



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL (IBE)
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL



ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA EFICIENTE DE PROPAGACIÓN *IN VITRO*
para *Heliconia caribaea* Lam.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller Ritzi Alejandra Nakoul Garnier como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Biología.
Tutor (a): Dra. Teresa Edith Vargas.

Julio, 2017



ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela de Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado de la bachiller Ritzi Alejandra Nakoul Garnier, C. I. : V - 19.298.886, titulado “Establecimiento de un sistema eficiente de propagación in vitro para Heliconia caribaea Lam.”, nos reunimos hoy, 21 de julio de 2017, en la Sala “Werner Jaffé” del Instituto de Biología Experimental, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, luego de la cual certificamos que este Trabajo Especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.

Prof. Iselen Trujillo

Jurado

Prof. Andrea Menéndez

Jurado

Prof. Teresa Edith Vargas

Tutor

RESUMEN

El género *Heliconia* L., posee alrededor de 250 especies de las cuales el 80% se cultiva por su valor ornamental. Venezuela es el sexto país con mayor diversidad de heliconias, de las cuales dos especies se encuentran en estado vulnerable y peligro crítico de extinción debido a la extracción para la venta o destrucción de su hábitat para desarrollo de actividades agrícolas. El adecuado manejo del cultivo de esta planta permite integrar herramientas de conservación con el desarrollo económico, sin embargo, sus rizomas son susceptibles al ataque de numerosos patógenos y sus semillas pueden tardar hasta 3 años en germinar.

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un sistema eficiente de propagación *in vitro* para *Heliconia caribaea* Lam., utilizando yemas laterales y semillas como explantes. Los métodos de desinfección utilizados permitieron obtener de 15 a 30% de explantes libres de contaminación. En la etapa de establecimiento no hubo diferencias significativas en la germinación ni en la formación de brotes nuevos; entre los tres medios empleados que fueron: a) Medio Murashigue y Skoog (MS) sin hormonas; b) Medio MS + 2mg/L de BAP+ 1 mg/L de AIA; c) Medio MS + 2 mg/L de BAP. En la etapa de multiplicación los medios que resultaron más eficientes fueron: H4 (MS + 5 mg/L BA + 3 mg/L ANA) y H6 (MS + 3 mg/l de BA + 1 mg/L de ANA); en el primero 93,33% de las plantas formaron brotes (2,37 brotes/planta en promedio) y en el segundo un 60% de plantas generaron en promedio 1,77 brotes por planta. Las plantas obtenidas en la etapa anterior se aclimataron satisfactoriamente durante 15 días en un sustrato compuesto por turba negra y arena en proporción 1:1, y hubo mayor sobrevivencia y mayor altura en plantas provenientes de los medios H4 y H6.

Palabras claves: *Heliconia caribaea*, cultivo *in vitro*, organogénesis, germinación

ÍNDICE DE CONTENIDO.

	Pág.
I. ÍNDICE DE TABLAS.....	i
II. ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	ii
III. ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
IV. ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1. Taxonomía.....	4
3.2. Origen.....	4
3.3. Morfología.....	4
3.4. Importancia.....	5
3.4.1. Importancia Económica.....	5
3.4.2. Importancia ecológica.....	6
3.4.3. Importancia medicinal.....	6
3.5. Cultivo tradicional de heliconias.....	7
3.6. Cultivo in vitro de heliconias.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13

4.1. Material vegetal.....	13
4.2. Selección del explante.....	13
4.3. Desinfección del explante.....	13
4.4. Medios de cultivo.....	14
4.4.1 Establecimiento.....	15
4.4.2 Multiplicación.....	15
4.5. Condiciones del cultivo.....	15
4.6. Aclimatación.....	16
4.7. Observaciones generales y periódicas.....	16
4.8. Estudios anatómicos y morfológicos.....	17
4.9. Análisis estadístico.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Establecimiento del cultivo in vitro.....	18
5.1.1. Contaminación, oxidación y supervivencia.....	18
5.1.2. Tiempo de respuesta.....	19
5.1.3. Parámetros morfológicos.....	19
5.2. Etapa de multiplicación.....	23
5.3. Estudio morfológico e histológico.....	26
5.4. Etapa de aclimatación.....	28
6. DISCUSIÓN.....	32
6.1. Etapa de Establecimiento.....	32

6.1.1. Desinfección.....	32
6.1.2. Inducción en semillas: germinación.....	33
6.1.3. Inducción en yemas.....	35
6.2. Etapa de Multiplicación.....	36
6.3. Etapa de aclimatación.....	38
7. CONCLUSIONES.....	40
8. RECOMENDACIONES.....	42
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

I. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los medios de inducción de la propagación in vitro de *H. caribaea* Lam.pág. 16

Tabla 2. Composición de los medios de multiplicación in vitro para *H. caribaea* Lam.pág. 16

Tabla 3. Leyenda de características cuantitativas evaluadas en las diferentes etapas del cultivo *in vitro*.....pág. 17

II. ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentajes: de contaminación (HC), de plantas que presentaron oxidación (HO) y supervivencia (HS), de yemas y semillas de *Heliconia caribaea* Lam., cultivadas en medios H1, H2 y H3, a dos meses y medio de la siembra..... pág.19

Gráfico 2. Promedio de: raíces/explante, hojas/explante, brotes/explante (solo en yemas); en plántulas obtenidas a partir de semillas y yemas laterales de *H. caribaea* Lam., en medios H1, H2 y H3 a los dos meses y medio de cultivo..... pág.21

Gráfico 3. Parámetros cuantitativos en plantas obtenidas de semillas y yemas a dos meses y medio de cultivo en medio H1, H2 y H3: Altura promedio de plantas (HA), longitud promedio de raíces (HLR), longitud promedio de hojas (HLH)..... pág.22

Gráfico 4. Porcentaje de plantas que forman brote (HB) y de plantas que forman raíces (HPR) a partir de yemas, a dos meses y medio del cultivo en medios H1, H2 y H3..... pág.22

Gráfico 1. Porcentaje de germinación (HG) y de plantas que forman raíces (HPR) en medios H1, H2 y H3 a dos meses y medio de la siembra..... pág.23

Gráfico 6. Porcentajes de: plantas que forman brotes (HB), plantas que forman raíces (HPR), contaminación (HC), supervivencia (HS), y plantas que presentan oxidación (HO), a los 3 meses del cultivo..... pág.25

Gráfico 7. Promedio de brotes por explante (HBE), promedio de raíces por planta (HR) y promedio de hojas por planta, en medios H1, H4, H5, H6 y H7, a tres meses de cultivo.....pág.26

Gráfico 8. Altura promedio de plantas (HA), longitud promedio de raíces (HLR) y longitud promedio de hojas (HLH) de plantas en medios H1, H4, H5, H6 y H7, a tres meses de iniciado el cultivo..... pág.26

Gráfico 9. Porcentaje de supervivencia de plantas provenientes de medios de multiplicación, a un mes de iniciada la etapa de aclimatación, en sustrato compuesto por turba negra y arena en proporción 1:1..... pág.30

Gráfico 10. Número promedio de hojas por planta a un mes de iniciada la etapa de aclimatación, en plantas provenientes de medios de multiplicación..... pág.30

Gráfico 11. Altura promedio (HA), longitud promedio de hojas (HLH) y ancho promedio de hojas (HAH), de las plantas a un mes de iniciado el proceso de aclimatación..... pág.31

III. ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapa de inducción a los 2 meses y medio de cultivo: a) Planta proveniente de semilla en medio H2. b) Yema lateral oxidada con brote axilar y plantas en medio H1..... pág.23
- Figura 2.** Etapa de multiplicación a los 3 meses de cultivo: a) Macolla en medio H1. b) en medio H4. c) en medio H5. d) en medio H6. e) en medio H7..... pág.27
- Figura 3.** Múltiples brotes (macolla) proveniente de medio H6 a 3 meses de iniciada la etapa de multiplicación..... pág.28
- Figura 4.** Corte transversal de macolla proveniente de medio H6..... pág.28
- Figura 5.** Corte longitudinal de macolla proveniente de medio H5..... pág.29
- Figura 6.** Plantas provenientes de la etapa de multiplicación, antes de ser trasladadas a condiciones de aclimatación: a) Planta proveniente de medio H1, b) de medio H4, c) de medio H5, d) de medio H6, e) de medio H7..... pág.31
- Figura 7.** Plantas con 2 semanas en condiciones de aclimatación..... pág.32

IV. ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4 D.....	Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético
ANA.....	Ácido naftaleno- acético
AIA.....	Ácido indol-acético
BA.....	6-Bencil-adenina
° C.....	Grados centígrados
cm.....	Centímetros
g/L.....	Gramos sobre litro
HCl.....	Ácido clorhídrico
KOH.....	Hidróxido de potasio
L.....	Litros
m.....	Metros
mg/L.....	Miligramos sobre litro
mm.....	Milímetros
MS.....	Medio Murashige y Skoog (1962)
NaOH.....	Hidróxido de sodio

1. INTRODUCCIÓN

El género *Heliconia* L. es el único representante de la familia Heliconiaceae, y está constituido por aproximadamente 250 especies. Son plantas herbáceas, perennes, de origen tropical, que presentan inflorescencias erguidas o péndulas formadas por brácteas en forma de quilla y de colores muy vistosos que con un buen manejo post-cosecha pueden llegar a durar hasta 30 días como flor de corte, lo que les confiere un importante valor ornamental a nivel internacional (Berry y Kress, 1991; Jerez, 2007).

Estas plantas también son utilizadas por la producción de metabolitos secundarios. Se ha demostrado que en algunas especies la decocción de rizomas tienen propiedades antihemolíticas, antihemorrágicas, antiedematizantes y neutralizantes del veneno de serpientes (Alarcón y col., 2011).

Las hojas de especies como *H. caribaea* Lam., y *H. bihai* L. se utilizan como envoltorio para preservar alimentos, debido a la presencia de componentes de calcio. En paisajismo y restauración ecológica son utilizadas para estabilizar terrenos y disminuir los movimientos de tierra en suelos erosionados, debido a su forma de reproducción a través de los rizomas. (Jerez, 2007; Sosa, 2013).

El cultivo convencional de heliconias se realiza por la siembra de yemas vegetativas del rizoma y en menor medida por medio de semillas. La principal desventaja de la siembra por yemas es la gran cantidad de patógenos que albergan naturalmente y que son fácilmente diseminados entre cultivares. Entre los patógenos de mayor incidencia se encuentran: *Fusarium sp.*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizoctonia sp.*, y *Erwinia sp.* Por otra parte, el cultivo por medio de semillas es poco utilizado por el largo tiempo de germinación, el cual puede comprender de cuatro meses a un año o más, debido al endocarpo leñoso que protege al embrión (Sosa y col. 2009).

Debido a la gran importancia económica que reviste el cultivo de heliconias en las últimas décadas, se han venido implementando técnicas de cultivo *in vitro* que desde sus inicios han sido una alternativa para la solución de los problemas existentes en los cultivos

tradicionales, permitiendo la producción de grandes cantidades de individuos en menor tiempo y con menor porcentaje de contaminación (Iracheta y col., 2013).

La micropropagación y la organogénesis indirecta han sido las técnicas de cultivo *in vitro* más utilizadas y que mejores resultados han arrojado en plantas de diferentes especies de heliconias, produciendo mayor cantidad de vástagos, manteniendo invariable las características de cultivares de mayor relevancia económica, y reduciendo el tiempo de germinación en semillas (Hernández y col., 2013).

En Venezuela, el cultivo de heliconias se ha popularizado, sin embargo, siendo el sexto país con mayor diversidad de estas especies, no se han consolidado técnicas de cultivo *in vitro* que permitan explotar el potencial económico, medicinal y ecológico que poseen estas plantas, incluso algunas especies se han reportado en estado vulnerable y en peligro crítico de extinción; entre ellas, algunas variedades de la especie *Heliconia caribaea* Lam. que además se encuentra entre las diez especies de heliconias de mayor valor comercial a nivel internacional (Libro Rojo de Flora Venezolana, 2003; Ortiz, 2010; Iracheta y col., 2013).

En este sentido el presente trabajo planteó un sistema de propagación masiva de *Heliconia caribaea* Lam., con la finalidad de entregar plantas aclimatadas a pequeños productores del Jarillo (Estado Miranda) y Colonia Tovar (Estado Aragua) y contribuir a la producción nacional.

