



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 DE *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith.***

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela,  
por la bachiller Rosa Marval,  
como requisito parcial para optar al  
título de Licenciado en Biología.  
Tutora: Dra. Teresa Edith Vargas

Caracas, octubre 2015

## ÍNDICE

I.	Lista de abreviaturas	iv
II.	Resumen	v
1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	4
2.1.	Descripción Botánica de <i>Etilingera elatior</i> (Jack) RM Smith	4
2.1.1.	Taxonomía y origen	4
2.1.2.	Morfología	5
2.2.	Importancia	5
2.2.1.	Económica	5
2.2.2.	Medicinal	7
2.3.	Cultivo tradicional	8
2.4.	Cultivo <i>in vitro</i>	9
3.	Objetivo General	13
4.	Objetivos Específico	13
5.	Materiales y Métodos	14
5.1.	Material vegetal	14
5.2.	Selección del explante	14
5.3.	Desinfección del material vegetal	14
5.4.	Medios de cultivo	14
5.5.	Siembra	15
5.6.	Condiciones del Cultivo	16
5.7.	Aclimatación	16

5.8. Observaciones Generales y periódicas al cultivo	16
5.9. Estudios anatómicos	17
5.10. Análisis estadístico de los resultados	18
6. Resultados	19
6.1. Etapa de establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Etlingera elatior</i>	19
6.1.1. Desinfección del material vegetal	19
6.1.2. Cultivo <i>in vitro</i> de yemas	19
6.2. Etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Etlingera elatior</i>	20
6.3. Etapa de enraizamiento de <i>E. elatior</i>	22
6.4. Etapa de aclimatación de <i>E. elatior</i>	24
6.5. Estudios Anatómicos	26
6.5.1. Cortes anatómicos de los brotes múltiples (macollas) formadas <i>in vitro</i> de <i>E. elatior</i>	26
6.5.2. Estudios anatómicos de hojas de plantas de <i>E. elatior</i> , cultivadas <i>in vitro</i> y mantenidas en condiciones <i>in vitro</i> por dos meses y de plantas cultivadas <i>in vitro</i> y mantenidas en condiciones <i>in vitro</i> por seis semanas	27
6.5.3. Observación y comparación de los estomas de hojas de plantas <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	28
6.5.4. Cortes transversales de cormo	31
7. Discusión	32
7.1. Etapa de Establecimiento del Cultivo <i>in vitro</i>	32
7.2. Etapa de Multiplicación <i>in vitro</i>	33
7.3. Etapas de enraizamiento y aclimatación	34

7.4. Cortes anatómicos de los brotes múltiples (macollas) formadas <i>in vitro</i> de <i>E. elatior</i>	36
7.5. Estudios anatómicos de hojas de plantas de <i>E. elatior</i> , cultivadas <i>in vitro</i> y mantenidas en condiciones <i>in vitro</i> por dos meses y de plantas cultivadas <i>in vitro</i> y mantenidas en condiciones <i>ex vitro</i> por seis semanas	36
7.6. Observación y comparación de los estomas de hojas de plantas <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	37
7.7. Cortes transversales de cormo	38
8. Conclusiones	40
9. Bibliografía	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalenoacético
BA	6-benciladenina
°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
IAA	Ácido indol-3 acético;
mg/L	Miligramos por litro
MS	Medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (1962) (con formato: ingles EEUU)
MS1	Medio de cultivo MS
MS2	Medio MS suplementados con 5 ml/L BA de y 3 ml/L de ANA
MS3	Medio MS suplementados con 4 ml/L BA de y 2,5 ml/L de AIA
MS4	Medio MS suplementados con 2,5 ml/L BA de y 1 ml/L de AIA
(MS2)	Plantas que provienen de medio MS2
(MS3)	Plantas que provienen de medio MS3
(MS4)	Plantas que provienen de medio MS4
T+A	Tierra con turba más arena
T	Tierra abonada

## RESUMEN

*Etilingera elatior* (Jack) RM Smith, mejor conocida como bastón del emperador, pertenece a la familia Zingiberaceae. Se usa como planta ornamental, y hoy en día tiene gran demanda a nivel mundial. El objetivo de este trabajo, fue establecer un sistema eficiente de propagación *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith, con la finalidad de entregar plantas a pequeños productores del Jarillo (Edo Miranda) y Colonia Tovar (Edo Aragua), y contribuir a la producción nacional. Se extrajeron y desinfectaron yemas de plantas de bastón del emperador mantenidas en vivero. Se cultivaron en el medio constituido por las sales Murashige y Skoog (1962) y se probaron varios tratamientos hormonales. En las etapas de establecimiento del cultivo y multiplicación de brotes se emplearon los siguientes tratamientos: a) Medio control sin reguladores de crecimiento, en el cual las yemas y plantas se mantuvieron vivas pero no se multiplicaron. b) 5 mg/L de BA con 3 mg/L ANA, c) 4 mg/L de BA con 2,5 mg/L de AIA y d) 2,5 mg/L de BA con 1 mg/L de AIA donde se obtuvo un promedio de 7,53; 5,20; y 4,53 de brotes/planta respectivamente. En la etapa de enraizamiento, se empleó un medio sin reguladores de crecimiento, se obtuvo un 100% de plantas enraizadas, aproximadamente se formaron 6 de raíces/planta. La mayor longitud promedio de raíz fue 14,49cm en plantas que provenían del medio con 4 mg/L BA y 2,5 mg/L de ANA. Para la etapa de aclimatación se probaron dos sustratos: a) mezcla 2:1:1 de tierra con turba y arena b) tierra abonada, observándose que el sustrato más adecuado para la aclimatación de esta especie, fue tierra abonada, con un 82,62 % de sobrevivencia de plantas. Estas plantas han sido entregadas a los pequeños productores del Jarillo, Edo Miranda.

## INTRODUCCIÓN

*Etilingera elatior* (Jack) RM Smith, mejor conocida como bastón del emperador o antorcha, es una planta que pertenece a la familia Zingiberaceae. El nombre de bastón del emperador se le dio después de que se le obsequiara una flor a la princesa de Braganza después de firmar la ley de Mayo de 1888 (Marquez Da Silva, 2007). El nombre antorcha se debe a su inflorescencia, que luce como una antorcha incandescente. Su uso, en Venezuela y otras partes del mundo, es de planta de corte por tener un tallo fuerte y resistir el transporte, o en proyectos paisajistas en parques y jardines grandes tropicales, por el tipo de flores es catalogada como plantas ornamentales de flores exóticas (Hoyos, 1999).

Esta planta también presenta propiedades medicinales. La decocción de las frutas de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith ha sido usada para tratar dolor de oído, las hojas son usadas para limpiar heridas. El fruto es comestible, pero de sabor agrio y tiene reputación de actuar como antihipertensivo, antimicrobiano, antioxidante y promotor de la actividad antitumoral (Bhattacharya y col, 2014). Es también usado en la gastronomía, siendo la inflorescencia un ingrediente en el plato de curry agrio (Chan y col, 2011b).

Se propaga tradicionalmente por sus rizomas. El uso de la práctica de la propagación vegetativa tradicional expone a la planta a diversos patógenos como lo son *Ralstonia solanacearum*, *Meloidogyne incognita*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* (Lins y Coelho, 2004).

La tasa de multiplicación en campo, depende de diversos factores como la época del año en la cual se inicia la multiplicación, la presencia de enfermedades y roedores, pero principalmente a la calidad del rizoma y a las enfermedades que pueda tener. Por lo que, con el cultivo de tejidos vegetales, una vez se establece asépticamente el tejido

meristemático *in vitro*, la micropropagación puede efectuarse indistintamente de la época del año y condiciones adversas tanto bióticas como abióticas, ya que se trata de un cultivo en laboratorio con condiciones ambientales controladas (Iracheta y col, 2013).

El cultivo de tejido *in vitro* es un conjunto de técnicas para el cultivo de células u órganos de forma aséptica en un ambiente controlado. La micropropagación, es un conjunto de técnicas de cultivo de tejidos que se usan para reproducir plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades. El cultivo de tejido *in vitro* tiene como función la conservación del germoplasma, propagación masiva para regeneración a gran escala y para estudios genéticos. La producción de plantas libre de patógenos a través de técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* puede evitar la transmisión de patógenos a través del rizoma (Bhattacharya y col 2014), tema de gran importancia en la producción comercial a gran escala de esta planta, además de afectar a la calidad del material recogido (Lins y Coelho, 2004).

Así mismo, en las Zingiberaceae la reproducción de plantas se ve seriamente afectada por una floración y producción de semillas pobre. Debido al incremento en la demanda de esta planta y a su sobre explotación se han establecido diferentes métodos de cultivo *in vitro* internacionalmente de esta especie y otras especies de interés medicinal (Bhattacharya y col, 2014).

Utilizando estas técnicas con plantas de *Heliconia* pertenecientes al orden Zingiberales, se puede obtener mensualmente tasas de multiplicación de hasta seis plantas por yemas o ápice inicial con actividad meristemática; incluso con 15 % de pérdidas, por oxidación y contaminación, es viable obtener un poco más de 17,000 plántulas aclimatadas en siete meses basándose en resultados obtenidos en *H. psitacorum* (Trópica) y *H. stricta* (Iris Red). Mientras que con el método de división de rizomas en campo, se logra una tasa

de multiplicación variable de acuerdo con la especie pero que pueden oscilar entre 30 a 900 plantas por año a partir de un rizoma (Iracheta y col, 2013).

En las Zingiberaceae, el explante más común para usar en la regeneración de plantas son los brotes en los rizomas o las yemas apicales, y la organogénesis directa es preferible en la regeneración de las Zingiberaceae (Bhattacharya y col, 2014).

Este trabajo tiene como objetivo establecer un sistema de micropropagación masiva de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith (bastón del emperador), financiado por FONACIT, con la finalidad de entregar plantas a pequeños productores del Jarillo (Edo Miranda) y Colonia Tovar (Edo Aragua) y contribuir a la producción nacional.

## ANTECEDENTES

### 1. Descripción Botánica de *Etilingera elatior*(Jack) RM Smith

#### 1.1 Taxonomía y origen

La especie *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith fue descrita por Jack Willian (Jack), bajo el género *Alpinia* (*Alpinia elatior*), fue publicado en *Malayan Miscellanies* 2(7): 2–4 en el año de 1822. En 1986 fue ubicada bajo el género *Etilingera* por Rosemary Margaret Smith (R.M. Smith), quien publicó en *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh* 43(2): 244–245 (Missouri Botanical Garden, 2015).

