	2.5 BA (testigo)	+	0.17	2.74 p
	0.24	+	0.0	3.27 op
	0.24	+	0.17	3.50 op
	0.34	+	0.0	3.86 lmno
	0.34	+	0.17	5.02 hijkl
	0.44	+	0.0	4.35 jklmno
	0.44	+	0.17	7.01 cdefg
	0.54	+	0.0	3.73 mnop
	0.54	+	0.17	6.37 defgh
	0.64	+	0.0	3.41 op
0.64	+	0.17	4.98 hijklm	

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). n=12 repeticiones.

**16A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza del ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’.**

Fuente de variación	R (Núm.)	LR (cm)	AP (cm)
Especie	3.17 *	4.61 *	61.65 *
Auxina	236.95 *	257.20 *	106.64 *
Especie*Auxina	4.96 *	17.77 *	1.70 *
Error	0.17	0.30	0.23
C.V.	6.75	12.19	6.59
R <sup>2</sup>	0.96	0.95	0.93
Media	6.12	4.49	7.36

\*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación. R=Raíces; LR=Longitud de raíces; AP=Altura de planta.

**17A. Efecto del ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) sobre el número de raíces (R), longitud de raíces (LR) y altura de plántulas (AP) de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. ‘Golden Torch’ propagadas *in vitro*.**

Especie	Auxina (mg L <sup>-1</sup> )	R (Núm.)	LR (cm)	AP (cm)
<i>H. collinsiana</i>	MS (testigo)	5.17 d	2.90 e	6.23 f
	0.18 ANA	9.08 b	6.37 c	9.15 b
	0.20 AIB	3.92 f	3.03 e	5.39 h
cv. ‘Golden Torch’	MS (testigo)	5.17 d	2.02 f	5.93 fg
	0.18 ANA	8.17 c	7.27 b	7.81 d
	0.20 AIB	4.25 ef	5.10 d	5.24 h
<i>H. nickeriensis</i>	MS (testigo)	4.67 de	2.10 f	8.51 c
	0.18 ANA	9.92 a	8.82 a	10.85 a
	0.20 AIB	4.75 de	2.84 e	7.14 e

Medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes (p≤0.05). n=12 repeticiones.