2. OBJETIVOS

2.1) OBJETIVO GENERAL

- Establecer un sistema eficiente de propagación *in vitro* de *Heliconia caribaea* Lam. a partir de semillas y yemas vegetativas.

2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo adecuado de desinfección para los explantes provenientes de plantas de *Heliconia caribaea* Lam., para obtener material vegetal en condiciones asépticas.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica de semillas y yemas vegetativas, para las diferentes etapas de la propagación *in vitro* de la especie en estudio.
- Determinar a través de estudios histológicos y morfológicos, la naturaleza de los procesos morfogénicos.
- Probar sustratos y condiciones para la aclimatación de plantas de *Heliconia caribaea* Lam. obtenidas por propagación *in vitro*.
- Determinar de forma cuantitativa la producción de plantas *in vitro* a partir de semillas y yemas vegetativas de *Heliconia caribaea* Lam.

3. ANTECEDENTES

3.1) Taxonomía

Heliconia caribaea Lam., pertenece a la División Spermatophyta, Subdivisión Angiosperma, Clase Equisetópsida, Orden Zingiberales, Familia Heliconiaceae, Género *Heliconia* L., Especie *Heliconia caribaea* Lam., Nombres comunes: riqui-riqui, platanillo, guineo silvestre, tenaza de langosta. (APG II, 2003)

3.2) Origen

La familia Heliconiaceae, está formada únicamente por el género *Heliconia* L., para el cual se han reportado aproximadamente 250 especies que tienen su origen en el neotrópico. Se distribuyen principalmente en Centro América, Sur América, el Caribe y un pequeño número de especies en las islas del pacífico sur-este. (Berry y Kress, 1991)

3.3) Morfología

Heliconia caribaea Lam., es una planta herbácea, perenne, de hábito musoide, que puede llegar a medir entre 1 y 3 metros de alto, con un tallo verdadero subterráneo de ramificación simpódica, y con raíces fibrosas, numerosas, fasciculadas, más o menos profundas. Pseudotallo rígido, robusto, erecto, glabro, formado por la superposición de los pecíolos de las hojas (Andersson, 1998).

Las hojas dispuestas de manera alterna dística son simples, pecioladas, de lámina oblonga, glabra, ápice acuminado, de redondeado a agudo en la base, verde en ambos lados, de hasta aproximadamente 1 m de largo y 30 cm de ancho, de margen entero, nerviación pinnado - paralela. (Betancur, 2005 citado en Londoño, 2014; Jerez, 2007).

Inflorescencia terminal, erguida, formada por aprox. de 9 a 14 brácteas en forma de quilla, poco profundas de 2,5 - 4 cm de ancho y aprox. 13 cm de largo, separadas entre sí, a veces superpuestas en la base, suculentas, glabras, de color naranja rojizo y a menudo los márgenes color verde (Berry y Kress, 1991)

Flores hermafroditas, zigomorfas, dispuestas en cincino; tépalos dispuestos en dos series, los exteriores desiguales, siendo el posterior mayor y los dos laterales iguales, angostos, libres o más comúnmente connados con los tres tépalos internos, forman un conjunto cimbiforme penta dentado (Betancur, 2005 citado en Londoño, 2014).

Posee un androceo formado por cinco estambres funcionales de anteras lineares, basifijas, bitecas, de apertura longitudinal, el sexto es un estaminodio, adnato al tépalo impar posterior; y el gineceo está formado por un ovario ínfero, tricarpelar, trilocular con lóculos uniovulados; estilo filiforme, delgado, ensanchado en la parte superior. Fruto formado por 2 a 3 mericarpos carnosos uniseminados, generalmente azules. Semilla con cubierta y opérculo opuesto a la radícula, sin arilo; embrión recto, endosperma y perisperma copioso. (Berry y Kress, 1991; Jerez, 2007)

3.4) Importancia.

3.4.1) Importancia Económica.

La comercialización de plantas ornamentales representa una importante fuente de ingresos para muchos países. En las últimas décadas, la demanda de heliconias como flor de corte, como plantas de maceta o para el ornato de parques y plazas, ha aumentado debido a sus vistosos colores, la forma de las brácteas (considerada como exótica) y por la durabilidad post-cosecha de la inflorescencia que puede llegar a permanecer alrededor de 30 días sin síntomas de marchitamiento (Díaz, 2006; Sosa, 2013).

El precio en el mercado internacional oscila entre 4 y 8 dólares, dependiendo de la variedad. Los principales países exportadores de heliconias son Costa Rica, Hawái, Puerto Rico, Jamaica y Colombia, este último el que mayor producción ha tenido, entre los años 2000 y 2001, con alrededor de 200 hectáreas cultivadas, donde el ingreso por la exportación de heliconias alcanzó aproximadamente los 440 millones de dólares (Sosa, 2013). Las especies más comerciales son *H. stricta*, *H. wagneriana*, *H. bihai*, *H. caribea*, *H. rostrata* y *H. psittacorum* (Díaz y col., 2002 citado por Londoño, 2014; Pinzón, 2010 citado por Londoño, 2014).

Venezuela es el sexto país con mayor diversidad de Heliconias, lo que indica que posee las condiciones edáficas y climáticas para explotar este cultivo, y sin embargo, durante el año 2006 las exportaciones de Colombia a Venezuela alcanzaron US\$ 2.693, de los cuales cerca de US\$1.833 correspondieron a la clasificación de productos agropecuarios dentro de los cuales incluye el sector ornamental (Aranda y col., 2007), evidenciando el poco impulso que ha tenido el comercio de plantas ornamentales en el país.

Los principales estados productores son Táchira, Barinas, Lara, Yaracuy, Miranda, Aragua y Vargas, constituyendo alrededor de 250 productores. En el año 2012 se creó la empresa mixta Rusa – Venezolana “Orquídea” que tenía en sus objetivos exportar el 20% de la producción de plantas ornamentales del país, entre las cuales destacan las heliconias y otras plantas pertenecientes al orden de los Zingiberales. (Osuna, 2012; <http://www.venezuelaaldia.com/2012/11/venezuela-exporto-52-tipos-de-flores-exoticas-a-rusia/>,2015).

3.4.2) Importancia Ecológica.

Las heliconias tienen adaptaciones para crecer en suelos ácidos, gracias a esto se han reportado como pioneras en procesos de resiliencia, ayudando en la restauración del suelo y regeneración natural de la vegetación. En virtud de su reproducción asexual, que genera gran cantidad de vástagos y sistemas extensos de raíz, es posible la estabilización de ecosistemas tórridos. Por otra parte las brácteas de sus inflorescencias albergan abundancia de insectos y polinizadores como murciélagos y colibríes; los anfibios e insectos son dependientes de las brácteas de las heliconias para completar su ciclo de vida (Berry y Kress, 1991). Todas estas características permiten que el cultivo comercial de heliconias se pueda integrar perfectamente con programas de conservación de la biodiversidad y manejo agroecológico.

3.4.3) Importancia medicinal.

En zonas rurales de varios países, principalmente en Ecuador y Colombia el rizoma del “platanillo rojo” que engloba varias especies de heliconias, ha sido utilizado para

contrarrestar los efectos negativos de las mordeduras de serpientes del género *Bothrops* sp. Se ha reportado en la medicina tradicional que la decocción de los rizomas, o la aplicación directa de los mismos en la piel afectada tiene propiedades antiedematizantes, antihemorrágicos, antiinflamatorias y neutralizantes del veneno de *Bothrops asper*; esto se comprobó cuando científicos colombianos extrajeron los metabolitos secundarios de distintas partes de la planta, evidenciando mayor concentración de estos en el rizoma además de comprobar su eficacia contra el veneno de las serpientes (Alarcón y col., 2011).

3.5) Cultivo tradicional de las heliconias

Las heliconias se propagan principalmente de manera vegetativa por rizomas y en menor medida por la germinación de semillas, debido a que el fruto tarda de 2 a 3 meses en madurar y la germinación puede tardar de 4 meses a más de un año. En cualquiera de los casos varios autores (Rosales y col., 2003; Jerez, 2007; Sosa, 2013) señalan que los requerimientos del cultivo de heliconias son los siguientes:

- Temperatura: su crecimiento óptimo se da entre los 20 a 32 °C.
- Precipitación: aunque soportan sequías su crecimiento es favorable con 2500 mm de precipitación anual.
- Suelos: pueden crecer en casi todo tipo de suelos, pero preferiblemente los de buen drenaje y de pH de ácido a neutro (3,5 a 7).
- Humedad Relativa: presentan un máximo crecimiento a humedad relativa igual o mayor de 70%.
- Radiación solar: tienen un adecuado desarrollo en zonas sombreadas (de 20 a 30 % de sombra) en zonas muy expuestas aumentan los requerimientos de riego y fertilización.

3.6) Cultivo *in vitro* de *Heliconia* sp.

Los métodos de cultivo *in vitro* se han utilizado desde finales de los años 50 como complemento para la modificación y mejora de los cultivos tradicionales. Hoy en día es una de las herramientas que mayores aportes ha generado para el conocimiento de las plantas. Estos han podido ser aplicados en funciones ampliamente conocidas en la actualidad como: la propagación masiva, obtención de plantas libres de patógenos, conservación de

germoplasma, producción de metabolitos secundarios y la inducción de mutaciones (Pierik, 1990).

El cultivo *in vitro* en plantas se define como el conjunto de técnicas que permiten inducir el crecimiento y desarrollo de cualquier estructura vegetal, bajo condiciones de asepsia. Estas técnicas se fundamentan principalmente en procurar artificialmente las condiciones físico-químicas óptimas para el correcto desarrollo de dicha estructura, que bien pueden ser células, protoplastos, tejidos u órganos (Pierik, 1990; Rosales y col., 2003).

De acuerdo a Kikorian (1991) las técnicas de cultivo *in vitro* pueden variar dependiendo de factores extrínsecos e intrínsecos de cada especie vegetal, pero siempre se cumplen las siguientes etapas que han sido identificadas, a saber:

- Fase 0: Preparativa; en la cual se hace la selección del explante adecuado para reducir contaminación en etapas posteriores, tomando en cuenta diversos aspectos como la fisiología, la edad y estado fitosanitario de la planta madre.
- Fase I: Establecimiento del cultivo, es lograr instaurar el explante de manera aséptica hasta obtener un cultivo fisiológicamente vigoroso que sirva para el proceso de multiplicación. Fase II: Multiplicación, se basa en obtener la mayor cantidad de propágulos utilizando principalmente reguladores de crecimiento y realizando un manejo adecuado de las técnicas de cultivo.
- Fase III: Enraizamiento, se utilizan métodos que tienen como objetivo principal propiciar el desarrollo en la planta de raíces y otros aspectos morfo-anatómicos que le permitan sobrevivir al cambio de sustrato.
- Fase IV: Aclimatación, también conocido como “hardening” y se caracteriza por exponer gradualmente a la planta a condiciones de campo.

En plantas del género *Heliconia* el cultivo *in vitro* se ha venido utilizando para anular las principales desventajas que presenta el cultivo tradicional, las cuales son: la acumulación y diseminación de agentes patógenos presentes en los rizomas, causantes de graves enfermedades transmisibles entre cultivares en la reproducción vegetativa, y la

recalcitrancia que presentan las semillas para germinar debido a su morfología (Iracheta y col., 2013; Sosa, 2013).

Los primeros trabajos fueron realizados por Nathan y col. (1992), utilizando yemas axilares del rizoma de *H. psittacorum* lograron la regeneración de manera indirecta de la planta y observaron mayor producción de vástagos que con las plantas cultivadas de forma convencional. De los diferentes tipos de medio que usaron obtuvieron mejores resultados con medio MS modificado con 40 μ M BA, 150 ml/L de agua de coco, 30 g/L de sacarosa y como medio gelificante 2 g/L de Gelrite, con un 64% de explantes establecidos exitosamente. Para la fase de multiplicación utilizaron medio MS modificado con 10 μ M BA, sin agua de coco e igualmente con 30 g/L de sacarosa y 2 g/L de Gelrite como gelificante; y el 53% de los explantes se desarrolló adecuadamente. Como medio de enraizamiento usaron medio MS sin ningún tipo de modificación, obteniendo formación de raíces en el 92% de los brotes sembrados.

Torres y col. (2005), evaluaron el efecto de la sacarosa y de algunos reguladores de crecimiento del grupo de las citoquininas (cinetina, isopentil adenina y zeatina) en embriones de *H. rostrata*. Evidenciaron el papel fundamental de la sacarosa para el desarrollo del embrión. En medios sin adición de sacarosa los embriones murieron. En concentraciones del 1 a 3% (p/v) se registró un 80% de germinación, mientras que por encima de estos valores la germinación fue inhibida. La adición de citoquininas a diferentes concentraciones no mostró cambios significativos en el desarrollo del embrión.