Son plantas monocotiledóneas pertenecientes a la familia de las Zingiberaceae, que contiene más de 1200 especies, pertenece al orden Zingiberales, superorden Liliales, subclase Magnoliidae, clase Equisetopsida. El género *Etilingera* contiene más de 70 especies. Es originario de las islas de la Sonda y de las islas adyacentes (Hoyos, 1999). En Malaysia es conocida como “kantan” (Bhattacharya, 2014). En Latinoamérica, es conocida bajo los nombres de bastón del Obispo, bastón del rey, heliconia bastón, bastón del emperador, antorcha. Los nombres por los que se conoce en inglés son Philippine wax flower, torch-ginger, wax-flower (Missouri Botanical Garden, 2015).

*Etilingera elatior* (Jack) RM Smith se ha introducido de forma activa como planta ornamental en jardines y patios en los trópicos (Ibrahim y Setyowati, 1999). En América Tropical, a menudo se comercializan como flor de corte y planta de cobertura (Chacón, 2009). La fecha de introducción de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith en Estados Unidos es incierta. Fue introducida probablemente durante el último siglo desde Malasia e Indonesia (Ibrahim y Setyowati, 1999). *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith está reportada

en las colecciones de herbario realizadas en 1970 en Panamá, y en la década de 1980 en Costa Rica, El Salvador y Puerto Rico (Missouri Botanical Garden, 2014).

## **1.2 Morfología**

*Etilingera elatior* (Jack) RM Smith es una hierba gruesa que con frecuencia crece en colonias grandes. Seudotallo de 3 a 6 metros de altura. Las hojas son numerosas, líneas-lanceoladas u oblongas-lanceoladas, de 40 a 70 cm de largo por 8 a 16 cm de ancho, acuminadas en el ápice, agudas en la base, casi sésiles y glabras. La inflorescencia se desarrolla directamente del rizoma, erecta de 1 m o más de alto, la cual termina en una espiga globosa de 10 a 12 cm de largo, rodeado en la base por brácteas vistosas, tiene una gama de tonalidades que van desde un rojo vivo hasta el rosado, con ribetes blancos; las brácteas florales son de color rojas cerosas con bordes amarillos y más pequeñas (Hoyos, 1999). Las bractéolas son tubulares, de aproximadamente 2 cm de largo, divididas de manera unilateral; el cáliz de 3 a 4 cm dividido de manera unilateral, el ápice dentado; corola de color rosa a rojo, a veces blanco; labelo carmesí con margen blanco o amarillo; filamento corto, liso, pubescente; antera roja, más larga que filamento (Acevedo y Strong, 2005). Los frutos son capsulares y un poco cónicos de 2 cm de largo, verdosos o rojizos, pubescentes; semillas abundantes, negras (Hoyos, 1999).

## **2. Importancia**

### **2.1 Económica**

*Etilingera elatior* (Jack) RM Smith es una de las especies más comercializadas como ornamental en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Ibrahim y Setyowati, 1999). Existen varias variedades de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith. La variedad con brácteas rosadas se consume normalmente como especia; la variedad con brácteas rojas o

rojas oscuras y las hojas que están permanentemente púrpura debajo, se utilizan más comúnmente como flores ornamentales o flor de corte, aunque las de las brácteas rosadas son igualmente populares. La variedad con brácteas blancas es muy rara y se observa en la naturaleza. Hay dos tipos de flores con brácteas blancas, una con un borde blanco en el labelo (las cultivadas) y la otra con un borde amarillo en el labelo que se considera el tipo salvaje (Ibrahim y Setyowati, 1999).

*Etilingera elatior* (Jack) RM Smith es una de las 30 hierbas más populares con gran demanda en Malaysia. Hoy en día es cultivada a gran escala en lugares como Australia, Tailandia y Costa Rica para producción de flores de corte (Ismail, 2009; Segalen, 2010 citados por Yunus y col, 2013).

Las Zingiberaceae son usadas en las industrias para la producción de bebidas como cerveza de jengibre o comidas como el pan de jengibre, tortas, pudín, biscuits, entre otros. Las inflorescencias jóvenes de *Etilingera elatior* son usadas como ingredientes esenciales en platos de curry agrio (Chan y col, 2011b).

En Venezuela, el interés por las plantas ornamentales ha ido creciendo. En este país, el cultivo de plantas ornamentales tuvo sus primeros intentos en la década de los 50, en el Distrito Federal y Estado Miranda (Región Capital), como actividad de jardinería familiar con materiales “criollos” en caseríos del Ávila. En la década de los 90, esta actividad se podía definir como una actividad principalmente familiar y de productores tradicionales para un mercado doméstico, carente de apoyo por parte del Estado (Maciel de Sousa, 1995). Actualmente Venezuela está exportando a Rusia una amplia variedad de flores como Aves del Paraíso, Bastones del Emperador, Heliconias y Avecillas que son algunos de los

52 tipos de flores exóticas, a través de la empresa mixta ruso-venezolana Orquídea S.A. (Venezuela al día, 2012).

## 2.2 Medicinal

*Etilingera elatior* (Jack) RM Smith ha sido conocida ampliamente en la medicina tradicional, y en la actualidad varios estudios para conocer más de su potencial medicinal.

Estudios han demostrado que *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith tiene un alto contenido en antioxidantes (Chan y col, 2009a, 2009b; Andarwulan y col, 2010; Haleagrahara y col, 2010; Wijekoon y col, 2011a) y que esta propiedad es significativamente más alta en las hojas que en la inflorescencia y el rizoma (Chan y col, 2011b); y aceites esenciales (Jaafar y col, 2007 citado por Chan y col, 2011b); posee actividad antibacterial moderada contra bacterias gran-positivas y ninguna contra gran-negativas (Chan y col, 2007; Lachumy y col, 2010 citados por Chan y col, 2011b); contiene componentes nutritivos beneficiosos (Wijekoon et al., 2011 citado por Yunus y col, 2013); compuestos fenólicos y actividad de barrido (Yan y Asmah, 2010 citado por Yunus y col, 2013) promueve actividad antitumoral y actividad citotóxica (Habsah et al., 2005), y tiene propiedades antifúngicas (Ficker y col, 2003; Lachumy y col, 2010 citados por Yunus y col, 2013)

Estudios realizados por Tan y col (2011) mostraron resultados que sugieren que el extracto de flor de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith tiene poderoso efecto antioxidante contra el estrés oxidativo inducido por el plomo y el extracto puede ser agente terapéutico útil contra la toxicidad del plomo.

El ácido clorogénico (CGA) o ácido 5-caffeoylquinic, es el compuesto fenólico dominante en hojas de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith (Zingiberaceae). El contenido CGA de las hojas es significativamente mayor que en las flores de *Lonicera japonica* (madreselva), la cual es la fuente comercial. CGA es un antioxidante y un compuesto bioactivo con propiedades antiinflamatorias, antitumor, antimutagénica, anticancerígena, antidiabética, analgésica y antipirética. Con alto contenido de CGA, el extracto herbal estandarizado tiene un gran potencial para ser desarrollado en función a alimentos y otros productos de salud. Las hojas de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith, las cuales no tienen valor económico hoy en día, podrían servir como una fuente alternativa de CGA, ya que son grandes, disponible en abundancia, y la cosecha es no destructiva para las plantas (Chan y col, 2011a).

### **3. Cultivo tradicional**

*Etilingera elatior* (Jack) RM Smith se propaga por semilla y vegetativamente por rizomas. Los rizomas tienden a invadir, por lo que necesita espacios amplios, no es conveniente el sol directo sobre esta especie ya que requiere de una sombra parcial. Para su crecimiento se recomienda una tierra fértil y húmeda (Hoyos, 1999).

La fruta que produce es carnosa lo que facilita su dispersión por animales, incluyendo aves, murciélagos, hormigas y roedores (PROTA, 2014). Las flores son polinizadas por animales. En Tailandia es visitada por aves de la familia Nectariniidae y por mariposas (Kittipanangkul y Ngamriabsakul, 2006). En Borneo y Malasia es visitada por el ave cazadora de arañas *Arachnothera longirostra* y por el ave *Anthreptes malacensis* (Ibrahim y Setyowati, 1999; Sakai y col, 2013). La floración comienza en el segundo año luego de

plantar una pieza de rizoma. La floración ocurre a lo largo del año y la cosecha continua es posible (Ibrahim y Setyowati, 1999).

Esta planta crece principalmente a poca altura en hábitats húmedos en regiones tropicales y subtropicales. Crece mejor a temperaturas medias anuales entre 10°C y 35°C. Es tolerante a suelos ácidos, a condiciones de sombra y tolerante a sequias medias (Ibrahim y Setyowati, 1999; Hammel y col, 2003; Flora of China Editorial Committee, 2014). *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith crece en bosques primarios y secundarios, en los límites del bosque y áreas perturbadas (Ibrahim y Setyowati, 1999; Hammel y col., 2003; Chacon, 2009; Sakai y col, 2013). *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith puede ser muy robusta cuando se planta en locaciones húmedas y relativamente sombreadas, como cerca de piscinas, arroyos o drenajes (Ibrahim y Setyowati, 1999).

#### **4. Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* es definido como el cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos, a los cuales se les proporcionan artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Pierick, 1990; Roca y Mroginski, 1991). Desde los años 50 éstas técnicas han sido desarrolladas principalmente en dicotiledóneas. Las monocotiledóneas por el contrario fueron consideradas por mucho tiempo como “recalcitrantes”, término con el que le se denominaron a todas las especies que presentaban dificultades para establecer un cultivo o bien que eran incapaces de mostrar una respuesta morfogénica (Lopez, 1996).

Actualmente pueden identificarse cinco etapas bien definidas en los procesos de propagación *in vitro*, cada una con objetivos específicos: Fase 0: Preparativa, con preparación de la planta madre o explante inicial, Fase I: Desinfección adecuada del material, Fase II: Establecimiento o Iniciación de los cultivos, Fase III: Multiplicación, Fase IV: Enraizamiento y Fase V: Aclimatación para el traspaso a tierra. (Kikorian, 1991).

Además existen factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación como lo son, la planta que dona el explante, el explante, factores físicos (luz, temperatura, humedad, fotoperíodo), los reguladores de crecimiento y el medio de cultivo (Villalobos y Thorpe, 1991).

