

Propagación in vitro de *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón a partir de meristemos florales

In vitro propagation of *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón from flowering buds

Marta Leonor Marulanda-Ángel*, Liliana Isaza-Valencia†, y Lina María Londoño-Giraldo‡

Grupo de Investigación en Biodiversidad y Biotecnología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira. A.A.097. Pereira, Risaralda, Colombia. Teléfono: (6) 3215995. *Autor para correspondencia: ubioteve@utp.edu.co; †lilisaza@utp.edu.co; ‡limalon@gmail.com

Rec.: 16.05.11 Acept.: 20.09.11

Resumen

Se desarrolló un protocolo de propagación in vitro a partir de meristemos florales para *Heliconia bihai* cv. Lobster Salmón. Para el efecto se establecieron 250 yemas florales en diferentes tiempos utilizando NaClO al 1% durante 20 min. El medio de establecimiento Murashige y Skoog con mejores resultados fue BAP (2 mg/lit), AIA (1 mg/lit) y 0.1 g/lit de L-cisteína. La mayor producción de brotes en multiplicación se obtuvo con 6 mg/lit de BAP y con un subcultivo posterior en medio con 2 mg/lit de BAP y 0.5 mg/lit de AIA, alcanzando una tasa de multiplicación de tres nuevas yemas. El enraizamiento de las plántulas in vitro se logró con 1.3 mg/lit de AIA. La aclimatación en vivero fue 92% de supervivencia. Se realizó un análisis de varianza (Anova) y un test de Tukey para las variables evaluadas las cuales mostraron diferencias estadísticas en cada fase. La propagación in vitro de heliconias a partir de yemas florales requiere mayor tiempo en la fase de establecimiento y multiplicación, no obstante permite mayores porcentajes de supervivencia y una menor contaminación, ofreciendo material de siembra de diferentes especies de esta planta de interés comercial.

Palabras clave: AIA, BAP, *Heliconia bihai*, propagación in vitro, yemas florales.

Abstract

A protocol for in vitro propagation of *Heliconia bihai* cv. Lobster Salmón was developed using flowering buds as initial explants. 250 flowering buds were established in different assays with NaClO at 1% during 20 minutes. The establishment in Murashige & Skoog's medium with BAP (2mg/L), AIA (1 mg/L) and L-cystein (0.1 g/L) showed the best results. Shoot multiplication was obtained with BAP (6 mg/L) with a subsequent subculture in a medium with BAP (2 mg/L) and AIA (0.5 mg/L), reaching multiplication rates of 3.0 new shoots. Rooting was achieved with AIA 1.3 mg/L. The survival rate during greenhouse acclimatization was 92%. Analysis of variance (ANOVA) and Turkey's test were realized for each of the variables evaluated that showed statistical differences in all stages. The in vitro propagation of heliconia with flowering buds, requires longer periods for establishment and multiplication stages but allows higher levels of survival for initial explants and lower contamination, offering an alternative to obtain important amounts of planting material of different heliconia species of commercial interest.

Key words: AIA, BAP, flowering buds, *Heliconia bihai*, in vitro propagation.

Introducción

La saturación del mercado mundial de plantas ornamentales tradicionales ha impulsado un creciente interés por parte de los consumidores extranjeros a comercializar especies tropicales (Castro y Graziano, 1997). En este contexto, se destacan las especies del género *Heliconia* L. Su excepcional potencial de comercialización en el mercado interno y externo se debe a la apariencia exótica de la inflorescencia y la gran variación en formas y colores; la producción continua de flores y su calidad y durabilidad después del corte, son características promisorias no sólo para la producción de flor cortada sino también para ornato en parques y jardines (Santos *et al.*, 2006), así como cultivos para producir semillas certificadas con fines de exportación (Jerez, 2007).

La propagación comercial de las heliconias es generalmente vegetativa, a través de rizomas, sin embargo, este método favorece la diseminación y acumulación de agentes patógenos (hongos, bacterias, virus y nemátodos) causantes de importantes enfermedades transmisibles entre cultivares, dificultando la manifestación del verdadero potencial productivo (Santos *et al.*, 2006); además es común en este método de propagación observar inconformidades entre los cultivadores por confusiones en el tipo de material adquirido.