Viegas (2005), empleando yemas vegetativas de *Heliconia rauliniana*, evaluó diferentes protocolos de desinfección durante el establecimiento de los explantes, al añadir cantidades distintas de los antibióticos Cefotaxima, Chloramphenicol, y una combinación de ambos en medio MS (1962) suplementado con 3,5 mg/L de BA, 30 g/L de sacarosa, 2 g/L de Phytigel como medio gelificante y vitaminas de Morel (Morel y Wetmore, 1951). La cefotaxima a una concentración de 500 mg/L fue el más eficiente para el control de microorganismos endofíticos, reduciendo la contaminación a un 30% del total de los explantes mientras que en concentraciones más bajas se consiguió siempre 100 % de

contaminación; en particular actúa en contra *Pseudomonas sp.*, y *Klebsiella sp.*, contaminantes característicos en cultivo *in vitro* de heliconias.

Hernández (2008) estableció un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa, para yemas laterales del rizoma de varias especies de heliconias de importancia ornamental en México. La etapa de desinfección resultó eficaz al utilizar 30% de hipoclorito de sodio, Tween al 4% y plata coloidal 3%. Probó varias concentraciones y combinaciones entre BA, AIA y ANA, y obtuvo los mejores resultados en medios adicionados con 2 mg/L de BA, 2,5 mg/L y 3 mg/L de BA; en todos los casos combinados con AIA, el promedio de formación de brotes osciló entre 1 y 4 brotes por explante.

Sosa y col. (2009) empleando meristemas florales establecieron un sistema de micropropagación de *Heliconia standley* Macbride. En la fase de multiplicación, los mejores resultados los obtuvieron con el medio MS suplementado con BA (2.0 mg/L), AIA (0.65 y 1.3 mg/L), reportando un coeficiente de multiplicación de 4,6 brotes/explante. Para el enraizamiento, utilizaron con buenos resultados ácido indolacético (1,3 mg/L) obteniendo en promedio de 5,6 raíces por explante y las plantas entre 3 - 5 cm de altura se aclimataron satisfactoriamente a los 45 días.

Meneses y col. (2009), indujeron de forma eficiente organogénesis directa utilizando el sistema de “sección transversal delgada” en *Heliconia psittacorum*, variedad choconiana; las secciones de 1mm de grosor del pseudotallo se cultivaron en diferentes medios y en el que se observó el mejor resultado fue: medio MS (1962) enriquecido con tiamina 1 mg L⁻¹, piridoxina 1 mg/L, ácido nicotínico 1 mg/L, Mio-inositol 100 mg/L, carbón activado 0,5 g/L, 1 mg/L de 2,4 D; 1mg/L de BA; 1g/L de caseína hidrolizada y como agente gelificante 1 g/L de Gelrite. Las condiciones de cultivo fueron a una temperatura de 25 ± 1 °C y 16 h luz. Obtuvieron en promedio de 15 brotes por explante.

Gómez y col. (2010), evaluaron diferentes métodos de escarificación para facilitar la germinación *in vitro* de cuatro especies de heliconias: *Heliconia bihai* L., *H. collinsiana* Griggs, *H. latispatha* Bentham y *H. psittacorum* L. Las semillas de las plantas fueron

escarificadas usando tres métodos: remoción de testa, remoción de opérculo y extracción del embrión para su posterior germinación *in vitro* en 40 ml del medio MS/2. Las semillas o embriones establecidos en medio de cultivo *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de incubación con ambiente controlado: luz blanca fría con fotoperiodo de 16/8 h, y temperatura de 24 °C. Los tres métodos de escarificación incrementaron el porcentaje de germinación en semillas de *H. collinsiana* y *H. latispatha*. El mayor porcentaje de germinación (90 %) se observó en *H. collinsiana* cuando se extrajeron los embriones.

Alarcón y col. (2011) obtuvieron plántulas de *Heliconia curtispatha* Petersen a partir de semillas y evaluaron su propagación en medios de cultivo Murashige y Skoog, semisólidos y líquidos suplementados con reguladores de crecimiento tipo citoquinina. Se favoreció el desarrollo de la planta al utilizar medio Murashige y Skoog líquido sin adición de reguladores de crecimiento en el cual se obtuvo un promedio de 2 brotes/explante; o al emplear Murashige y Skoog semisólido adicionándole 2 mg/L de 6-Bencilaminopurina, en el cual se registró en promedio 0,93 brotes/explante.

Marulanda y col. (2011), lograron la micropropagación de *Heliconia bihai* cv. Lobster Salmón, a partir de meristemas florales. El medio de inducción en donde obtuvieron mejores resultados fue; MS suplementado con 2 mg/L de BAP, 1 mg/L AIA y 0,1 g/L de cisteína; con poco más del 50% de desarrollo de los explantes.

En la fase de multiplicación obtuvieron 70% de sobrevivencia de los explantes, utilizando un medio suplementado con 6 mg/L de BAP y un subcultivo posterior en medio con 2 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIA, alcanzando una tasa de multiplicación de 3 brotes por explante. Lograron el enraizamiento óptimo de las plántulas con medio suplementado con 1,3 mg/L de AIA y posteriormente la aclimatación en condiciones de vivero en la cual obtuvieron 92% de supervivencia.

Hernández, (2013) en su tesis doctoral estableció un sistema para embriogénesis somática *in vitro* para varias especies de heliconias, así como también propuso un protocolo para la aclimatación de plántulas obtenidas vía organogénesis directa. En este caso no todas las especies respondieron al tratamiento solo se logró formar callo embriogénico en *H.*

collinsiana. El medio en donde se obtuvo mejor respuesta estaba conformado por sales MS con 8,4 micro molar de 2,4D, 30g/L de sacarosa y 0,5 g /L de carbón activado. La maduración de los embriones se obtuvo en un medio adicionado con 2,2 micro molar de BA.

Hernández y col., en el 2013, desarrollaron un protocolo para la inducción y proliferación de callos *in vitro* en *Heliconia collinsiana*. Utilizaron explantes de ápices de raíz, hoja, pecíolo y secciones transversales basales de pseudotallo que se cultivaron en medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con seis diferentes concentraciones de 2,4-D, dicamba y picloram combinadas con carbón activado (0 y 0.5 g/L). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad y a las cuatro, ocho y doce semanas se evaluó el porcentaje de inducción de callos. Únicamente las secciones transversales basales de pseudotallo formaron callos a las doce semanas con un porcentaje de inducción de callo del 100% para el tratamiento con 81.4 μ M de 2,4-D y del 90% en el tratamiento con 135.7 μ M de picloram, combinados con 0.5 g/L de carbón activado.

Londoño (2014) propagó exitosamente plantas de *H. caribaea* Lam., las cuales fueron establecidas a partir de meristemo floral siguiendo el protocolo de propagación reportado por Marulanda y col. (2011) para la propagación *in vitro* de *H. bihai* cv. Lobster Salmon a partir de meristemas florales. Estas plantas se encontraban en medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962), con una concentración hormonal de 2 mg/L de Bencilaminopurina (BA) y 0.5 mg/L de Ácido Indol Acético (AIA) con cambio de medio cada 4 - 5 semanas. La finalidad de esta producción masiva fue para posteriormente utilizar el material vegetal para evaluar la estabilidad genética de esta especie.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1) Material Vegetal.

Se utilizaron plantas de *Heliconia caribaea* Lam., provenientes de los jardines internos del Instituto de Biología Experimental, adscrito a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y del Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela.

4.2) Selección del explante.

Para la propagación *in vitro* se utilizaron semillas y yemas laterales.

4.3) Desinfección de los explantes.

4.3.1) Desinfección de semillas:

Las semillas fueron sometidas al siguiente protocolo de desinfección, posterior a la remoción del opérculo con ayuda de bisturí y lupa estereoscópica:

- 4.3.1.1) Lavado con agua, jabón comercial (Jabón líquido marca “Acción”) y la ayuda de un cepillo y agitación por 15 minutos, luego dos enjuagues con agua destilada.
- 4.3.1.2) Lavado en agitación con solución de fungicida Vitavax300 F (Carboxin 4 g/L) por 20 minutos, luego dos enjuagues con agua destilada.
- 4.3.1.3) Lavado con solución iodada al 4% (“Povidine”) en agitación por 20 minutos, luego dos enjuagues con agua destilada.
- 4.3.1.4) Lavado con cloro comercial (Hipoclorito de sodio al 5%, Marca “MAB”) por 20 minutos y dos enjuagues con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar, agitando ocasionalmente.
- 4.3.1.5) Lavado por 20 minutos con solución de compuesto de amonio cuaternario al 0,53% de marca “BIOKILL” en cámara de flujo laminar, agitando ocasionalmente.

4.3.2) Desinfección de yemas:

Las yemas vegetativas fueron sometidas al siguiente protocolo:

- 4.3.2.1) Eliminación de escamas y hojas externas.
- 4.3.2.2) Lavado con agua, jabón comercial (Jabón líquido/lavaplatos marca “Axió”) y la ayuda de un cepillo, luego dos enjuagues con agua destilada.
- 4.3.2.3) Lavado en agitación con fungicida Vitavax300 F (Carboxin 4 g/L) por 20 minutos, luego dos enjuagues con agua destilada.
- 4.3.2.4) Lavado con solución iodada al 4% (Povidine) en agitación por 20 minutos, luego dos enjuagues con agua destilada.
- 4.3.2.5) Lavado con cloro comercial (Hipoclorito de sodio al 1,2 % Marca MAB) por 20 minutos y dos enjuagues con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar/ de transferencia aséptica, agitando ocasionalmente.
- 4.3.2.6) Se colocó en antibiótico (100 mg/L de Cefotaxima) por 30 minutos, agitando ocasionalmente.

4.4) Medios de cultivo.

Los medios de cultivo que se utilizaron estuvieron constituidos por las sales de Murashige y Skoog, 1962 (MS), suplementado con 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol y 30 g/L de sacarosa. El pH de los medios fue ajustado a 5,8 con NaOH, KOH y/o HCl, se añadieron 8 g/L de agar como componente gelificante, fueron servidos en frascos de vidrio y esterilizados en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C y 1,5 libras de presión.

4.4.1) Establecimiento del cultivo.

Tanto las semillas como las yemas se cultivaron en medio MS con y sin reguladores de crecimiento en medio sólido.

Tabla 1. Composición de los medios de inducción de la propagación *in vitro* de *H. caribaea* Lam.

Medios de Cultivo	Reguladores de crecimiento	
	BA (ml)	AIA (ml)
H1	0	0
H2*	2	1
H3**	2	0

* Medio reportado por Marulanda y col. 2011, para *H. bihai* L. y Londoño (2014) para *H. caribaea* Lam.

**Medio reportado por Nathan y col. 1992, para *H. psittacorum*.

4.4.2) Multiplicación.

Para la fase de multiplicación los brotes obtenidos a partir de las yemas y de las semillas fueron transferidos a los medios detallados en la tabla siguiente:

Tabla 2. Composición de los medios de multiplicación *in vitro* para *H. caribaea* Lam.

Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento	
	BA (ml)	ANA (ml)
H1	0	0
H4***	5	3
H5***	4	2
H6***	3	1
H7***	2	1

*** Medios reportados por Hernández (2008), para diversas especies del género *Heliconia*.

Se realizaron subcultivos en cada medio a las 3 y 8 semanas de iniciada la etapa. A las plántulas se le eliminaron las hojas (verdes y oxidadas) y se cortaron a una longitud de entre 3 y 4 cm aprox.

4.4.3) Condiciones del cultivo.

Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento a $27\pm 1^\circ\text{C}$ en fotoperíodo ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

4.5) Aclimatación.

En la fase de aclimatación las plántulas de heliconias obtenidas por propagación *in vitro*, se trasplantaron a envases plásticos con un sustrato conformado por turba negra y arena, en proporción 1:1, en las condiciones de vivero de alta humedad (70-90% de humedad relativa) y baja luminosidad ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (DFF), durante 30 días.

4.6) Observaciones.

Para cada uno de los cultivos se llevaron a cabo observaciones cualitativas y cuantitativas cada quince días aproximadamente. Como característica cualitativa se evaluó la coloración de los explantes y las características cuantitativas evaluadas fueron las siguientes:

Tabla 3. Leyenda de características cuantitativas evaluadas en las diferentes etapas del cultivo *in vitro*.