Melo y col (2004) cultivaron *in vitro* yemas apicales de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith con diferentes concentraciones de 6-benciladenina en medio de Murashige y Skoog (1962). El promedio más alto de números de brotes fue 2,37 con una concentración de 3 mg/L de esta citoquinina, con la cual también se obtuvo un mejor desarrollo de hojas, tallo y raíces.

Oliveira y col (2009) buscaron establecer un protocolo de multiplicación *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith donde estudiaron los diversos efectos de diferentes reguladores de crecimiento en la germinación de embriones y multiplicación de brotes. A los 15 días de siembra hubo germinación en los tratamientos con 2 mg/L 6-benciladenina, durante este período observaron formación de callos en un 30% de los cultivos. A los 60 días hubo un 30% de germinación. Luego en la etapa de multiplicación el mayor promedio en el número de brotes fue de 4,4 y se obtuvo con 1 mg/L de 6-benciladenina y 2mg/L de

cinetina. La media más alta de número de raíces fue de 4 raíces por planta y se obtuvo en un medio con 1 mg/L de 6-benciladenina y 2mg/L de ácido naftalenacético.

Colombo y col (2010) usaron yemas para la multiplicación *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith. Las yemas fueron inoculadas en medio MS en donde probaron diferentes combinaciones y concentraciones de 6-benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA). En la etapa de establecimiento del cultivo los mejores resultados se obtuvieron con 4,95 mg/L 6-benciladenina y 0,87 mg/L de ácido indolacético con un promedio de 2,67 de numero de brotes; siendo este el más alto. La supervivencia más alta, de 0,73, la obtuvieron con una concentración de 4,95 mg/L 6-benciladenina. Durante la etapa de multiplicación no obtuvieron diferencias significativas en el número de brotes, explicando que esto probablemente se debía a que las plántulas todavía se estaban adaptando al nuevo medio.

Abdelmageed y col (2011), cultivaron yemas de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith en medio MS y probaron diferentes concentraciones de 6-benciladenina y ácido indolacético. El promedio más alto de brotes/explante fue de 3,67 con una concentración de 5 ml/L BA. La mayor longitud media de brotes fue de 4,20 cm y se obtuvo a una concentración de 6 ml/L de BA. En la etapa de enraizamiento a una concentración de 2 mg/L AIA se produjo la mayor cantidad de raíces (3 raíces/planta), mientras que con de 6 mg/L AIA se obtuvo las raíces más largas (promedio 4, 00 cm). En la etapa de aclimatación observaron un 75% de supervivencia de plantas.

Yunus y col (2012) micropropagaron *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith a partir de yemas. Encontrando el mayor promedio de brotes/explantes, de 2,57 y 2,60; la mayor altura promedio de los brotes 2,91 cm y 3,15 cm y el promedio de número de hojas más alto 3,82

y 2,95 con BA a 3 mg/L y 10 mg/L respectivamente. En medio MS sin reguladores de crecimiento, observaron 100% de plantas con raíces, un promedio de 8,4 raíces/ planta y un promedio de 2,94 cm de longitud. La evaluación de diversos sustratos para la aclimatación, mostró que un sustrato que contenía suelo: arena: musgo de turba (1:1:1) produjo una alta tasa de supervivencia de 93,33%; y plantas de mayor tamaño (12,28 cm), con un número mayor de hojas (6,62 hojas/planta).

## OBJETIVO GENERAL

- Establecer un sistema eficiente de propagación *in vitro* de *Etlingera elatior* (Jack) RM Smith a partir de yemas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo para la desinfección de yemas proveniente de plantas de *Etlingera elatior* (Jack) RM Smith cultivadas en condiciones de vivero, para obtener material vegetal en condiciones asépticas para el proceso de propagación *in vitro*.
- Determinar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica de yemas provenientes de plantas de *Etlingera elatior* (Jack) RM Smith.
- Determinar de forma cuantitativa la producción de plantas cultivadas *in vitro* a partir de yemas provenientes de plantas de *Etlingera elatior* (Jack) RM Smith.
- Probar sustratos y condiciones para la aclimatación de plantas de *Etlingera elatior* (Jack) RM Smith obtenidas por propagación *in vitro*.
- Determinar a través de estudios histológicos, la naturaleza de los procesos morfogénicos y si estos ocurrieron de manera directa o indirecta.
- Caracterizar a través de estudios histológicos, posibles cambios en hojas de plantas obtenidas *in vitro*, antes y después de la etapa de aclimatación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal

Se utilizaron plantas madres de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith mantenidas en el vivero del Instituto de Biología Experimental (IBE).

### 2. Selección del explante

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* se usaron como explantes yemas apicales y laterales de 1-2 cm aproximadamente.

### 3. Desinfección del material vegetal

Una vez escindidas, las yemas se lavaron con agua y jabón azul las llaves y se colocaron en una solución de Iodo al 1 % durante 20 minutos. Después se colocaron en fungicida Carbendazil a una concentración de 5 mg/L por 20 minutos, se enjuagaron con agua destilada y seguidamente se colocaron en una solución de cloro comercial al 3,5% con una concentración final de 1,75 % por 20 minutos. En la cámara de flujo laminar, se enjuagaron dos veces con agua estéril y antes de sembrar en el medio de cultivo respectivo, los explantes se sumergieron en una solución de antibiótico Cefatoxima al 1% durante 30 minutos.

### 4. Medios de cultivo

Los medios que se utilizaron durante las diferentes etapas del proceso de propagación *in vitro* estaban constituidos por sales de Murashige y Skoog, 1962 (MS), suplementados con 100 mg/L de mioinositol, 0,4 mg/L de tiamina, 30 g/L de sacarosa y 10mg/L de vitaminas de Morel (Morel y Wetmore, 1951). Ajustado a un pH de 5,8 con NaOH y/o HCl y solidificado con 8 g/L de agar. Los medios se sirvieron en frascos de vidrio y se

esterilizaron en un autoclave a una temperatura de 120-121 °C y bajo una presión de 1kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos.

Después de la etapa de desinfección, las yemas se sembraron en los medios en donde se probaron diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, como se indica en la tabla N°1.

**Tabla N°1.** Tratamientos utilizados para las diferentes etapas de propagación *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith.

		Reguladores de crecimiento		
	Medios	BA(mg/L)	ANA(mg/L)	AIA(mg/L)
Establecimiento del cultivo	MS1	-----	-----	-----
	MS2	5	3	-----
	MS3	4	-----	2,5
	MS4	2,5	-----	1
Multiplicación	MS2	5	3	-----
	MS3	4	-----	2,5
	MS4	2,5	-----	1
Enraizamiento	MS1	-----	-----	-----

Medios reportados por: Colombo y col. (2010).

## 5. Siembra

Los explantes se sembraron en condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar. Se sembraron de 2 a 3 explantes por frasco para un total de 30 explantes por tratamiento.

## **6. Condiciones del Cultivo**

El material vegetal fue incubado en dos condiciones de crecimiento. La primera se usó durante la etapa de establecimiento del cultivo (luz  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , temperatura  $24 \pm 1$  °C), y la segunda para las siguientes etapas del cultivo *in vitro* (luz  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  fotoperiodo de 16 horas luz /8 horas oscuridad, temperatura  $28 \pm 1$  °C).

## **7. Aclimatación**

Las plantas obtenidas durante el proceso de propagación *in vitro* se sembraron en dos sustratos, a) mezcla 2:1:1 de tierra turba y arena b) tierra negra. Se colocaron por 15 días en propagadores de alta humedad y baja luminosidad. Luego las plantas fueron transferidas a condiciones de vivero.

## **8. Observaciones generales y periódicas al cultivo**

Se realizaron observaciones cualitativas y cuantitativas a cada uno de los cultivos en sus diferentes etapas.

Las características cualitativas evaluadas fueron: formación de callo, tipo, color y textura del callo formado, hiperhidricidad, tamaño del explante y de las hojas del explante.

Las características cuantitativas evaluadas fueron, % de explantes que respondieron a los reguladores de crecimiento, % de contaminación de los explantes, % de explantes con brote, promedio de brotes por explante, % formación de callo, % callo que formaron órganos, % de explanteshiperhídricos, tamaño promedio de las hojas, tamaño promedio de las raíces y promedio de raíces por planta.

## 9. Estudios anatómicos

9.1. De los brotes múltiples (macollas), que se formaron en las etapas de iniciación y de multiplicación, se realizaron cortes transversales a mano alzada, para comprobar la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro*, y determinar si el proceso ocurrió de forma directa o indirecta.

9.2. Para comparar anatómicamente hojas de plantas obtenidas y mantenidas *in vitro* por dos meses, con hojas de plantas obtenidas *in vitro* y mantenidas en vivero (plantas *ex vitro*) por seis semanas. Se realizaron cortes transversales a mano alzada. En ambos casos se tomaron 5 hojas de la zona media, de 4 plantas al azar.

9.3. Para verificar la existencia o no de conexión vascular entre las raíces formadas *in vitro* y el tallo de la planta *in vitro* se realizaron cortes transversales del cormo a nivel de la yema de una raíz.

En el caso del material vegetal *in vitro*, el material fue preservado en alcohol al 70%. En el caso del material vegetal de plantas mantenidas en vivero, los cortes se realizaron con material fresco.

Las muestras se colorearon con Azul de Toluidina en solución acuosa al 1%.

9.4. Se observaron y compararon los estomas, de plantas obtenidas y mantenidas *in vitro* y de plantas obtenidas *in vitro* y mantenidas vivero (plantas *ex vitro*). En el caso de hojas de plantas *in vitro* de dos meses, los estomas fueron observados directamente en la cara abaxial, de hojas con poca o nada de pigmentación y en el caso de las hojas de plantas *ex vitro*, para observar los estomas, se realizaron cortes longitudinales.

## **10. Análisis estadístico de los resultados**

El análisis estadístico de los resultados de las etapas de establecimiento y multiplicación se realizó a través de la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, en el caso de los resultados de la etapa de enraizamiento se utilizó la t de student y para los resultados de la etapa de aclimatación se realizó el test de Kruskal-Wallis, con la ayuda del programa Microsoft Excel 2010 para Windows.

## RESULTADOS

### 1. Etapa de establecimiento del cultivo *in vitro* de *Etilingera elatior*.

#### 1.2 Desinfección del material vegetal:

El método de desinfección utilizado en las yemas apicales y laterales resultó ser adecuado para el establecimiento del cultivo, aunque se obtuvo un alto porcentaje de contaminación (50- 86 %), el número de explantes que quedaron asépticos resultó apropiado en el momento de ser empleados para la multiplicación.