Por otro lado, la propagación a través de semillas presenta desventajas en comparación con la propagación vía rizomas, entre ellas, un menor valor comercial y un manejo más difícil para la obtención de plantas, además las semillas presentan recalcitrancia debido a restricciones mecánicas por la morfología del fruto (Santos *et al.*, 2006). En este sentido, la micropropagación presenta una alternativa viable para la producción a gran escala de plantas de heliconia con calidad genética y fitosanitaria, más aun en la actualidad cuando ha incrementado la importancia de las especies ornamentales y se ha creado la necesidad de establecer un protocolo eficiente para la regeneración de

plantas usando técnicas de cultivo de tejidos, lo cual no sólo facilita el movimiento de propágulos libres de enfermedades entre países, sino que también sirve como fuente potencial de nuevas variedades (Goh *et al.*, 1995).

La oferta comercial de heliconias micropropagadas es escasa y restringida a algunas especies. La mayoría de estudios se centran en la propagación de *Heliconia psittacorum* utilizando yemas terminales y axilares (Nathan *et al.*, 1992). Sin embargo, en Colombia algunos grupos de investigación han encontrado resultados promisorios en la micropropagación de rizomas de heliconias silvestres y cultivares (Marulanda e Isaza, 2004). Según Castro y Graziano (1997) *H. bihai* abarca una gran cantidad de cultivares y su flor es generalmente usada para corte o paisajismo, posee hábito musoide, con inflorescencias erectas y brácteas en un único plano. *Heliconia bihai* cv. Lobster Salmón presenta una inflorescencia glabra, con espaldas de color naranja y con tres cuartas partes de la margen de color amarillo y verde (Foto 1a). El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo¹ de propagación masiva de *H. bihai* cv. Lobster Salmón, para lo cual se evaluaron diferentes medios de cultivo en el establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación en vivero.

Materiales y métodos

El material para el establecimiento in vitro fue recolectado en varias localidades del Valle del Cauca y Risaralda. La especie fue elegida con la ayuda de agricultores de la zona, teniendo en cuenta las heliconias de mayor comercialización. Se evaluaron meristemos florales obtenidos de inflorescencias con el menor número de brácteas circinales abiertas. Las puntas florales fueron sometidas a desinfección en alcohol etílico a 70% durante 5 min, seguido de una solución comercial de NaClO (1%) durante 20 min y una posterior extracción del meristemo floral en cabina de flujo laminar. Las variables cuantificadas en la fase de desinfección fueron porcentaje de

1 Este protocolo de propagación in vitro a través de meristemo floral de *Heliconia bihai* Cv. Lobster Salmón, ha sido solicitado como patente de invención.

contaminación por hongos y bacterias y número de explantes necrosados, fenolizados y supervivencia. Los explantes fueron establecidos en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con Gelrite® (2.7 g/lt) y sacarosa (30 g/lt). Se evaluaron diferentes concentraciones de 6-benzylaminopurina (BAP) y Acido Indol Acético (AIA) (ver Cuadro 1). El pH se ajustó a 5.8, los cultivos se evaluaron semanalmente y con la misma frecuencia se renovó el medio de cultivo, la limpieza del explante se hizo en la primera, cuarta y octava semanas de establecimiento, determinando porcentajes de contaminación (hongos y bacterias), oxidación, supervivencia, crecimiento y desarrollo.

Para determinar la mejor tasa de multiplicación y crecimiento, los explantes establecidos con presencia de brotes, coloración verdosa y en buen estado fueron transferidos a un medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP (0.5, 1, 2, 3.5, 4.5 y 6 mg/lt) cada 6 y 8 semanas. Finalmente, los explantes fueron transferidos a un segundo medio MS para multiplicación con BAP 2 mg/lt y 0.5 mg/lt de AIA con cambio de medio cada mes.

Para el enraizamiento, las plántulas fueron transferidas a medio de cultivo MS a la mitad de concentración de sales con 30 g/lt de sacarosa y 2.7 g/lt de Gelrite®. Se evaluaron tres concentraciones hormonales: AIA (0.7 y 1.3 mg/lt) y Ácido Indol Butírico (AIB) (1 mg/lt).

En condiciones de vivero, las plantas fueron sembradas en bandejas de polipropileno de 50 alvéolos, utilizando como sustrato

arena previamente esterilizada en autoclave a 121 °C durante 35 min y el sustrato comercial Forzamid® en proporciones 1:1 y 3:1. Además, al sustrato se le adicionó trichoderma y micorriza. Las plantas se cubrieron con plástico durante las primeras cuatro semanas para prevenir la deshidratación.