Símbolo	Descripción
HB(%)	% de explantes que forman brote
HA(cm)	Altura promedio de plantas (cm)
HBE	Promedio de brotes por explante
HPR(%)	% de plantas que forman raíces
HLR(cm)	Longitud promedio de raíces
HR	Promedio de raíces por planta
HC(%)	% de contaminación
HS(%)	% de supervivencia

HO(%)	% de plantas con oxidación
HH	Promedio de hojas por planta
HG(%)	% de germinación
HLH(cm)	Longitud promedio de hojas
HAH(cm)	Ancho promedio de hojas (Solo en aclimatación)

4.7) Estudios anatómicos y morfológicos

Se realizaron cortes transversales y longitudinales a mano alzada en macollas (múltiples brotes) de plantas provenientes de la etapa de multiplicación y se observaron al microscopio electrónico o con lupa, para determinar el origen del proceso morfogénico.

4.8) Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de una vía en la etapa de multiplicación y de aclimatación; y de dos vías en la etapa de establecimiento del cultivo, posteriormente se aplicó el test de Tukey ($\alpha=0,05$) en los casos que así lo requerían, con la ayuda de EXCEL 2013 de Windows.

5. RESULTADOS

5.1) Establecimiento del cultivo aséptico.

5.1.1) Contaminación, oxidación y supervivencia:

En el gráfico 1 se comparan los resultados obtenidos del % de contaminación (HC), % de oxidación (HO) y % de supervivencia (HS); entre semillas y yemas laterales de *H. caribaea* Lam.; en este se observan los altos niveles de contaminación que presentaron ambos explantes con apenas 4 días de siembra, siendo mayor en yemas que en semillas, y aparentemente fue principalmente de origen fúngico y bacteriano.

La oxidación apareció en todas las yemas (Figura 1-b) a partir de los 3 días de siembra, mientras que las plantas formadas a partir de germinación de semillas permanecieron de color verde (Figura 1-a).

La supervivencia (HS) fue muy baja en ambos casos, pero en comparación, fue mayor en yemas que en semillas, con un total de 15 plantas sobrevivientes tomando en cuenta los 3 medios de cultivo, en contraposición con las 5 plantas obtenidas por semilla. De estas 15 plantas, 6 se obtuvieron en H1, 4 en H2 y 5 en H3; en semillas se obtuvieron 2 plantas tanto en medio sin hormonas H1, como en medio H3, y solo 1 planta en medio H2 (Gráfico 1).

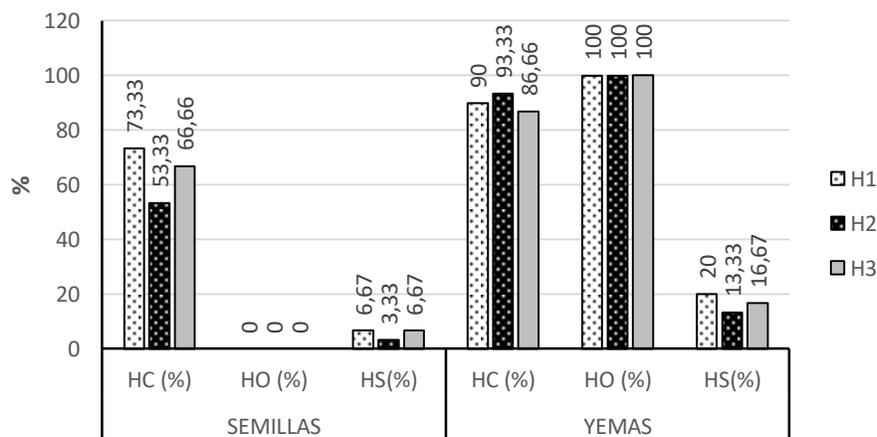


Gráfico 1. Parámetros observados en la etapa de inducción: % de contaminación (HC), % de plantas que presentaron oxidación (HO) y % supervivencia (HS), de yemas y semillas de *Heliconia caribaea* Lam., cultivadas en medios H1, H2 y H3, a dos meses y medio de la siembra.

5.1.2) Tiempo de respuesta:

El tiempo de respuesta a los medios de cultivo varió ampliamente entre ambos explantes. En vista de la baja supervivencia y alta variación de este parámetro, no se pudo determinar el tiempo de respuesta con precisión.

En el caso de las yemas se observó la formación de brotes fue entre los 15 y 60 días luego de la siembra y la formación de raíces entre los 3 y los 30 días de cultivo.

En semillas, el tiempo de formación de la radícula primaria, varió de 2 semanas a 3 meses, y la formación de la planta completa fue de 1 a 3 meses.

5.1.3) Parámetros morfológicos:

Tras aplicar el análisis de varianza de dos vías, y posteriormente un test de Tukey ($\alpha=0,05$) se encontró que el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la mayoría de los parámetros, fue diferente para cada tipo de explante.

En plantas formadas a partir de yemas se registró la mayor altura (HA), la longitud de las hojas (HLH), el número y la longitud de las raíces (HR y HLR); el único parámetro en donde se observó una respuesta similar tanto en yemas como en semillas fue en el promedio del número de hojas por planta (HH), las plantas obtenidas formaron de 3 a 4 hojas en cada planta (Ver gráficos 2 y 3).

En yemas el número promedio de brotes por explante fue mayor (0,73) en el medio sin hormonas, y en los otros dos medios los resultados fueron similares entre sí, cada uno con un promedio de 0,4 (H2) y 0,47 (H3). (Ver gráfico 2).

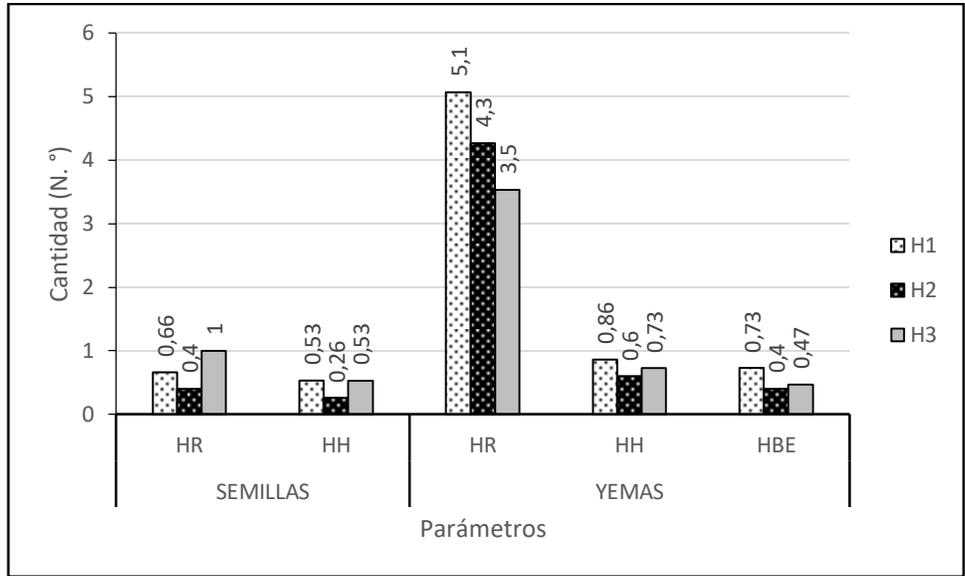


Gráfico 2. Parámetros morfológicos observados en la etapa de inducción: raíces, hojas y brotes por explante; en plantas obtenidas a partir de semillas y yemas laterales de *H. caribaea* Lam., en medios H1, H2 y H3 a los dos meses y medio de cultivo.

Estadísticamente no existieron diferencias significativas al evaluar la respuesta del explante a los diferentes medios, sin embargo, los resultados sugieren que en semillas el medio donde hubo mayor respuesta morfogénica fue H3, y en yemas el medio control H1 fue en donde se apreciaron mayores valores en los parámetros medidos, el medio de cultivo en donde se registraron los menores valores en los parámetros de ambos explantes fue en el medio H2 (Gráficos 2, 3, 4 y 5).

En el gráfico 4 se observa que todos los explantes que formaron brotes, también formaron raíces (Ver figura 1-b), siguiendo la misma tendencia que el resto de los parámetros, los resultados fueron mayores en el medio H1, con un 20% en ambos casos, seguido con H3 en donde se registró un 16,66% y por último el menor valor en medio H2 con un 13,33%.

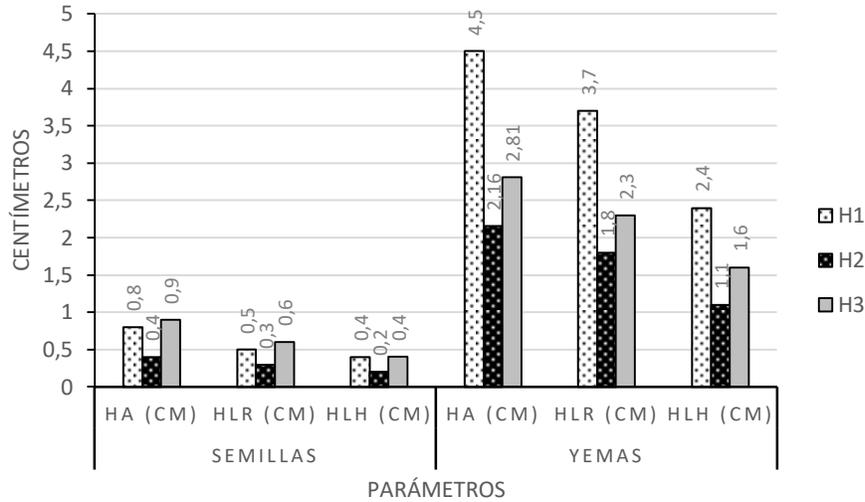


Gráfico 3. Parámetros cuantitativos en plantas obtenidas de semillas y yemas a dos meses y medio de cultivo en medio H1, H2 y H3: Altura promedio de plantas (HA), longitud promedio de raíces (HLR), longitud promedio de hojas (HLH).

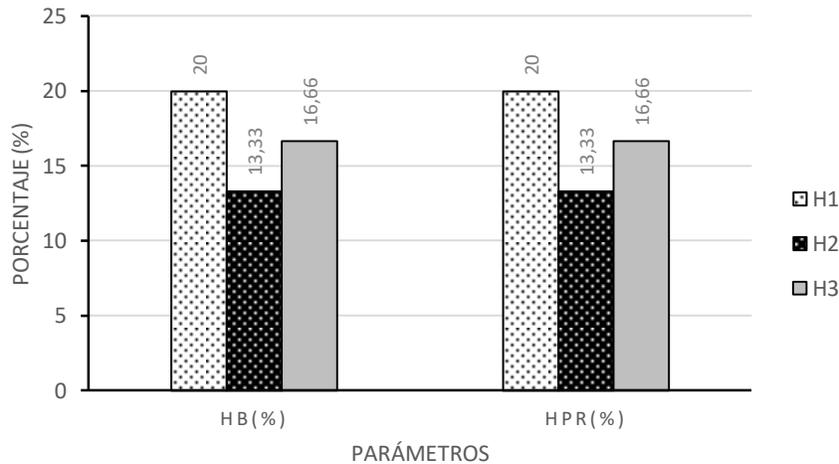


Gráfico 4. Parámetros observados en etapa de inducción: % de yemas que formaron brotes (HB) y de plantas que forman raíces (HPR), a dos meses y medio del cultivo en medios H1, H2 y H3.

Se consideró que ocurrió germinación en todas aquellas semillas en las que se observó el crecimiento de la raíz primaria, mayor a 0,5 cm de largo, sin embargo, también se apreció que en un 26,6% de semillas en medio H1, un 40% en H2 y en un 56,6% en H3, surgieron lo que parecía ser una raíz (< a 0,5 cm), más la mayoría de estas murió por contaminación o su crecimiento quedó estancado incluso luego de ser trasladadas a medio fresco.

En el gráfico 5 se puede observar que se obtuvieron iguales porcentajes de germinación tanto en medio H1 como en H3 (6,66%), y solo 1 semilla germinó en medio H2. De las semillas que germinaron y sobrevivieron, en todos los casos se formó una sola planta por semilla con formación de raíces (Ver figura 1-a).