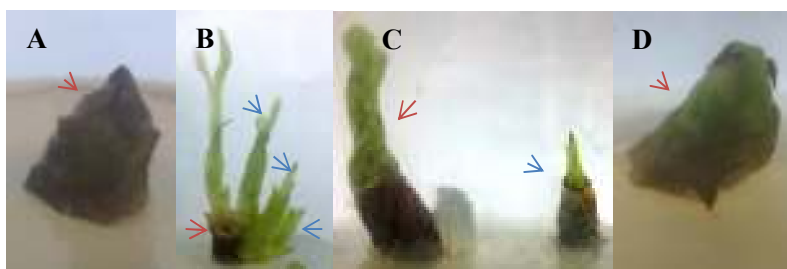
#### 1.3 Cultivo *in vitro* de yemas.

A los 2 meses de cultivo en el medio sin reguladores de crecimiento MS1 y el medio MS4 no se observó brotación de las yemas (Figs. 1A y 1D) y en ambos medios la contaminación fue alta 50% y 85,71% respectivamente. A los tres meses, las yemas en el medio MS4 habían muerto en su totalidad, y las yemas del medio MS1 que permanecieron libres de agentes contaminantes fueron pasadas a medios con reguladores de crecimiento, para así aumentar el número de explantes para comenzar la etapa de multiplicación. (Tabla 2)

En los medios MS2 y MS3 se observaron brotes a los 21 días de cultivo *in vitro*. El porcentaje de brotación en los medios MS2 y MS3 fue del 3,33 % (Figs. 1 B y 1C); con un promedio de 0,47brotes/explante para MS2 y de 0,07brotes/explante para MS3, no hubo una diferencia significativa en la brotación de los dos medio. El porcentaje de contaminación que se tuvo fue 84,62% para el medio MS2y 85,71% para el medio MS3 (Tabla 2).

**Tabla N°2.** Porcentaje de contaminación, porcentaje de explantes que brotaron y número de brotes promedio por explante a los dos meses de la etapa de establecimiento del cultivo *in vitro* de *E. elatior*.

Medio	% Contaminación	% Brotación	Promedio Brotes/yema
MS1	50	0	0
MS2	84,62	3,33 a	0,43a
MS3	85,71	3,33 a	0,07a
MS4	85,71	0	0



**Figura N°1.** Yemas a los dos meses de haberse iniciado el cultivo *in vitro* de *E. elatior*. **A** yema sin desarrollarse en medio MS1, **B** formación de 4 brotes en medio MS2, **C** yema en medio MS3 y brote aislado formado a partir de la yema, **D** yema sin desarrollarse en medio MS4. Flechas rojas indican la yema establecida *in vitro*, brotes desarrollados a partir de una yema indicados con flechas azules.

## 2. Etapa de multiplicación *in vitro* de *Etilingera elatior*.

En la etapa de multiplicación, el medio donde se apreció el mayor número promedio de brotes por planta (7,53), fue el medio MS2 (Fig. 2A), luego en el MS3 (5,2) (Fig. 2B) y después en el MS4 (4,53) (Fig. 2C). Aunque con respecto a este aspecto, no hubo diferencias significativas entre los medios MS3 y MS4 (Tabla 3). Al finalizar esta etapa, todas las plantas desarrollaron hojas.

Así mismo, en los distintos medios probados en esta investigación, no hubo diferencias significativas en la altura promedio alcanzada por los brotes, ni en el número promedio de hojas por brote, aunque sí se observaron diferencias significativas en la longitud de las hojas, siendo en el medio MS4 donde se observó la mayor longitud promedio de 9,59 cm (Tabla 3).

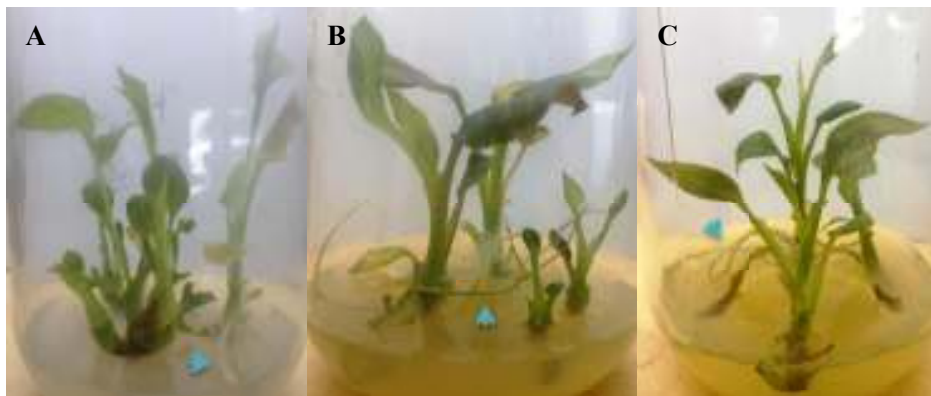
En el medio MS4 se obtuvo el mayor porcentaje de plantas que desarrollaron raíces. El número de raíces promedio por plantas tampoco fue significativamente distinto cuando se compararon los tres medios de cultivo probados. En la longitud promedio de las raíces fue donde observamos diferencias significativas entre los resultados en los tres medios, siendo en el medio MS4 donde se presentó la mayor longitud promedio y en el medio MS2 la menor.

**Tabla N°3.** Numero promedio de brotes por planta, y parámetros morfológicos de tallo, hojas y raíces de plantas de *E. elatior* a cuatro meses de haber iniciado la etapa de multiplicación.

Medio	MS2	MS3	MS4
Promedio de Brotes/Plantas	7,53a	5,2b	4,53b
Altura Promedio (cm)	9,09a	8,81a	9,59a
Nº Hojas Promedio	3,7a	3,57a	3,6a
Longitud Hojas Prom. (cm)	3,67a	3,71a	4,22b
% Plantas con Raíces	75,41	63,33	76,67
Nº Raíces Promedio	5,73a	5,13a	5,97a
Longitud Raíces Prom. (cm)	6,51a	9,07b	12,03c

**Tabla N°4.** Contaminación y supervivencia de la etapa de multiplicación de *E. elatior* a cuatro meses de haber iniciado.

Medio	MS2	MS3	MS4
% Contaminación	32,79	26,67	10
% Supervivencia	71,89	94,92	73,96



**Figura N°2.** Etapa de Multiplicación de *E. elatior* a los cuatro meses de cultivo. **A** plantas obtenidas en el medio MS2, **B** en medio MS3 y **C** en medio MS4. Flechas indican raíces que se formaron en esta etapa.

### 3. Etapa de enraizamiento *in vitro* de *E. elatior*.

Independientemente que se haya producido un cierto número promedio de raíces en los diferentes medios usados para la multiplicación, para aumentar el número de raíces/planta antes de pasar a la etapa de aclimatación, las plantas fueron sembradas en medio MS sin hormonas durante un mes (MS1) (etapa de enraizamiento).

Observamos que plantas que provenían del medio MS2 (Fig. 3A), después de un mes de permanecer el medio MS1, adquirieron una altura promedio 14,43 cm, la cual es significativamente mayor en comparación con las plantas provenientes de MS3 (12,65 cm)

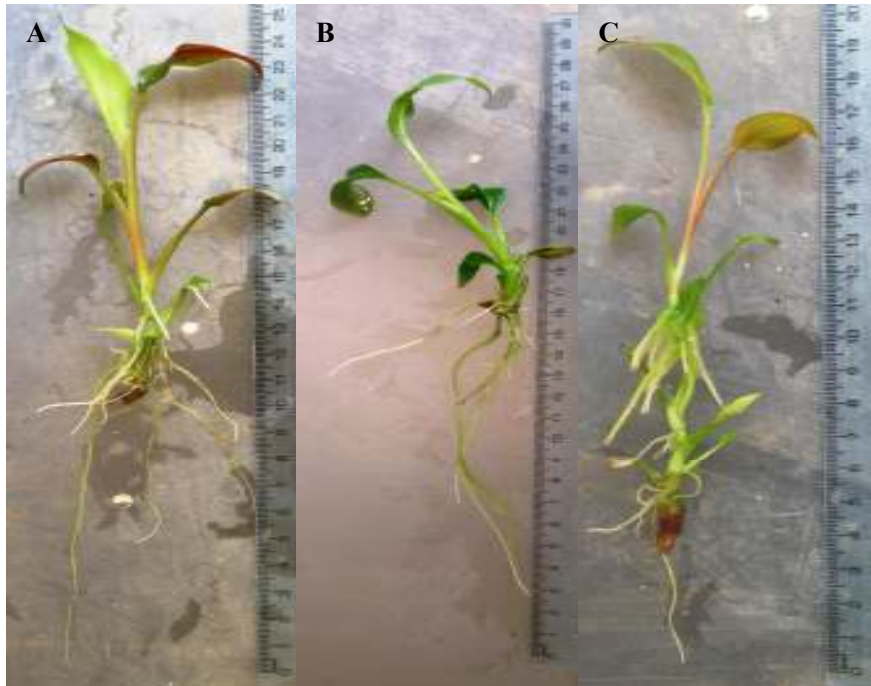
y MS4 (11,69 cm), además no hubo diferencia significativa entre las plantas provenientes de los medios MS3 y MS4 (Tabla 4) (Figs. 3B y 3C).

Se puede resaltar, que en este mes de cultivo en MS1, las plantas adquirieron un mayor crecimiento (5,34 cm; 3,84 cm; 2,1 cm plantas provenientes de los medios MS2 MS3 y MS4 respectivamente), con respecto al crecimiento obtenido en la etapa de multiplicación, donde pasaron más tiempo en medios con reguladores de crecimiento (cuatro meses).

En el medio MS1 (sin reguladores de crecimiento), el 100 % de las plantas desarrollaron raíces, independientemente del medio de cultivo de donde provinieran. El número promedio de raíces por planta no varió significativamente entre los medios. La longitud promedio de raíces en las plantas provenientes de medio MS3 fue significativamente mayor, con respecto a las provenientes de los medios en los medios MS2 y MS4. La longitud promedio de las raíces fue mayor en las raíces de plantas provenientes del medio MS3. Mientras que en este aspecto, no hubo diferencia significativa en las plantas provenientes de los medios MS2 y MS4, (Tabla N° 4).