Con las variables evaluadas en los diferentes medios en la fases de establecimiento (número de explantes necrosados, fenolizados y supervivencia), multiplicación (número de brotes por explante) y enraizamiento (aparición de raíces y crecimiento del explante), se hizo un análisis de varianza de clasificación simple modelo de efecto fijo (Anova) y test de Tukey, si se encontraban diferencias estadísticas, para el efecto se utilizó el software Infostat versión 2004.

Resultados y discusión

El 13.6% de las 250 yemas florales de *H. bihai* cv. Lobster Salmón establecidas presentaron contaminación, principalmente bacteriana. La fenolización de las yemas fue de 3.5%, un valor bajo que influyó positivamente en la supervivencia, la cual alcanzó hasta 70% en el medio IC (Cuadro 2). Varios trabajos en cultivo de tejidos en zingiberales, específicamente en la familia Heliconiaceae, se realizan utilizando como material de partida rizomas o ápices caulinares (Nathan *et al.*, 1992; Marulanda e Isaza, 2004; Rodrigues, 2005). Sin embargo, el gran impedimento de la micropropagación con este material son los problemas de contaminación endófito,

Cuadro 1. Concentraciones de 6-benzylaminopurina (BAP) y Acido Indol Acético (AIA) utilizadas en fase de establecimiento de yemas florales *H. bihai* cv. Lobster Salmón.

Medio	Concentración BAP (mg/lt)	Concentración AIA (mg/lt)
IA	2.0	0.5
IB	4.0	0.5
IC	6.0	0.5
IIA	2.0	1.0
IIB	4.0	1.0
IIC	6.0	1.0
3BA	3.0	0
6BA	6.0	0
9BA	9.0	0

Cuadro 2. Evaluación de medios de cultivo para el establecimiento de yemas florales de *H. bihai* cv. Lobster Salmón.

Medio	Fenolización	Supervivencia (%)	Crecimiento y cambio de color	Brotos de yemas
IA	Alta	60	NO	NO
IB	Baja	40	Sólo cambio de color	SI
IC	Baja	16	SI	NO
IIA	Baja	50	SI	SI
IIB	Baja	33	Sólo cambio de color	NO
IIC	Baja	70	SI	NO
3BA	Alta	10	Sólo cambio de color	NO
6BA	Alta	0	Sólo cambio de color	NO
9BA	Muy Alta	0	NO	NO

lo que limita el desarrollo del explante (Atehortúa *et al.*, 1999; Días y Rodrigues, 2001). En meristemos florales, Urrea y Atehortúa (1994) encontraron porcentajes de contaminación entre 10% y 15% en *H. wagneriana*, *H. platystachys*, *H. bihai*, *H. burleana* y *H. rostrata*, además de 80% de contaminación de *H. marginata* y *H. latispatha* desinfectando las yemas con NaClO (2%) durante 15 min. En este estudio, el protocolo de desinfección para las yemas florales de *H. bihai* cv. Lobster Salmón incluyó el uso de NaClO (1%) durante 20 min, que permitió obtener niveles de contaminación menores que 15% y un porcentaje de supervivencia superior a 80%.

El uso de meristemos florales para el desarrollo de un protocolo de propagación masiva en *H. bihai* cv. Lobster Salmón ofrece una mayor tasa de supervivencia, si se compara con la utilización de rizomas o ápices caulinares como material de partida. Nakano (2008) obtuvo un porcentaje máximo de supervivencia, con ápices caulinares de 21% en *H. bihai* cv. Peach Pink y de 40% en *H. ortotricha*.

En la fase de establecimiento de *H. bihai* cv. Lobster Salmón, la combinación de BAP y AIA en el medio de cultivo resultó en una mejor respuesta morfogénica y maduración de los meristemos florales (Cuadro 2). Las diferencias ($P < 0.05$) se obtuvieron en el medio IIA, donde se observó un mayor crecimiento de los explantes y brotes de yemas nuevas