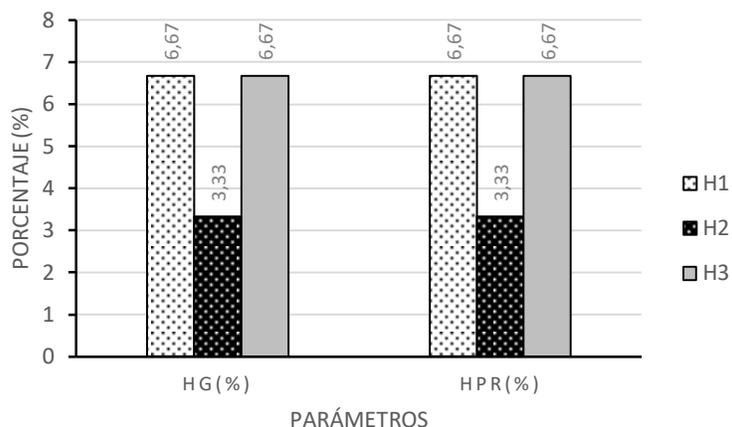


Gráfico 5. Porcentaje de germinación (HG) y de plantas que forman raíces (HPR) en medios H1, H2 y H3 a dos meses y medio de la siembra.

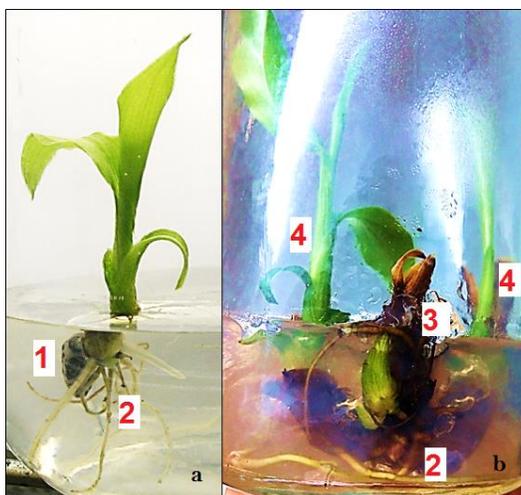


Figura 1. Etapa de inducción a los 2 meses y medio de cultivo: **a)** Planta proveniente de semilla en medio H2. **b)** Plantas y brote axilar provenientes de yema lateral oxidada en medio H1. [1-Semilla. 2-Raíces. 3-Yema lateral oxidada con brote. 4- Plantas obtenidas a partir de la yema.]

5.2) Etapa de multiplicación.

Las plantas obtenidas en la fase anterior, formadas tanto de yemas como de semillas indistintamente, se utilizaron como material *in vitro* de partida para la propagación masiva de *H. caribaea* Lam. En esta etapa se obtuvieron mayores porcentajes de plantas libres de contaminación y de oxidación (Gráfico 6), ésta última característica se evidenció por los colores amarillo y marrón en las hojas de algunas plántulas durante la primera semana de iniciada la etapa, y luego a los tres meses.

En los gráficos 6 y 7, se observa que los medios de cultivo en donde hubo mayor respuesta morfogénica fueron los medios H4 (5ml de BA + 3 ml de ANA) y H6 (3ml de BA y 1ml de ANA), en el primero, 28 plantas de 30 sembradas formaron brote y en el segundo 18 de 30; en estos medios también se obtuvo la mayor supervivencia (HS%) de plantas así como también mayor número de plantas con raíces (HPR%).

En este mismo orden de ideas, no se detectaron diferencias estadísticas entre los medios H4 y H6 con respecto a los parámetros morfológicos: HA, HBE, HR y HLR; se comportan como una muestra de un mismo conjunto de plantas, y en ambos casos fue donde se obtuvieron los mayores valores en estos parámetros (Gráficos 6, 7 y 8).

Al contrario, en los medios H5 y H7, además de la escasa formación de brotes (Ver gráficos 6 y 7) fueron los medios en donde se obtuvieron los valores más bajos de plantas que formaron raíces, de 30 plantas 17 formaron raíces en medio H5 y 19 en el medio H7 (Gráficos 6 y 7), a diferencia de los medios H4, H6 y H1, en donde entre el 70 y 90 % de las plantas formaron raíces.

No hubo diferencias significativas en cuanto al número de brotes entre H1, H5 y H7, en el medio MS sin reguladores de crecimiento se reportó igualmente un bajo número de brotes.

También el medio H5 fue el único en donde se observó una diferencia estadísticamente importante en cuanto a la longitud de las raíces, en la mayoría de los casos fueron de menor tamaño que en el resto de los medios (Figura 2-c).

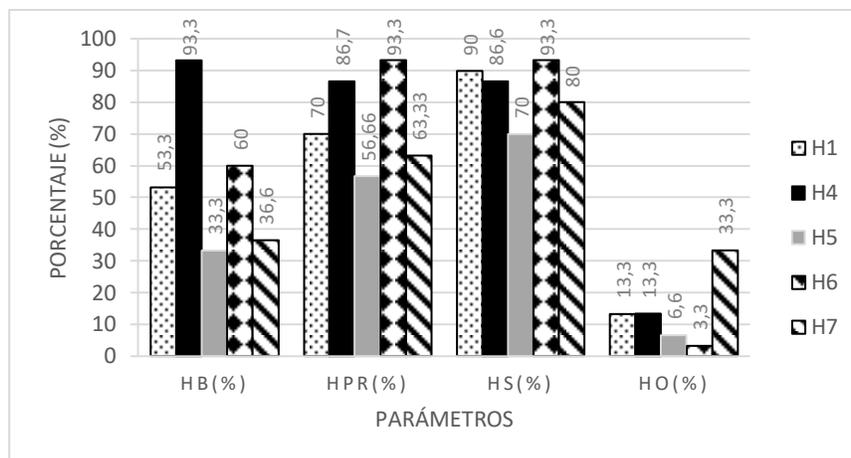


Gráfico 6. Porcentajes de: plantas que forman brotes (HB), plantas que forman raíces (HPR), contaminación (HC), supervivencia (HS), y plantas que presentan oxidación (HO), a los 3 meses del cultivo.

Otra característica que se pudo notar en esta etapa, fue la diferencia en la morfología de las raíces; en el medio H1 y H7 eran de aprox. 1 mm de grosor y escasos pelos radicales, mientras que las formadas en el resto de los medios crecían entremezcladas raíces gruesas o delgadas, las primeras medían entre 2 y 5mm de espesor y presentaban abundantes tricomas, mientras que las segundas se asemejaban a las formadas en H1 y H7.

No hubo diferencias significativas en cuanto a la longitud promedio de las hojas (Gráfico 8) y al número promedio de hojas por planta, independiente del medio en el que se encontraran, las plantas tenían entre 3 a 8 hojas; y la longitud de las estas oscilaba entre 3, las más jóvenes, y 7 cm.

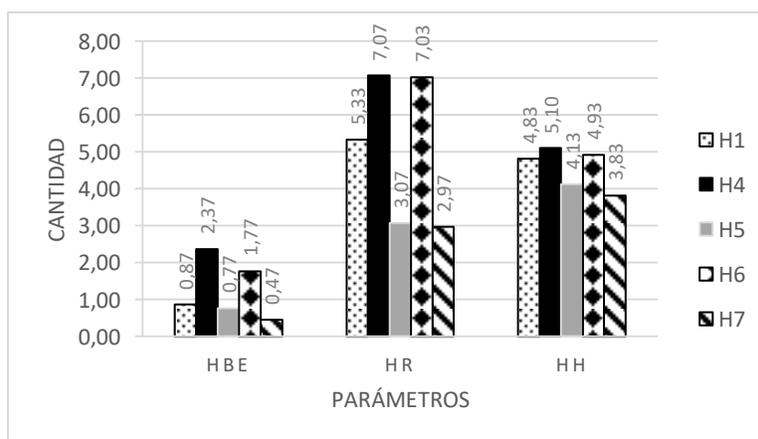


Gráfico 7. Promedio de brotes por explante (HBE), promedio de raíces por planta (HR) y promedio de hojas por planta, en medios H1, H4, H5, H6 y H7, a tres meses de cultivo.

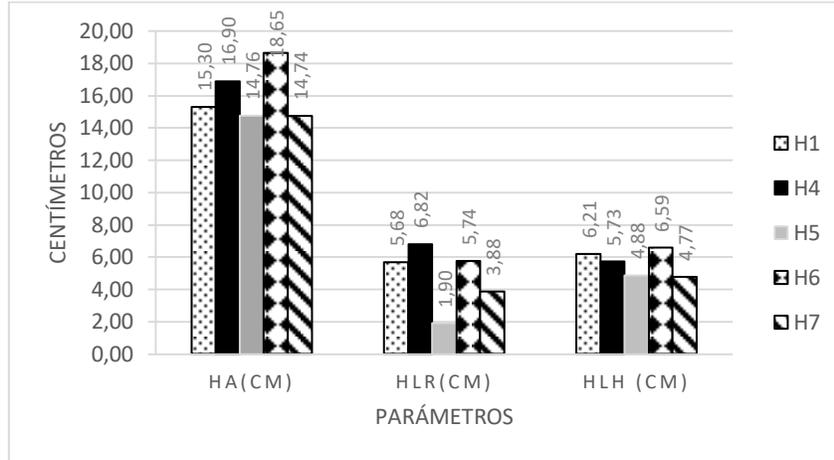


Gráfico 8. Altura promedio de plantas (HA), longitud promedio de raíces (HLR) y longitud promedio de hojas (HLH) de plantas en medios H1, H4, H5, H6 y H7, a tres meses de iniciado el cultivo.

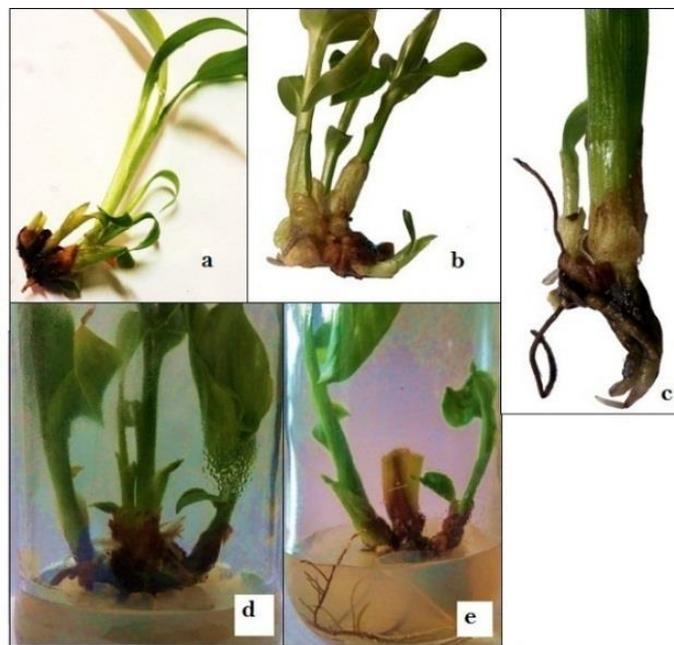


Figura 2. Etapa de multiplicación a los 3 meses de cultivo: a) Macolla en medio H1. b) en medio H4. c) en medio H5. d) en medio H6. e) en medio H7.

5.3) Estudio morfológico e histológico:

El proceso por el cual se regeneraron las plantas de *H. caribaea* Lam., fue la organogénesis directa. Esto se determinó con las observaciones periódicas de los cultivos y mediante cortes transversales y longitudinales de un grupo de múltiples brotes (macolla), formados

en los diferentes medios de cultivo vistos al microscópio y lupa. En la primera semana de cultivo se observó el desarrollo de primordios foliares, menores a 1 cm, que luego se desarrollaron hasta formar yemas axilares, y no se observaron células típicas de callo.

En la figura 5 se observan corte transversal de la base de una macolla de 1 mes de cultivo, en donde se observa células de parénquima, numerosas traqueidas, una médula formada por numerosas traqueidas y células meristemáticas, procambium, catafilos envolviendo haces vasculares, indicando la conexión de estos con las yemas más jóvenes.



Figura 3. Múltiples brotes (macolla) proveniente de medio H6 a 3 meses de iniciada la etapa de multiplicación. Referencias: flechas negras indican primordios foliares y catáfilos envolviendo brote; flecha roja indica raíz adventicia; flecha amarilla indica sección basal de una plántula y brote de 3 semanas de desarrollo.