**Tabla N°5.** Etapa de enraizamiento en el medio MS1 (sin reguladores de crecimiento) de plantas *E. elatior* provenientes de los medios MS2, MS3 y MS4.

	MS2	MS1 (MS2)	MS3	MS1 (MS3)	MS4	MS1 (MS4)
Prom. Altura (cm)	9,09a	14,43b	8,81a	12,65b,c	9,59a	11,69c
Prom. N° Raíces	5,73a	6,63a	5,13a	5,97a	5,97a	6,07a
Prom. Long. Raíces (cm)	6,51a	10,55b,c	9,07c	14,49d	12,03b	11,13b,c
% Plantas con raíces	75,41	100	63,33	100	76,67	100



**Figura N°3.** Plantas a las cuatro semanas de enraizadas en medio MS1, sin reguladores de crecimiento, antes de ser pasadas a tierra y provenientes de **A** medio MS1 (MS2). **B** medio MS1 (MS3). **C** medio MS1 (MS4).

#### **4. Etapa de aclimatación de *E. elatior*.**

Luego de haber terminado la etapa de enraizamiento, las planta se pasaron a condiciones *ex vitro* donde se probaron dos tipos de sustrato: tierra con turba mezclada con arena en una proporción 2:1:1 y tierra negra sola.

En la Tabla 5, se muestra el % de sobrevivencia y el crecimiento promedio de las plantas por semana según el tipo de sustrato donde se sembraron y según el medio de cultivo donde se obtuvieron *in vitro* (MS2, MS3, MS4), antes de ser cultivadas en medio MS sin reguladores de crecimiento (etapa de enraizamiento). En esta etapa puede observarse, que el sustrato empleado tuvo mayor significancia que el medio de multiplicación de donde provenían las plantas.

El porcentaje de sobrevivencia y el crecimiento fue mayor en las plantas sembradas en tierra abonada (82,62%), mientras en tierra con turba mezclada con arena fue de 8,62%; casi 10 veces menor el porcentaje de supervivencia, y el crecimiento de las plantas fue menor.

Se aprecia que el porcentaje de supervivencia más alto (90,90%), es de las plantas que provenían del medio MS3 sembradas en tierra abonada.

**Tabla N°6.** Resultados de aclimatación: Crecimiento de la planta por semana y porcentaje de supervivencia.

	T+A (MS2)	T (MS2)	T+A (MS3)	T (MS3)	T+A (MS4)	T (MS4)
Altura (cm)	0,25a	0,43a,b	0,03a	1,07a,b	0,08a	1,11b
N° Hoja por planta (cm)	0,09a	0,28a,b	0,02a	0,32a,b	0,03a	1,40b
Longitud Hoja (cm)	0,21a	0,39a,b	0,03a	0,41a,b	0,08a	1,99b
Ancho Hoja (cm)	0,11a	0,14a	0,00a	0,24a,b	0,06a	1,06b
% Supervivencia	9,09	75	11,11	90,9	5,56	87,5
% Supervivencia según medio de multiplicación	32,35		41,38		44,12	
% Supervivencia T+A	8,62					
% Supervivencia T	84,62					

T+A: tierra con turba y arena. T: tierra negra.

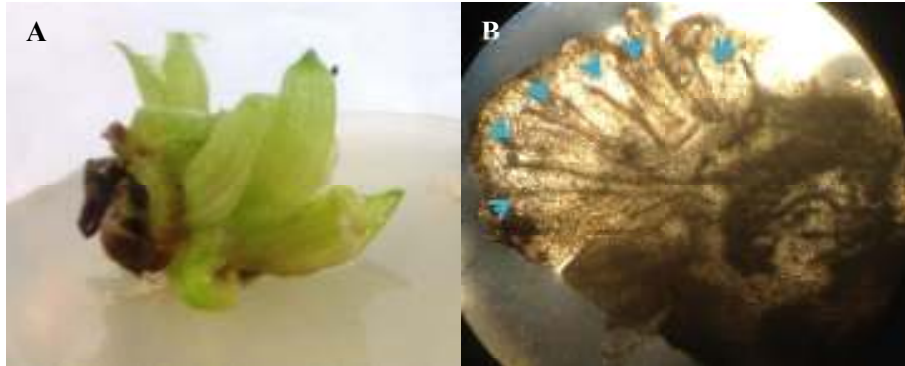


**Figura N°4.** Plantas de *E. elatior* en etapa de aclimatación. **A** plantas provenientes del medio MS2 (etapa de multiplicación). **B** plantas provenientes del medio MS3 (etapa de multiplicación). **C** plantas provenientes del medio MS4 (etapa de multiplicación).

## 5. ESTUDIOS ANATÓMICOS

### 5.1 Cortes anatómicos de los brotes múltiples (macollas) formadas *in vitro* de *E. elatior*.

A las 5 semanas de cultivo se comenzó a observar en los medios MS2, MS3 y MS4 la formación de brotes múltiples en forma de macolla (Fig. 5A). A estas formaciones se le realizaron cortes transversales para comprobar la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro*, y de esa manera, determinar si el proceso ocurrió de forma directa o indirecta. En la figura 5B, se muestra un corte transversal, donde se puede apreciar la formación de múltiples brotes, no se observaron células típicas de callo, se observó conexión vascular de los brotes con el tejido de origen y la formación de numerosas traqueidas, por lo cual podríamos estar en presencia de una organogénesis directa.



**Figura N°5.** **A** Formación en medio MS2 de múltiples brotes (macolla) partir de cultivo de yemas *in vitro* de *E. elatior* a las cinco semanas de cultivo. **B** Corte transversal de la macolla donde se observa la formación de múltiples brotes sin la aparente formación de células típicas de callo (40X). Se observa conexión vascular de los brotes con el tejido de origen. Conexión vascular indicada con flechas azules.

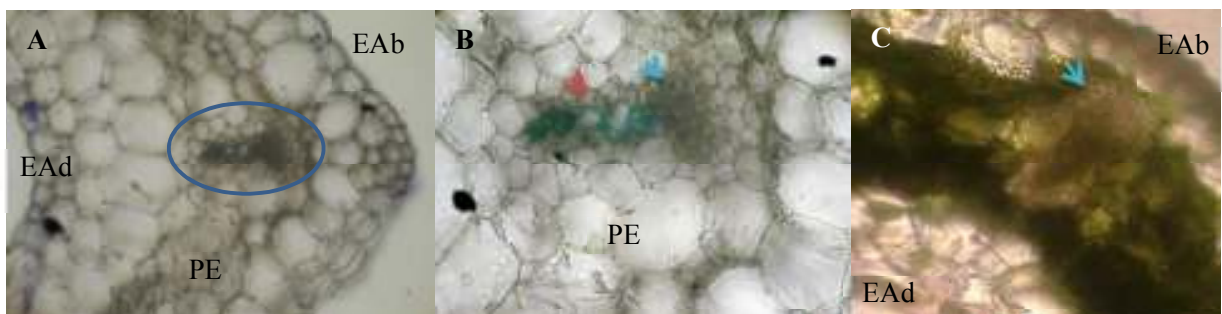
## 5.2 Estudios anatómicos de hojas de plantas de *E. elatior* cultivadas *in vitro*, mantenidas en condiciones *in vitro* y mantenidas en condiciones *ex vitro*.

Las hojas que se utilizaron para este estudio, fueron aisladas de plantas cultivadas *in vitro* y mantenidas *in vitro* en el medio MS2 (azarosamente), durante dos meses. No se observó, la apariencia de hiperhidratación en las hojas.

En la figura 6, se muestra un corte transversal de hoja, donde se observó: formación de cutícula aparente, engrosamiento (lignificación) de los elementos de los haces vasculares, tanto xilema como floema del xilema, lo cual indica que el patrón morfogénico se conserva y se expresa de forma adecuada. Se puede apreciar el floema, los miembros de los vasos y las traqueidas se ven color azul verdoso intenso, debido al engrosamiento de sus paredes secundarias. Asimismo, se observa que no hay una diferenciación apreciable de una vaina vascular que rodee al haz.

El mesófilo está representado por una o dos capas de células de parénquima esponjoso, dispuestas de forma alargada y un parénquima esponjoso laxo, con 5 a 6 capas y con espacios intercelulares yuxtapuestos (Fig. 6A).

En la figura 6C, se tiene un corte transversal de una hoja aislada de una planta propagada *in vitro* y mantenida por seis semanas en condiciones *ex vitro*, en el cual se puede apreciar el floema también lignificado, pero el tipo de corte no permitió que se apreciara claramente el xilema. Tampoco no se observa una vaina vascular que rodee el haz. El mesófilo no parece estar diferenciado todavía.



**Figura N°6.** Corte transversal a nivel de vena media de una hoja de plantas de *E. elatior* mantenidas *in vitro* y *ex vitro*. **A** se observa que hay engrosamiento del xilema y el floema de una hoja *in vitro* (100X). **B** aumento de la foto de hoja *in vitro* (200X). **C** corte transversal de hoja *ex vitro* (200X). Flecha azul indica el floema y flecha roja el xilema. EAb-epidermis abaxial. EAd-epidermis adaxial. PE-parenquima esponjoso.