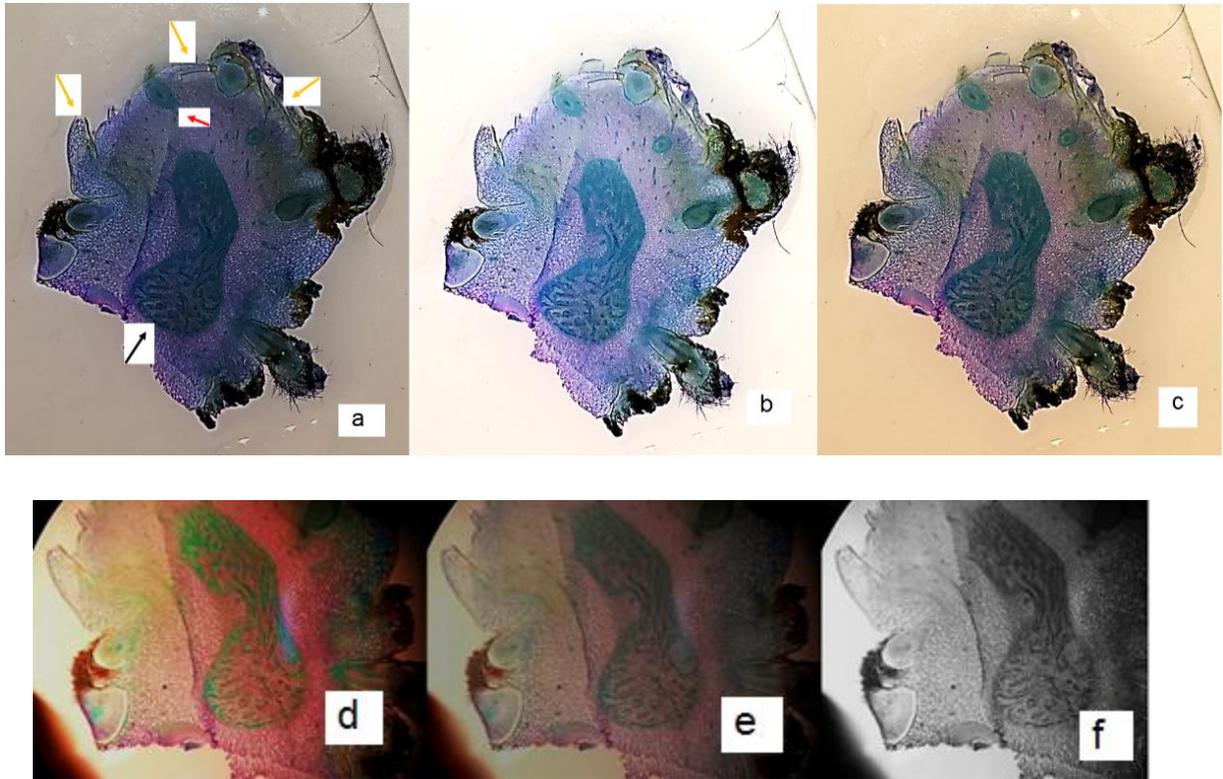


Figura 4. Corte transversal de macolla proveniente de medio H6 vistas en aumento 0,63X, en donde se puede observar haces vasculares, tejido meristemático, catafilos, células de parénquima isodiamétricas. Flecha roja indica raíz, flechas amarillas indican formación de brotes, flecha negra indica médula del bulbo con células meristemáticas y traqueidas.

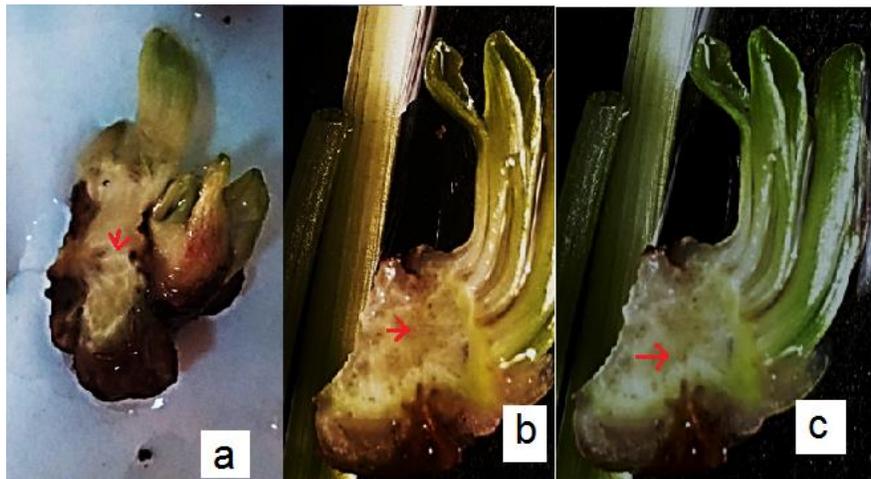


Figura 5. Corte longitudinal de macolla proveniente de medio H5, flechas rojas indican conexión vascular. (A simple vista).

5.4) Etapa de aclimatación:

De 15 plantas provenientes de cada medio de multiplicación (Figura 7) y sembradas en un sustrato conformado por turba negra y arena en proporción 1:1 (Figura 8) se registró la mayor sobrevivencia (HS) en plantas obtenidas de los medios H4 y H6, como se aprecia en el gráfico 9; igualmente en estos medios se registró el mayor número promedio de hojas por plantas, sin embargo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a esta variable al comparar los cinco medios (Gráfico 10).

Con excepción de las plantas provenientes del medio H5, en donde se observó un 46,66 % de sobrevivencia, equivalente a 7 plantas vivas, en el resto de los medios sobrepasaron el 50% de sobrevivencia, algunas plantas se vieron afectadas por la presencia de insectos, lo que en algunos casos provocó la muerte, y en otros solo se observaron pequeños daños en las hojas.

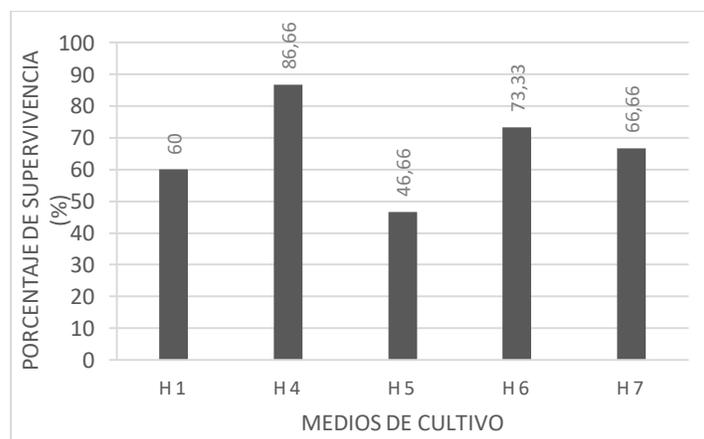


Gráfico 9. Supervivencia de plantas provenientes de medios de multiplicación, a un mes de iniciada la etapa de aclimatación, en sustrato compuesto por turba negra y arena en proporción 1:1.

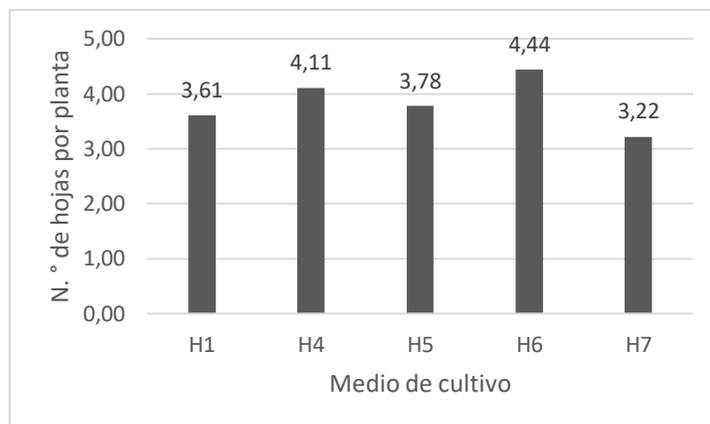


Gráfico 10. Número promedio de hojas por planta a un mes de iniciada la etapa de aclimatación, en plantas provenientes de medios de multiplicación.

La longitud promedio de las hojas fue similar entre los medios H6, H4 y H1, en los cuales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en cambio en H5 y H7 si hubo diferencias, la HLH fue menor en estos últimos (Gráfico 11).

Hubo diferencias estadísticas en la altura (HA) entre el medio H6 y los medios H1, H5 y H7, el promedio de la altura de las plantas en estos tres últimos fue menor, igualmente hubo diferencias entre H4, H5 y H7, pero no con H1 ni con H6. En cuanto al ancho promedio de las hojas solo se encontraron diferencias entre H6, H5 y H7 (Gráfico 11).

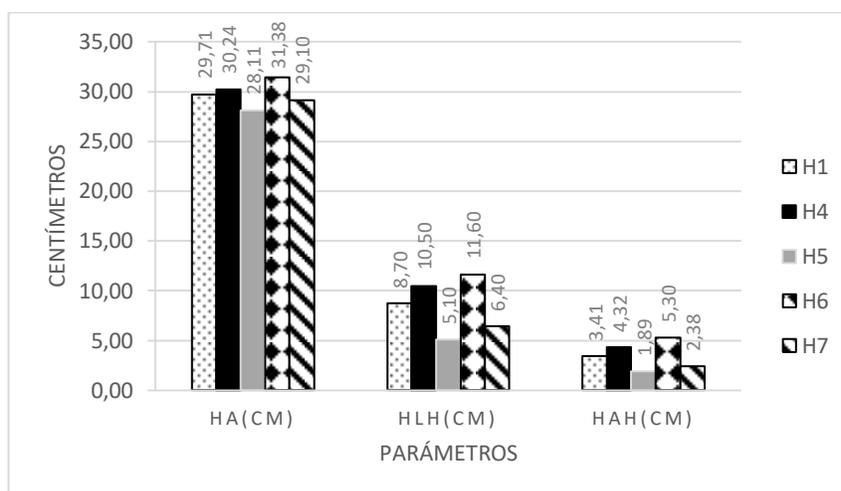


Gráfico 11. Medidas foliares: Altura promedio (HA), longitud promedio de hojas (HLH) y ancho promedio de hojas (HAH), de las plantas a un mes de iniciado el proceso de aclimatación.

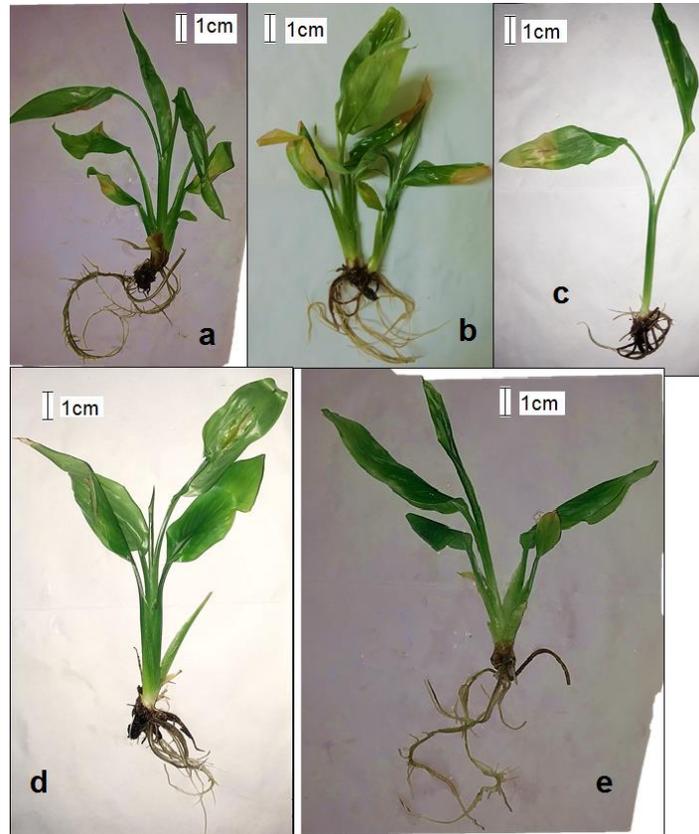


Figura 6. Plantas provenientes de la etapa de multiplicación, antes de ser trasladadas a condiciones de aclimatación: **a)** Planta proveniente de medio H1, **b)** de medio H4, **c)** de medio H5, **d)** de medio H6, **e)** de medio H7.



Figura 7. Plantas con 2 semanas en condiciones de aclimatación.