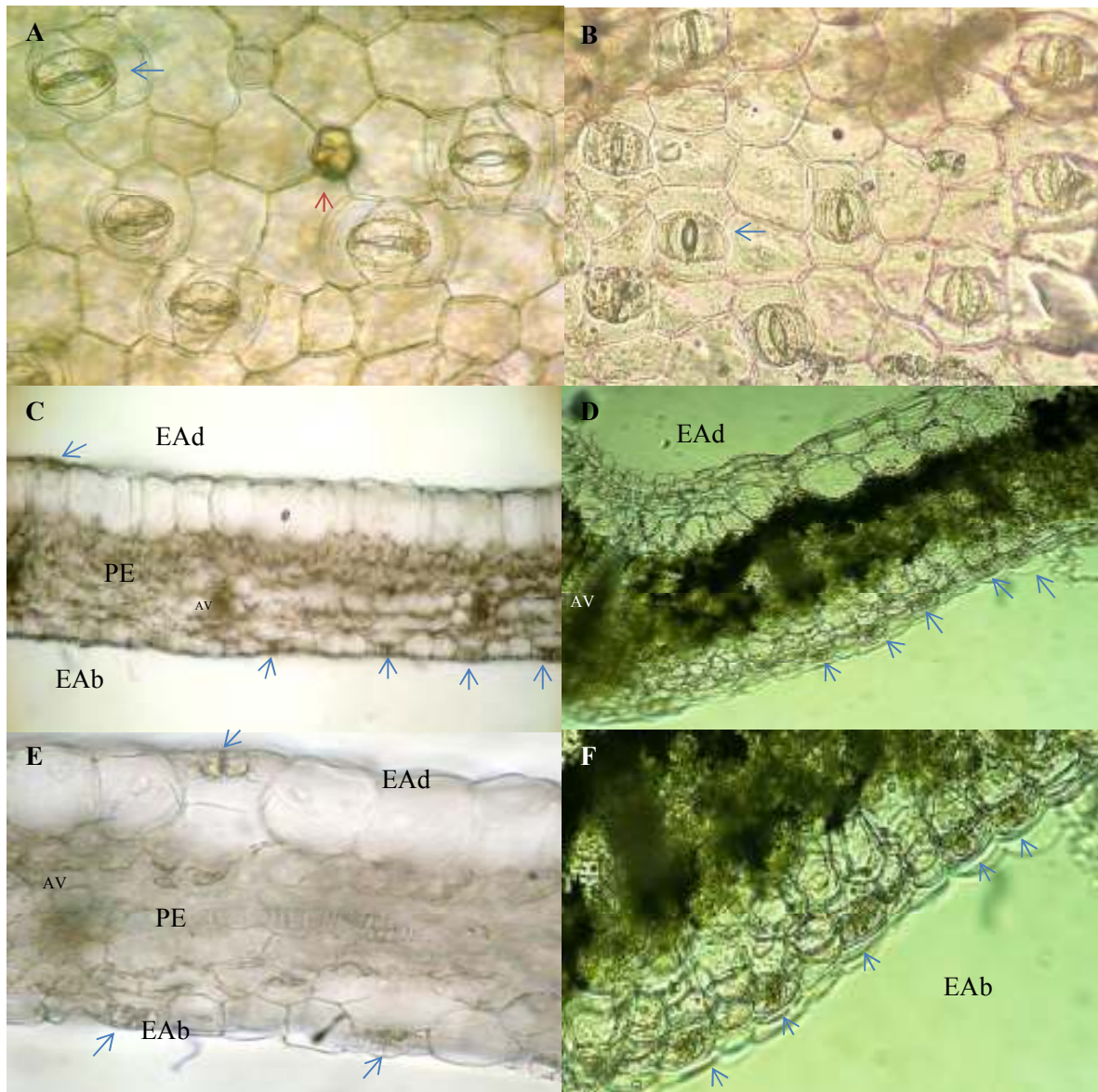
### 5.3 Observación y comparación de los estomas de hojas de plantas *in vitro* y *ex vitro*.

En la figura 7A y 7B se observa la cara abaxial de hojas de *E. elatior in vitro* y *ex vitro* respectivamente.

En las figuras 7C y 7C, se observan cortes transversales de hojas de plantas cultivadas y mantenidas *in vitro*, y de plantas cultivadas *in vitro* y mantenidas *ex vitro*, respectivamente, donde se muestran ambas caras de la hoja y los estomas presentes. Los estomas están presentes en ambas caras de la hoja de la planta mantenida *in vitro*, estos se

observan con mayor cantidad en la cara abaxial que en la cara adaxial. La epidermis en ambas caras es uniseriada, con células de forma y tamaño variable. La hoja de la planta mantenida en condiciones *ex vitro* presenta los estomas únicamente en la cara abaxial. La epidermis de la cara adaxial es biseriada o uniseriada y de la cara abaxial uniseriada.

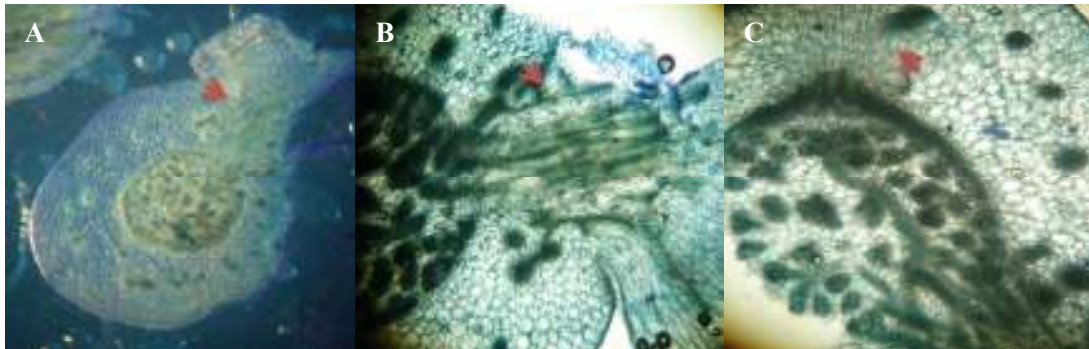
Se observaron posibles células secretoras de aceite en la epidermis abaxial, y entre los haces vasculares, indicados por las flechas rojas de la figura 7A.



**Figura N°7.** Estomas en hojas de *E. elatior* cultivadas *in vitro* y *ex vitro*. **A** vista de la cara abaxial de una hoja cultivada *in vitro* (400X). **B** vista de la cara abaxial de una hoja cultivada *ex vitro* (400X). **C** corte transversal de hoja *in vitro* (100X). **D** corte transversal de hoja *ex vitro* (100X). **E** aumento de corte transversal *in vitro* donde se observan los estomas en ambas caras (200X). **F** aumento de corte transversal *in vitro* donde se observan los estomas en la cara abaxial (200X). Flechas azules indican estomas, flechas rojas indican células secretoras de aceite. EAb-epidermis abaxial. EAd-epidermis adaxial. PE-parenquima esponjoso. AV-haz vascular.

## 5.2. Cortes transversales de cormo

En los cortes transversales de yemas *in vitro* a nivel de un brote de una raíz (Fig. 8), se observó conexión vascular entre la raíz y la yema. Se observa también la formación de una segunda raíz, donde vemos como discurren los elementos del xilema hacia esta yema. Los elementos conductores están desarrollados, lo cual indicaría que están preparadas para ser raíces funcionales, lo que no suele ser una característica muy común en el cultivo *in vitro*.



**Figura N°8.** Corte transversal de yema de *E. elatior* a seis meses de haberse sembrado *in vitro*. El corte fue realizado a la altura de un brote de raíz, las flechas indican la conexión vascular (numerosas traqueidas). **A** foto sin aumento. **B** foto en microscopio (40X). **C** posible segunda raíz formándose (40X). Flecha roja indica las numerosas traqueidas.

## DISCUSIÓN

### 1. Etapa de establecimiento del cultivo *in vitro*

Para la etapa de establecimiento del cultivo *in vitro*, es necesario lograr un adecuado tratamiento de desinfección de los explantes, que permita continuar con el desarrollo de las diferentes etapas del cultivo. No es fácil la desinfección de estos explantes por tener contacto directo con la tierra, la cual puede tener diferentes agentes patógenos que ataque el explante en condiciones *in vitro*. El método de desinfección utilizado en las yemas apicales y laterales resultó ser adecuado para el establecimiento del cultivo, ya que aun obteniéndose un alto porcentaje de contaminación (50- 86 %), en la iniciación, el número de explantes que quedaron asépticos resultó apropiado en el momento de ser empleados para la etapa de multiplicación.

En la etapa de establecimiento del cultivo, las yemas no brotaron en el medio sin reguladores de crecimiento, solo brotaron en el medio MS2 (5ml/L BA y 3ml/L ANA) y en el medio MS3 (4ml/L BA y 2,5ml/L AIA). Esta respuesta de latencia, podría sugerir, bajos niveles hormonales endógenos de estos explantes, por ello la necesidad de adicionar al medio esas cantidades de citoquininas y auxinas. Además, fue necesario agregar concentraciones mayores de citoquininas que de auxinas. Lo cual es generalmente, una necesidad común para liberar de la latencia las yemas de la mayoría de las especies ya que una concentración mayor de citoquininas en comparación con las auxinas estimula la formación de brotes en las plantas (Loyola-Vargas y col. 2008).

Aunque no hubo diferencia significativa en los resultados entre los medios MS2 y MS3, el promedio brotes/ explante fue mayor (0,43) en el medio MS2, en comparación con MS3 (0,07). Es importante destacar que en el medio MS4 (2,5ml/L BA y 1ml/L AIA),

tampoco hubo brotación de yemas, lo que sugiere que quizás esta combinación de reguladores de crecimiento no es la adecuada para liberar de la latencia a las yemas de esta especie en particular.

Colombo y col. (2010), trabajando con propagación *in vitro* de *E. elatior*, lograron obtener 1,69 brotes/explante, usando una concentración hormonal como la del medio MS4 empleado por nosotros, aunque se obtuvieron mejores resultados con otras combinaciones de reguladores de crecimiento: 2,26 brotes/ explante (4,95ml/L BA y 0,93ml/L ANA), 2,63 brotes/ explante (4,95ml/L de BA y 0,87ml/L de AIA). Pero igualmente no observaron brotación de yemas en medio sin reguladores de crecimiento.

## **2. Etapa de Multiplicación *in vitro*.**

En esta investigación, las tres combinaciones de reguladores de crecimiento (MS2, MS3, MS4) empleadas para la multiplicación de brotes, resultaron favorables, aunque en el medio MS4, se observó el menor número de brotes/explante y en el medio MS2, con 5mg/L de BA y 3mg/L de ANA se obtuvo el mayor número de brotes/explante (7,53).

Varios investigadores, trabajando en la propagación *in vitro* de *E. elatior*, han recurrido al empleo de citoquininas y/o auxina para la multiplicación de esta especie.

Colombo y col. (2010), con una concentración de 4,50mg/L de BA y 3,37mg/L de ANA, registraron un promedio de brotes por explante de 3,70.

Rescarolli y Zaffari (2009) obtuvieron un promedio de 6,50 brotes por explante utilizando yemas de *E. elatior* en medio MS suplementado con 1 mg/L de BA.

Yunus y col. (2011) con concentraciones de 6-benciladenina a 3 ml/L y 10 mg/L produjeron la media más alta en número de brotes por yema, de 2,57 y 2,60 respectivamente.

Abdelmageed y col. (2011), obtuvo el promedio más alto de brotes por explante (3,67) con una concentración de 5 mg/L de 6-benciladenina.

Oliveira y col. (2009), en la etapa de multiplicación, el mayor promedio en el número de brotes por explante (4,4), al emplear 1 mg/L de 6-benciladenina y 2mg/L de cinetina.

### **3. Etapas de enraizamiento y aclimatación.**

La etapa de aclimatación es una etapa limitante en la propagación, en esta etapa suele ocurrir la mayor pérdida de plantas. Cuando las plantas *in vitro* son pasadas a condiciones *ex vitro*, estas deben pasar por una etapa de aclimatación, en donde las plantas deben adaptarse a esas condiciones. Para tener mejores resultados en el establecimiento en campo, es necesario el desarrollo radicular *in vitro* (Pierik, 1990 y Sharma y Singh 1995).

En nuestro trabajo, en la etapa de multiplicación no se desarrollaron raíces en todas las plantas, por lo que se realizó una etapa de enraizamiento donde se usó el medio MS1, el cual no tenía reguladores de crecimiento, y en el cual se obtuvo un 100% de plantas enraizadas. En esta etapa, el número de raíces/planta no varió mucho con respecto al número de raíces/planta formadas a la etapa de multiplicación, pero si vario la longitud, siendo las plantas que provinieron del medio MS3, las que desarrollaron raíces más largas más largas.

Inden y col. (1988), reportaron que altas concentraciones de reguladores de crecimiento, pueden reducir la elongación de las raíces o inhibir su formación. Colombo y col. (2010), usaron con éxito un medio sin reguladores de crecimiento para la etapa de enraizamiento *in vitro* de plantas de *E. elatior*.

Yunus y col. (2011), observaron que un medio MS sin reguladores de crecimiento, era el mejor para enraizar *in vitro* plantas de *Etilingera elatior*, obteniendo un 100% de plantas enraizadas, con un promedio de 8,4 raíces/planta y un promedio de 2,94 cm de longitud.

Mientras que Oliveira y col. (2009) y Abdelmageed y col (2011), trabajando con enraizamiento *in vitro* de plantas *E. elatior*, obtuvieron buenos resultados usando regulares de crecimiento.

Oliveira y col. (2009), observaron 4 raíces/planta en un medio con 1 mg/L de BA y 2mg/L de ANA. Abdelmageed y col. (2011). lograron la mayor cantidad de raíces, 3 por planta, en un medio suplementado con 2 mg/L AIA, y las raíces más largas (4 cm promedio) con 6 mg/L AIA.

El tipo de sustrato escogido para la aclimatación es de vital importancia. El sustrato debe ser de baja densidad, rico en nutrientes, de composición química y física equilibrada y uniforme, con buena aireación y drenaje, y una buena cohesión entre partículas y raíces, y tener una buena flora bacteriana (Coutinho & Carvalho, 1983).

En nuestra investigación, se encontró que la tierra negra fue el mejor sustrato para la aclimatación de plantas de *E. elatior* provenientes de cultivo *in vitro*.

Resultados similares obtuvieron Oliveira y col (2009) y Abdelmageed y col (2011), usando tierra abonada como sustrato en la aclimatación de *E. elatior*, quienes lograron respectivamente 82 y 75% de sobrevivencia.

Yunus y col. (2011), evaluaron diversos sustratos para la aclimatación de *E. elatior* y observaron que un sustrato que contenía suelo: arena: musgo de turba en proporción 1:1:1, produjo una alta tasa de supervivencia de 93,33%; y plantas de mayor tamaño, de 12,28 cm, con un número mayor de hojas, de 6,62.

Seran y col. (2005), reportaron que en plantas de té, hubo mayor porcentaje de sobrevivencia en plantas en aclimatación con sustrato de solo tierra en comparación de una mezcla 1:1 de tierra y arena, y que la supervivencia de la planta podía incrementar si se le agregaba a la tierra material que absorbiera y mantuviera la humedad.

#### **4. Cortes anatómicos de los brotes múltiples (macollas) formadas *in vitro* de *E. elatior*.**

En los medios MS2, MS3 y MS4, se observó la formación de brotes múltiples en forma de macolla. Es posible que estas formaciones se hayan producido por las concentraciones relativamente altas de los reguladores de crecimiento. Se pudo apreciar a través de cortes transversales, que el proceso de regeneración *in vitro* es una organogénesis, que aparentemente ocurre de forma directa.

#### **5. Estudios anatómicos de hojas de plantas de *E. elatior*, cultivadas *in vitro*, mantenidas en condiciones *in vitro* y mantenidas en condiciones *ex vitro*.**

Las hojas de *E. elatior* que provienen de campo, presentan una organización dorsiventral e hipostomática, con la cara abaxial uniseriada y la abaxial biseriada, con

células de forma y dimensiones variadas. El mesofilo está representado por una o dos capas de parénquima en empalizada, dispuestas de forma alargada y un parénquima esponjoso laxo (Márquez Da Silva, 2007).

Las plantas mantenidas *in vitro* crecen en condiciones controladas con alta humedad relativa. En nuestra investigación, en los cortes transversales de las hojas de bastón del emperador cultivadas *in vitro* no se observó cutícula aparente. El crecimiento en ambientes tan húmedos, suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (Castillo, 2004).

No presentaron tampoco una epidermis biestratificada en la cara adaxial como se reporta en la bibliografía de la planta. No hay parénquima en empalizada, solo parénquima esponjoso. Los tejidos están pocos o no diferenciados, lo que se espera que pase en plantas cultivadas *in vitro* (Fig. 6A) (Castillo, 2004). En algunas hojas *ex vitro*, se apreció la epidermis adaxial biestratificada, pero no se podía distinguir el tipo de parénquima que tenía. Márquez Da Silva (2007), reportó que a medida que avanzaba la etapa de aclimatación mayor era el desarrollo de parénquima en empalizada.

## **6. Observación y comparación de los estomas de hojas de plantas *in vitro* y *ex vitro*.**

Los estomas observados en las hojas de las plantas de *E. elatior* son de tipo tetracítico, envuelto por cuatro células subsidiarias, dos de ellas células oclusivas paralelas, con el par restante polar y con frecuencia más baja. Los estomas tetracíticos son típicos de las monocotiledóneas (Albuquerque y Neves, 2004). Al analizar la cara abaxial de las hojas en condiciones *in vitro*, bajo microscopio, observamos que los estomas se encontraron en

su mayoría cerrados, posiblemente por la inmersión en alcohol. Los estomas se encontraron ordenados a lo largo de la superficie foliar, tanto en la cara adaxial como en la abaxial, a pesar de que la bibliografía sólo refiere la presencia de estomas en la cara abaxial de la hoja de *E. elatior* creciendo en condiciones naturales. A simple vista se observó una mayor cantidad de estomas en la cara abaxial que en la adaxial.

En condiciones de aclimatación, solo se observaron estomas en la cara abaxial a las 6 semanas, como la bibliografía lo sugiere. Alteraciones en la estructura interna foliar constituyen aspectos decisivos en la capacidad de aclimatación de especies expuestas a diferentes condiciones (Hanba y col., 2002; Schluter y col., 2003). En las condiciones de cultivo *in vitro* (alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO<sub>2</sub> durante casi todo el período, producción de etileno y baja densidad fotosintética) pueden producirse desviaciones del patrón normal en las plantas (Castillo, 2004) así como la anatomía de la hoja es influenciada por la luz y la humedad, diferenciándose anatómicamente de las originadas *in vivo* (Brainerd y col., 1981). Este es, por lo tanto, uno de los patrones de variación en la expresión fenotípica derivado del cultivo *in vitro* de esta planta.

En este trabajo se realizaron cortes a plantas *ex vitro* e *in vitro* con el fin de ver cómo se desarrollan en estas etapas, y compararlas con cortes de texto de *E. elatior* de campo para ver qué diferencias se podrían presentar. Sin embargo, la diferencia de mayor importancia que encontramos fueron los estomas, los cuales se van desarrollando de manera normal, en las plantas provenientes de cultivo *in vitro* una vez que pasan cierto tiempo en condiciones *ex vitro*, por lo que se espera una buena adaptación al campo.

## **7. Cortes transversales de cormo**

Las plantas obtenidas in vitro tienen hojas delgadas, tallos débiles, raíces débiles y poco funcionales, conexión tallo-raíz incompleta y baja tasa fotosintética (Ramos Amaya, 2012).

Los elementos conductores están desarrollados, están preparadas para ser raíces funcionales, lo que no suele ser muy común en el cultivo in vitro, lo cual es un factor importante en la aclimatación ya que las plantas in vitro presentan poca capacidad de retención de agua (Aloísio, 1997), y si son llevadas a su ambiente natural, pueden deshidratarse fácilmente y morir (Suárez, 2011) por lo que si se desarrollan raíces posiblemente funcionales estas van a contrarrestar los efectos de deshidratación de la planta y facilitar su aclimatación (Castillo, 2004).

## CONCLUSIONES

- El método empleado para la desinfección de las yemas de *E. elatior* fue adecuado. A pesar de la alta contaminación que se presentó al inicio (50-85,71%), se logró establecer un método de propagación *in vitro* y obtener plantas aparentemente libres de patógenos.
- El uso de reguladores de crecimiento fue necesario para el establecimiento del cultivo de esta especie.
- En esta investigación, el mayor número de plantas promedio a partir de cultivo *in vitro* de yemas de *E. elatior* se obtuvo en el medio MS2.
- En todos los medios empleados para la multiplicación de esta especie se observaron algunas plantas con raíces. Pero al emplear un medio sin reguladores de crecimiento, se logró un 100% de plantas enraizadas.
- De los dos sustratos probados, la tierra negra, resultó ser el mejor para la aclimatación de plantas *E. elatior* propagadas *in vitro*, obteniéndose 84,62% de sobrevivencia de plantas en vivero.
- Los estudios histológicos sugieren, que la formación de brotes múltiples (macolla) que se apreció en la propagación *in vitro* de *E. elatior*, ocurrió por un proceso de organogénesis directa.
- En los estudios histológicos no se encontraron diferencias anatómicas relevantes entre las hojas de plantas cultivadas *in vitro* y mantenidas *in vitro*, y hojas de plantas cultivadas *in vitro* y mantenidas *ex vitro*, salvo las características propias de las plantas cultivadas *in vitro*. Las características propias de plantas *in vitro*,

cambiaron después de mantener las plantas 6 semanas en condiciones de vivero, desarrollando características anatómicas de plantas de campo.