6. DISCUSIÓN

6.1. Etapa de inducción:

6. 1. 1. Desinfección:

Generalmente en cualquier cultivo *in vitro* que se desee establecer, los explantes provenientes de campo tienen altas posibilidades de morir por contaminación, ya que están en intrínseco contacto con microorganismos patógenos y además como en el caso de muchas heliconias, están expuestos a las condiciones en las que muchos de estos se desarrollan eficientemente, como son la elevada humedad relativa y elevada temperatura. (Berry y Kress, 1991; Jerez, 2007).

En esta investigación se determinó que el método empleado en la etapa de desinfección no fue eficaz, sin embargo el número de explantes que quedaron asépticos resultó apropiado para ser empleados en la etapa de multiplicación. Se ha reportado que con 500 mg/L de Cefotaxima o únicamente con el uso de hipoclorito de sodio entre 3 y 5%, se logran obtener valores de entre 20 y 30% de contaminación en diferentes especies de heliconias como: *H. bihai* y *H. rauliana* (Viegas, 2005), en este trabajo todos los valores sobrepasaron el 40% de contaminación, los autores señalan que la descontaminación es exitosa, cuando los valores no sobrepasan el 30 % de contaminación.

Las yemas laterales de heliconias resultaron ser los explantes con mayores porcentajes de contaminación, esto se debe a que en contacto directo con el suelo, no solo los microorganismos dañinos están en contacto con la planta, sino que también muchos microorganismo benéficos en condiciones de campo que viven en estrecha relación con la planta, tienen consecuencias negativas en condiciones *in vitro* (Pedersen y Brandt, 1992; Villegas y col., 2009; Iracheta y col., 2013).

En condiciones *in vitro*, los antibióticos utilizados muchas veces no penetran a profundidad en la planta y en heliconias es común la presencia de microorganismos endofíticos tales como *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Fusarium* sp., *Klebsiella* sp., entre otros, que compiten de manera exitosa con el explante por el medio abundante en nutrientes y azúcar (Hernández, 2008; Iracheta y col., 2013), además se puede decir que el explante se

encuentra en desventaja al no estar integrado a la planta completa que presenta mecanismos de defensa ante patógenos.

Para disminuir el porcentaje de contaminación existen diversas metodologías como la empleada por Hernández (2008), que disminuyó la contaminación en un 10% , en seis especies diferentes de heliconias colocando las yemas en solución antiséptica pocos minutos de haber sido recolectadas en campo, el tiempo que tarden los explantes luego de su extracción hasta el inicio de la etapa de desinfección afecta en gran medida el éxito de esta última, muchos organismos patógenos tienen una tasa de reproducción alta y en menos de 24 horas pueden proliferar en el material vegetal.

Se observó que en semillas hubo menor contaminación que en yemas, sin embargo el resultado no se consideró completamente satisfactorio, los altos índices de contaminación observados, pudieron deberse a que existen microorganismos de los géneros *Fusarium*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Pythiu*, *Rhizoctonia* y *Trichoderma* que se pueden alojar en el embrión en fases previas de la formación de la cubierta seminal, esto hace difícil que las sustancias antisépticas actúen a profundidad. (Benitez, 2010).

6.1.2. Inducción en semillas: Germinación.

La germinación es una serie de pasos consecutivos que le permiten al embrión desarrollarse y culmina con la salida de la radícula a través del micrópilo. Para que ocurra la germinación cada especie exige condiciones distintas de temperatura, concentración de oxígeno, luz, humedad, entre otras, de lo contrario la semilla puede morir o entrar en estado de latencia. La latencia es un estado en el cual una semilla viable no germina, y puede permanecer de esta manera a lo largo del tiempo. La latencia está controlada por diversos factores externos como luz, temperatura, agua, nutrientes y factores internos como la concentración de hormonas (Taiz y Zeiger, 2006).

Es bien sabido que una de las funciones de las citoquininas es la liberación de la latencia en yemas y semillas de varias especies, y la estimulación de la germinación; sin embargo en la mayoría de los protocolos que se han empleado utilizan solo medio MS sin adición de hormonas ó con sales al 50% obteniendo resultados entre 30 hasta 90% de germinación cuando se siembran únicamente los embriones obtenidos de la escarificación manual previa

de la semilla en varias especies de heliconias tales como: *H. bihai*, *H. collinsiana*, *H. latispatha*, *H. psittacorum*, entre otras. (Hernández, 2008; Gómez y col., 2010).

En este trabajo se esperaba que las concentraciones de BA o en combinación con AIA agilizaran la germinación en comparación con el tratamiento control sin embargo no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, corroborando lo expuesto por otros autores que indican que en el medio MS sin adición de hormonas es eficiente para la germinación. Sin embargo existieron otros impedimentos. Las tres causas principales que pudieron influir en la escasa germinación observada en este trabajo: el impedimento físico, limitaciones fisiológicas y el alto porcentaje de contaminación.

Las semillas de *H. caribaea* Lam., así como todas las especies de heliconias, poseen un pericarpio leñoso, que en condiciones *in vivo* representa una gran ventaja en cuanto a la protección de condiciones desfavorables, sin embargo esta estructura también dificulta la germinación ya que impide la entrada de agua y nutrientes hasta el embrión, pudiendo pasar de 3 meses a 3 años en período de latencia en especies de mediano a alto porte. (Hernández, 2008; Benítez, 2010; Ortiz, 2010).

En este trabajo se extrajo el opérculo, operación que puede ayudar a reducir ampliamente el tiempo de germinación, como lo demuestran Gómez y col. (2010) en su trabajo, en donde resultó ser el segundo método más eficaz para disminuir el tiempo de germinación en semillas de diferentes especies de heliconias; el mejor método reportado es la extracción total del embrión.

Aunque en esta investigación solo 5 semillas en total lograron germinar y desarrollarse como plantas completas se observó que un número mayor de estas (32 semillas en total) mostraron lo que parecía la radícula primaria, pero esta no pasaba de los 0,5 cm de longitud aproximadamente, por lo que podemos pensar que ya superada la barrera mecánica, la cual es señalada en varios estudios como el principal obstáculo en la germinación (Benítez, 2010; Gómez y col., 2010; Ortiz, 2010), es posible que esta se haya visto afectada por factores fisiológicos, como el contenido de nutrientes o la concentración de interna de hormonas vegetales, altas concentraciones de ABA inhiben la germinación, y se requiere de altas concentraciones de citoquininas o giberelinas para liberar la latencia.

La precipitación anual, la humedad relativa y la temperatura son algunos agentes ambientales que afectan la fisiología de las semillas de diferentes especies de heliconias alterando el desarrollo embrionario, por lo que generalmente el grado de madurez entre fruto y semilla está desfasado, es decir, aun cuando el fruto esté totalmente maduro (de color azul) o incluso en proceso de descomposición, las semillas pudieran estar muy poco desarrolladas, esto puede asegurar la germinación futura en condiciones óptimas (Benítez, 2010). Estas causas también pueden explicar la amplia variación en los tiempos de germinación observados, que fueron de 2 semanas a 3 meses.

Otro factor influyente en gran medida de la baja germinación fue la alta contaminación, Benitez (2010) identificó la presencia de los géneros: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Trichoderma*; en semillas de *H. bourgaeana*, *H. latispatha*, *H. collinsiana*; señala que estos hongos inhiben la germinación al utilizar almidones, grasas y proteínas de reserva de la semilla y que estos son los mismos géneros que comúnmente se consiguen en raíces, tallos y hojas.

6.1.3. Inducción en yemas:

En todas las yemas sembradas sobrevivientes a la contaminación o no, se observó oxidación, es posible que esto se deba a la presencia de las enzimas: polifenol oxidasa, tirosinasas y taninos, que son segregadas cuando la planta es cortada como mecanismo de defensa, cuando actúan estas moléculas, se producen fitotóxicos que afecta la viabilidad de los explantes (Hernández y González, 2010); para disminuir este factor se le puede añadir concentraciones de ácido ascórbico o de carbón activado al medio, que han sido reportados como buenos antioxidantes (Meneses y col., 2009; Hernández, 2013).

Algunos autores (Marulanda y col. 2011; Londoño, 2014) señalan el medio MS adicionado con 2 ml de BA + 1 ml de AIA como el más eficiente para inducir brotes en meristemos florales de *H. bihai*, *H. caribaea* y *H. orthotrica* y que no se observó respuesta en medios sin adición de auxinas, sin embargo, en este trabajo no se observaron diferencias significativas entre la formación de brotes entre los tres medios, incluso observamos formación de brote en medio sin adición de hormonas, esto sugiere que esta especie

presenta concentraciones internas de hormonas vegetales adecuadas para que broten las yemas sin la necesidad de hormonas exógenas.

En contraposición, Nathan y col., (1992); Sosa y col., (2009) y Viegas, (2008); indican como mejor medio de inducción el medio donde se ha adicionado 2 mg/L de BA, donde obtuvieron entre 2 y 3 brotes/explante. Es conveniente recalcar que la mayoría de los estudios realizados en heliconias, son con especies de bajo a mediano porte como *H. psittacorum* y muy pocas de mediano a alto porte, y de acuerdo a Iracheta y col., (2013), los requerimientos de nutrientes, y concentraciones hormonales pueden variar no solo entre especie, sino también dentro de un mismo cultivar o variedad.

La alta contaminación y baja supervivencia en yemas, influyen en los resultados observados en cuanto a la brotación, autores reportan que el porcentaje máximo de supervivencia en yemas laterales y otras porciones del rizoma, no superan el 30% debido a la gran cantidad de organismos endofíticos; sin embargo Viegas (2005) reportó 30% de contaminación en yemas laterales usando 500 mg/L de Cefotaxima, mientras que otros autores (Marulanda y col., 2011; y Londoño, 2014) indican que el uso de meristemas florales parece ser una alternativa para obtener plantas con escasos porcentajes de contaminación, al no estar en contacto directo con el suelo, se logran obtener porcentajes de contaminación del 10%.

6.2. Etapa de multiplicación:

Algunos autores (Hernández, 2008; Hernández, 2013) señalan escasa formación de brotes al usar concentraciones por encima de 3 mg/L de BA, y reportan los mejores resultados en la etapa de multiplicación al utilizar entre 2 y 3 mg/L de BA en combinación con concentraciones de ANA que van de 0,2 a 1,5 en varias especies de heliconias como: *H. nickeriensis*, *H. collinsiana*, *H. bihai*, entre otras, indicando además, que es más eficiente la combinación de BA con ANA que la combinación de BA con AIA. En este estudio observamos los mejores resultados con el medio H4 (5 ml de BA + 3 ml de ANA) y H6 (3 ml de BA + 1 ml de ANA), y menor brotación en los medios H5 (4 ml de BA y 2 ml de ANA) y H7 (2 ml de BA + 1 ml de ANA) lo que coincide con lo reportado por Marulanda (2004) y Londoño (2014) para *Heliconia caribaea* Lam. que obtuvieron valores de hasta 3

brotos/explante utilizando concentraciones de 6 mg/L de BA, en otros zingiberales también se han reportado altos valores de brotación utilizando medios adicionados con 5 mg/L de BA, como en el caso de *Musa* sp. (Iracheta y col. 2013).

Se esperaba que los resultados en el medio H5 fueran similares a los observados en H4 o que ocurriera la formación de callo organogénico, como lo reporta Hernández (2008), que utilizó estas mismas concentraciones observando procesos de embriogénesis somática y organogénesis directa e indirecta, sin embargo esto no fue así, es posible a que esto se deba a desbalances internos en la concentración de hormonas, el balance auxina/citoquininas es muy importante en la etapa de multiplicación y particularmente en la organogénesis, cuando este cociente se acerca bastante o es igual a 1, se favorece la formación de callo, cuando el cociente es menor a 1 se favorece la formación de vástagos, y cuando es mayor a 1, hay mayor probabilidad de que crezcan raíces.

También se observó que las plántulas se desarrollaron mediante el proceso de organogénesis directa, la ventaja de este proceso es la poca variación somaclonal, y por ende la conservación de los rasgos fenotípicos; la evidencia de un proceso organogénico directo es la ausencia de formación de callo, el crecimiento de los órganos de *novo* a partir de los tejidos, en este caso células meristemáticas de las yemas del rizoma. Hernández (2013) logró organogénesis directa utilizando concentraciones de BA y ANA similares a las utilizadas en esta investigación.