- Cortes histológicos mostraron, que hay conexión vascular entre la raíz y la yema, sin embargo, no se estudió si la presencia de estas raíces (aparentemente funcionales) marcaron alguna diferencia en los resultados de supervivencia de las plantas en la etapa de aclimatación. Este estudio se recomienda para así averiguar si una etapa de enraizamiento es necesaria o no, para posterior aclimatación.
- La metodología empleada en esta investigación nos permitió establecer un sistema de propagación *in vitro* a partir de yemas laterales de la especie *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith, convirtiéndose este, en un trabajo pionero en esta especie en Venezuela, proporcionando las bases para el desarrollo de múltiples investigaciones en el país y para contribuir con la producción nacional. Las plantas obtenidas en esta investigación ya se les han entregado a los pequeños productores del Jarillo, Edo. Miranda.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelmageed A. H. A., Faridah Q. Z., F. M. A. Norhana1 F. M. A., Julia A. A., Kadir M. A. 2011. Micropropagation of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud explants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(18):4465-4469. <http://www.academicjournals.org/JMPR>
2. Acevedo R. P., Strong M. T. 2005. Monocots and Gymnosperms of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Contributions from the United States National Herbarium*. 52:1-416. <http://botany.si.edu/Antilles/PRFlora/monocots>.
3. Albuquerque E. S. B., Neves L. J. 2004. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt y Smith (Zingiberaceae). *Acta Botanica Brasílica*, Sao Pulo. 18:109-21.
4. Aloisio, X. 1997. Enraizamiento *in vitro* de gemas de *Eucalyptus* multiplicados me alongados. *Revista Scientia Forestalis*. 51:29-26.
5. Andarwulan N, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B, Wijaya H. 2010. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chem*. 121: 1231–1235.
6. Bhattacharya M., Goyal A. K., Mishra T. 2014. *In vitro* regeneration of some lesser known medicinal Zingibers: a review. *Biology of useful plants and microbes*. Editor: Arnab Sen, Narosa Publishing House, New Delhi, India.
7. Brainerd K. y Fuchigami L. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal American Society Horticultural Science*. 106(4):515-518.
8. Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=UY2006005431>

9. Chacon E. 2009. Las plantas invasoras en Costa Rica: Cuáles acciones debemos realizar. *Revista Biocenosis*. 22:31-33.
10. Chan E. W. C., Lim Y. Y., Lim T. Y. 2007. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Leaves and Rhizomes of some Ginger species in Peninsular Malaysia. *Gardens' Bull. Sin.* 59 (1&2): 47-56.
11. Chan E. W. C., Lim Y. Y., Ling S. K., Tan S. P., Lim K. K., Khoo M. G. H. 2009a. Caffeoylquinic acids from leaves of *Etilingera* species (Zingiberaceae). *Food Chem.* 104: 1586–1593.
12. Chan E. W. C., Lim Y. Y., Wong S. K., Lim K. K., Tan S. P., Lianto F. S., Yong M. Y. 2009b. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chem.* 113: 166–172.
13. Chan E. W. C., LIM Y. Y., Tan S. P. 2011a. Standardised herbal extract of chlorogenic acid from leaves of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). *Pharmacognosy Res.* 3(3): 178–184.
14. Chan E. W. C., Ng V. P., Tan V. V., Low Y. Y. 2011b. Antioxidant and Antibacterial Properties of *Alpiniagalanga*, *Curcuma longa*, and *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). *Pharmacognosy Journal.* 3(22): 54-61.
15. Colombo L. A., Assis A. M., Tadeu de Faria R., Roberto S. R. 2010. Establecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de Bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. *Astasciagron.* 32(4):695-700.
16. Coutinho M.; Carvalho E. J. M. 1989. Caracterização das propriedades de alguns substratos para a propagação de mudas. *Bragantia*, Campinas. 14:167-176.

17. Flora of China Editorial Committee, 2014. Flora of China. St. Louis, Missouri and Cambridge, Massachusetts, USA: Missouri Botanical Garden and Harvard University Herbaria. [http://www.efloras.org/flora\\_page.aspx?flora\\_id=2](http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=2)
18. Haleagrahara N., Jackie T., Chakravarthi S., Rao M., Pasupathi T. 2010. Protective effects of *Etilingera elatior* extract on lead acetate induced changes in oxidative biomarkers in bone marrow of rats. *Food Chem Toxicol.* 48: 2688–2694.
19. Hammel B. E., Grayum M. H., Herrera C., Zamora N. 2003. Manual of plants of Costa Rica. Vol. III. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.* 93:1-884.
20. Hanba Y. T., Kogami H., Terashima L. 2002. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in Acer species differing in light demand. *Plant Cell and Environment.* 25:1021-1030.
21. Hoyos F. J. 1999. Plantas Tropicales Ornamentales de Tallo Herbáceo. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas, Venezuela.
22. Ibrahim H., Setyowati F. M. 1999. *Etilingera*. In: Plant Resources of South-East Asia No. 13: Spices. *Leiden, The Netherlands: Backhuys Publisher.* 123-126.
23. Inden, H., T. Asahira and A. Hirano, 1988. Micropropagation of ginger. *Acta de Hortic.* 230:177-184.
24. 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.
25. 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.

26. Kittipanangkul N., Ngamriabsakul C. 2006. Pollen and pollinator limitation of seed initiation in *Etilingera littoralis* (Zingiberaceae) in KlongKlai Basin, Khao Nan National Park, Thailand. *Walailak Journal of Science and Technology*. 3:207-2017.
27. Lins, S. R. O.; Coelho, R. S. B. 2004. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília. 29:332-335.
28. López, M. 1996. Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Tesis Doctoral de la Universidad Complutense de Madrid.
29. Loyola-Vargas V. M., De-la-Peña C., Galaz-Ávalos R. M. y Quiroz-Figueroa F. R. 2008. Chapter 50: Plant Tissue Culture. From: *Molecular Biotechnology Handbook*, 2nd Edition. Edited by: J. M. Walker and R. Rapley © Humana Press, Totowa, NJ.
30. Maciel de Sousa N. 1995. *Horticultura Ornamental Venezolana Análisis Retro y Prospectivo*.  
<http://www.cuft.tec.ve/publicaciones/barquisimeto/umbral/revistas/rev15/docII15.pdf>.
31. Márquez Da Silva J. J. 2007. *Etilingera elatior* (JACK) R. M. SMITH: Propagação *In Vitro*, Anatomia E Obtenção De Protoplastos. Tesis de Postgrado. Universidad Federal de Lavras. Minas Gerais, Brasil.
32. Melo E. C. A., Poltronieri M. C., Lemos O. F., Amaral L. M. S., Alves S. A. O. 2004. Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) para o processo de Micropropagação de Bastão-do-Imperador (*Etilingera elatior*). Embrapa Amazonia Oriental - Artículo en actas de congresos (ALICE). <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/575606>.
33. Morel, G. y Wetmore, R. M. 1951. Fern callus tissue culture. *American Journal of Botany*. 38:141-143.

34. Murashige, T. y Skoog F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
35. Oliveira J. F., Pinto de Lemos E. E., Rezende L. P., Ferreira V. M., Medeiros dos Santos D., Holanda M. L. 2009. Germinação de Embriões e Multiplicação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith. *Ciencia Agricola.* 10(1):31-38.
36. Pierik, R. L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, España.
37. Ramos Amaya J. E. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Tesis de Postgrado. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá, Colombia.
38. Rescarolli C. L. S. y Zaffari G. R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu.* N2 11:190-195.
39. Roca, W., Mroginski, L. 1991. Establecimiento de un laboratorio de tejidos vegetales. En: Roca, W. y Mroginski, L. A. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia, pp 1-17.
40. Sakai S., Kawakita A., Ooi K., Inoue T. 2013. Variation in the strength of association among pollination systems and floral traits: evolutionary changes in the floral traits of Bornean gingers (Zingiberaceae). *American Journal of Botany.* 100(3):546-555. <http://www.amjbot.org/content/100/3/546.full>
41. Schluter U.; Muschak M.; Berger D.; Altmann T. 2003. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (*sdd1-1*) under different light regimes. *Journal of Experimental Botany.* 54: 867–874.

42. Seran T. H., Hirimburegama K. y Gunasekare M. T. K. 2005. Encapsulation of embryonic axes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (tea) and subsequent in vitro germination. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 80:154-158.
43. Sharma T. R. y Singh B. M. (1995) in vitro microrhizome production in *Zingiber officinale* Rosc. *Plant Cell Rep.* 15:274-277.
44. Suárez, F. (2011). Micropropagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
45. Tan J., Nagaraja H., Srikumar C. 2011. Antioxidant effects of *Etilingera elatior* flower extract against lead acetate - induced perturbations in free radical scavenging enzymes and lipid peroxidation in rats. *BMC Research Notes.* 4:67. <http://www.biomedcentral.com/sci-hub.org/1756-0500/4/67/>.
46. Villalobos, V. y Thorpe, T. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. y Mroginski, L.A. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia, pp 127-141.
47. Yunus M. F., Aziz M. A., Kadir M. A., Rashid A. A. 2011. In vitro propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). *Scientia Horticulturae* 135 145–150. <http://www.sciencedirect.com/sci-hub.org/science/article/pii/S0304423811006480>
48. Yunus M. F., Aziz M. A., Kadir M. A., Daud S. K., Rashid A. A. 2013. In vitro mutagenesis of *Etilingera elatior* (Jack) and early detection of mutation using RAPD markers. *Turk J Biol.* (2013) 37: 716-725.
49. Wijekoon M. M. J. O., Bhat R., Karim A. A. 2011a. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etilingera elatior* Jack.) inflorescence. *J Food Compos Anal.* 24: 615–619.

**Consultas en línea:**

50. Missouri Botanical Garden, 2014. Tropicosdatabase. St. Louis, Missouri, USA: Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/>. [Consulta: 20 de enero del 2015]
51. PROTA, 2014. PROTA4U web database. Wageningen, Netherlands: Plant Resources of Tropical Africa. <http://www.prota4u.info>
52. Missouri Botanical Garden. 12 Feb 2015 <http://www.tropicos.org/Name/50068776>. [Consulta: 20 de enero del 2015]
53. Missouri Botanical Garden. 12 Feb 2015 <http://www.tropicos.org/Name/50054153>. [Consulta: 20 de enero del 2015]
54. Venezuela al día. <http://www.venezuelaaldia.com/2012/11/venezuela-exporto-52-tipos-de-flores-exoticas-a-rusia/> [Consulta: 8 de febrero del 2015]