Con los medios utilizados en esta etapa se observó la formación de raíces en todos los medios, siendo mayor en los medios H4 y H6, esto coincide con lo reportado por Hernández (2008) que indica que la presencia de ANA facilita tanto brotación como enraizamiento. Igualmente se observó una diferencia contrastante en la morfología de las raíces, en los medios H1 y H7, sin presencia de hormonas y con baja concentración de hormonas respectivamente, las raíces formadas eran delgadas de 0,2 a 0,1 mm mientras que las del resto de los medios llegaban a 0,5 mm de espesor además de la abundancia de tricomas, es posible que estas concentraciones de hormonas permitan la creación de raíces funcionales, algo difícil de observar en plantas *in vitro*. Esta diferencia entre la morfología de las raíces no ha sido reportada en cultivo *in vitro* de heliconias, sin embargo la biomasa

de raíces es un carácter de importancia en los cultivos tradicionales de diversas plantas y es sabido que los tricomas facilitan la captación de nutrientes y agua.

Sosa y col. (2009) sugieren que no es necesario una etapa de enraizamiento ya que las raíces formadas en esta etapa no son funcionales y representa un gasto extra, en otras especies de zingiberales se suele usar como medios de enraizamiento los mismo utilizados en la etapa de multiplicación, como es el caso de *Musa* sp., en donde se observó formación de 5 raíces/planta utilizando realizando subcultivos de los medios de multiplicación compuestos por 5 y 6 mg/L BA.

6.3. Etapa de Aclimatación:

La etapa de aclimatación en el cultivo *in vitro* puede resultar bastante difícil, ya que depende de varios factores externos que a veces no pueden ser controlados completamente como: la temperatura, humedad relativa, estado fitosanitario del invernadero y radiación solar. Esta etapa también depende de factores internos a nivel genético, epigenético y del estado de desarrollo anatómico que haya tenido la planta en condiciones *in vitro*. En esta etapa suelen mejorarse la función estomática, la función de las raíces, y en general desarrollar características que permitan sobrevivir condiciones de campo. (Sosa y col., 2009; Hernández, 2008; Hernández, 2013)

Una de las características que puede definirse es el sustrato en el que son sembradas las plantas, en este caso se utilizó una mezcla en iguales proporciones de turba negra y arena, que ha sido reportada como una mezcla óptima para varias plantas en esta última etapa.

Se observó un alto porcentaje de supervivencia en esta etapa, y destacaron las plantas procedentes de los medios H4, H6 y H1 en las que se observaron mayores porcentajes de supervivencia, y mayores valores en los parámetros observados, y aunque no se observaron diferencias significativas al comparar la distinta procedencia de las plantas, se puede decir que aparentemente las concentraciones de hormonas vegetales en la etapa de multiplicación pudiera influir en la etapa de aclimatación.

Se observó la presencia de varios insectos que afectaron la supervivencia de las plantas, principalmente pulgones que absorben la savia de las plantas, en algunos casos causaron la muerte total y en otros solo pequeños daños a las hojas.

7. CONCLUSIONES

- En esta investigación se logró establecer un método de propagación masiva *in vitro* de *H. caribaea* Lam., en dónde se obtuvieron plantas aparentemente libres de patógenos, aunque los protocolos de desinfección de yemas y semillas empleados arrojaron altos porcentajes de contaminación (>50%) en ambos explantes.
- Se logró establecer la germinación (de 3 a 7%) de semillas de *H. caribaea* Lam., tanto en medio H1, sin necesidad de adición de hormonas vegetales, como en los medios con adición de éstas: H2 (MS + 2 ml de BA + 1 ml de AIA) y H3 (MS + 2 ml de BA); y en todos los casos se formó una planta completa.
- Se estableció el cultivo *in vitro* de yemas laterales tanto en medio (H1) MS sin hormonas vegetales como en los medios con hormonas (H2 y H3), y se logran obtener varias plantas por explante (de 0,4 a 0,7 brotes/explante).
- Es posible obtener mayor número de plantas de *H. caribaea* Lam., con el establecimiento *in vitro* de yemas laterales en comparación con el establecimiento de semillas; además el tiempo que necesitan las yemas para desarrollarse es más corto que el necesario en germinar las semillas. La desventaja que presenta el establecimiento de yemas frente al de semillas es la elevada contaminación.
- En la etapa de multiplicación los medios de cultivo H4 (5 mg/L de BA + 3 mg/L de ANA) y H6 (3 mg/L de BA + 1 mg/L de ANA) fueron en los que se obtuvo mayor respuesta morfogénica hacia la formación de brotes y raíces.
- Los estudios histológicos señalan que la formación de brotes múltiples que se apreció en la propagación *in vitro* de *H. caribaea* Lam. ocurrió por un proceso de organogénesis directa.
- En este estudio se apreció una relación aparente de la morfología de raíces asociada a la concentración de hormonas vegetales en el medio, observándose raíces de entre 3 y 5 mm de espesor y con presencia de tricomas en los medios H4, H5 y H6, y raíces de 1 a 2 mm de espesor sin tricomas en H1 y H7.

- El sustrato compuesto por turba negra y arena en proporción 1:1 resultó adecuado en la aclimatación de plantas de la especie *H. caribaea* Lam., es posible que las concentraciones de hormonas vegetales usadas en la fase previa a ésta, influyan en el desarrollo de la planta en vivero.
- Se consiguió establecer un sistema de propagación *in vitro* a partir de yemas laterales y semillas de *Heliconia caribaea* Lam., del cual pueden derivar numerosas investigaciones que permitan profundizar en el conocimiento de esta especie y otras similares en el país y contribuir con el aumento de la producción nacional.

8. RECOMENDACIONES

- La etapa de desinfección se puede mejorar siguiendo las siguientes recomendaciones:
 - a) El uso de plantas cultivadas in vitro y/o en invernadero como fuente de explante.
 - b) Utilización de solución antiséptica o antibiótico en la fase de recolecta en campo, particularmente cuando el traslado a laboratorio puede durar más de 24 horas.
 - c) Aplicación de antibiótico en el medio de cultivo in vitro.
 - d) Aumentar el tiempo de inmersión de los explantes en hipoclorito de sodio.
- Debido al corto tiempo de respuesta ante las hormonas de crecimiento, se recomienda el uso de yemas sobre el de semillas como explante para establecer un sistema de propagación, siempre y cuando se mejore el sistema de esterilización.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón J., Martínez D., Salazar – Ospina A. 2011. Propagación in vitro de *Heliconia curtispatha* P, planta utilizada contra la mordedura de serpientes por algunas comunidades campesinas de la región colombiana del Urabá. *Revista de la facultad de química farmacéutica*. ISSN 0121-4004 / ISSN 2145-2660. Vol. 18 núm. 3, pp. 271 – 278. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Andersson, L. 1998. Heliconiaceae. En Kubitzki, K. (ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants*. 4: 226-230. Springer.
- APG II. The Angiosperm Phylogenetic Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141 (4): 399–436
- Aranda Y., Bello J., y Montoya I. 2007. Fecha de Exploración del mercado de heliconias en el segmento de consumo intermedio en las ciudades de Arauca (Colombia) y Acarigua y Caracas (Venezuela). *Agronomía Colombiana* 25(1), 189-196.
- Benítez, L. 2010. Estudios anatómicos, fisiológicos y nutrimentales de semillas de Heliconias. Tesis de Maestría en Ciencias. Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas. Texcoco, México.
- Berry, F; Kress W. 1991. *Heliconia: an identification guide*. Smithsonian Institution. Washintong. 337p.
- Díaz M., José. 2006. Diagnóstico de la cadena productiva de heliconias y follajes en los departamentos del eje cafetero y Valle del Cauca (Colombia). UNITED NATIONS. Consultor Biocomercio-BTFP
- Gómez-Merino F. C., Vidal-Morales B., Trejo-Téllez L., Molinos da Silva C. 2010. Escarificación y germinación in vitro de semillas de heliconias. www.ujat.mx/publicaciones/uciencia 26(3):293-297.
- Hernández, Eleodoro. 2008. Regeneración in vitro de *Heliconia* spp vía organogénesis directa. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Institución de enseñanza en investigaciones agrícolas.

- Hernández, Eleodoro. 2013. Embriogénesis somática in vitro y aclimatación de plántulas obtenidas por organogénesis directa en *Heliconia* spp. Tesis doctoral. Colegio de postgraduados. Texcoco. México.
- Hernández-Meneses, E., López – Peralta M y Estrada-Luna, A. 2013. Callogenesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS in vitro: establecimiento, inducción y proliferación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.4, Núm.8, p. 1175-1186.
- Iracheta D. L., Olivera de los Santos A., Ortiz C. S., López G. P. 2013. Propagación de heliconias. INIFAP. CIRPAS. Campo Experimental Rosario Izapa. Folleto Técnico Número 30. Tuxtla Chico, Chiapas, México, pp 29.
- Jerez E. 2007. EL CULTIVO DE LAS HELICONIAS. *Cultivos Tropicales*, vol. 28, no. 1, p. 29-35.
- Kikorian, A. 1991. Propagación clonal in vitro. En: Roca, W. y Mroginski, L.A. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Colombia, pp. 95-125
- Libro Rojo de la Flora Venezolana. 2003. Fundación Instituto Botánico de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Londoño, L. 2014. Caracterización de dos genotipos de Heliconias propagadas in vitro y estabilidad genética de *H. caribaea* mediante marcadores moleculares AFLP. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.
- Marulanda-Ángel, M, Isaza V y Londoño, L. (2011) Propagación in vitro de *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón. Rec.: 16.05.11 Acept.: 20.09.11
- Murashige, T and Skoog. 1962. A revised médium for rapad growth and bioassays whith tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- Meneses, A., Rojas, N., y Atehortúa, L. 2009. Regeneración in vitro de *Heliconia psittacorum* variedad choconiana, usando el sistema de sección transversal delgada “Tcls” (Thin layer cells). *UDO Agrícola* 9(3): 547 – 555.
- Nathan , M. J., Goh C. J, and P.P. Kumar. 1992. In Vitro Propagation of *Heliconia psittacorum* by Bud Culture. *HORTSCIENCE* 27(5):450-452.
- Ortiz, Diana. 2010. Germinación de semillas de *Heliconia latispatha* Benth, 1844 en Teocelo, Veracruz. Universidad Veracruzana, Facultad de biología. Xalapa, Mexico.

- Osuna Stephanie. 2012. Expansión del Sector Floricultor en Venezuela. CONAPRI. Disponible en: <http://www.conapri.org/ArticleDetailIV.asp>. [Consulta: 10 de junio de 2015].
- Pedersen, C. and Brandt, K. 1992. A METHOD FOR DISINFECTION OF UNDERGROUND RHIZOME TIPS OF ALSTROEMERIA AND HELICONIA.. Acta Hort. (ISHS) 325:499-504
- Pierik, R.L. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, España.
- Rosales, R; España, E; Sosof, J; Moreno D. 2003. Búsqueda, recolección, preservación y establecimiento de un sistema productivo de cultivares de flores tropicales, de la familia Heliconiaceae, en el sur occidente de Guatemala. Instituto de investigación y desarrollo de sur occidente. Dirección general de investigación UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.
- Sosa – Rodríguez, Flora M. 2013. Revisión bibliográfica: CULTIVO DEL GÉNERO HELICONIA. Cultivos Tropicales, vol. 34, no. 1, p. 24-32.
- Sosa-Rodríguez F. M, Ortiz R., Hernández, R, Armas P., Guillen D. 2009. Propagación in vitro de Heliconia standley Macbride en Cuba. Revista Chapingo. Serie Horticultura, vol. 15, núm. 2, 2009, pp. 17-23, Universidad Autónoma Chapingo .México.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología Vegetal. Publicacions de la Universitat Jaume I de Castellón. Traducción de la 3ª edición en inglés de 2002.
- Torres, A.C.; Duval, F.G.; Ribeiro, D.G.; Barros, A.F.F.; Aragao, F.A.D. 2005. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de Heliconia rostrata in vitro. Horticultura Brasileira, Brasília, v.23, n.3, p.789-792.
- Venezuela al día. <http://www.venezuelaaldia.com/2012/11/venezuela-exporto-52-tipos-de-flores-exoticas-a-rusia/> [Consulta: 10 de junio de 2015]
- Viegas P. 2005. IN VITRO ESTABLISHMENT OF Heliconia rauliniana (HELICONIACEAE). Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v.62, n.1, p.69-71.
- Villegas, N; Alarcón, J; Galindo, J. (2009). Enfermedades limitantes de la producción de heliconias en los departamentos de Caldas, Risaralda y Quindío. Instituto Colombiano Agropecuario. Ediciones Boletín de Sanidad.