entre la sexta y la octava semanas (Foto 1b). El BAP en ausencia de AIA mostró resultados inferiores de supervivencia y vigor de los explantes, así mismo, concentraciones muy altas de BAP provocaron en los explantes una rápida fenolización y necrosis (Cuadro 2). Urrea y Atehortúa (1994) utilizaron 7 mg/lt de BAP tanto en la fase de establecimiento de los explantes de *H. latispatha* y *H. wagneriana* como en la de multiplicación, sin embargo, en este estudio se observa que el uso de BAP a concentraciones mayores que 3 mg/lt en explantes que aún no poseen brotes definidos influye altamente en los porcentajes de necrosis de la especie estudiada, probablemente debido a una intoxicación de los explantes o un desbalance con las hormonas endógenas. El uso de la combinación auxina – citoquinina en la fase de establecimiento ha sido descrito igualmente por Sosa-Rodríguez (2004) en *H. standleyi*. Marulanda e Isaza (2004) encontraron reverdecimiento de los rizomas entre la segunda y tercera semana de establecimiento y aparición de brotes después de la sexta semana. Nathan *et al.* (1992) describen reverdecimiento de rizomas de *H. psittacorum* entre los 7 y 14 días de establecimiento, mientras que en este estudio los explantes en medio IIA presentaron un aumento de tamaño y reverdecimiento entre la sexta y séptima semanas de siembra (Foto 1c) y la aparición de brotes definidos ocurrió después de la octava semana (Foto 1d).

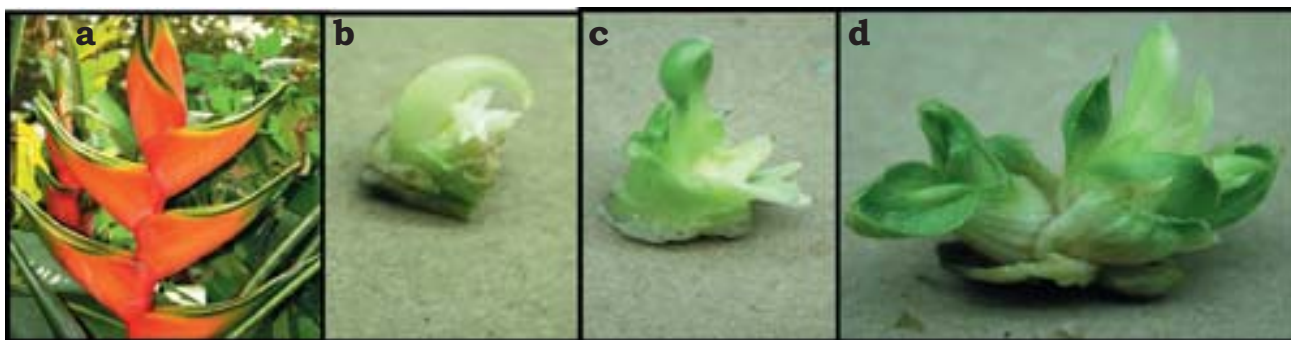


Foto 1. Establecimiento de *H. bihai* cv. Lobster salmón. **a.** Inflorescencia. **b.** Yema floral a las seis semanas de establecimiento. **c.** Explante a las siete semanas de establecimiento. **d.** Aparición de brotes definidos a las nueve semanas de establecimiento en medio IIA.

En la fase de multiplicación, el material subcultivado en medio que contiene BAP entre 0.5 y 4.5mg/lt mostró crecimiento de las yemas, pero sin aparición de brotes (Foto 2a). Por el contrario, el medio de cultivo con 6 mg/lt de BAP presentó diferencias ($P < 0.05$) para brotación de yemas, con una tasa de multiplicación de dos yemas y una longitud menor que 0.5 cm (Foto 2a y Cuadro 3). Nathan *et al.* (1992) encontraron que la mejor tasa de multiplicación se presenta seis semanas después de la transferencia de los brotes a un medio de multiplicación que contenía 2.25 mg/lt de BAP.

Debido a la naturaleza del explante utilizado, en el presente trabajo la tasa de multiplicación aumentó a valores mayores que dos yemas sólo ocho semanas después de subcultivar en medio con 6 mg/lt de BAP. Nathan *et al.* (1992) afirman que la adición de BAP entre 4.5 y 9 mg/lt al medio de cultivo por un tiempo prolongado, induce brotes de *H. psittacorum* más pequeños y compactos, e

inhibe su crecimiento y posterior desarrollo, una respuesta similar a la encontrada por los mismos autores con *H. rostrata*.

La multiplicación de brotes de *H. bihai* cv. Lobster Salmón a partir de meristemos florales requiere, como mínimo, ocho semanas en un medio de cultivo que contenga 6 mg/lt de BAP y un subcultivo posterior en un medio de multiplicación con BAP (2 mg/lt) y AIA (0.5 mg/lt), con el fin de promover el crecimiento de los brotes (Foto 2b y Cuadro 3). Estas combinaciones auxina-citoquinina también fueron evaluadas por Talukdar *et al.* (2002) quienes encontraron una mayor tasa de multiplicación en explantes de *H. psittacorum* transferidos a un medio suplementado con AIA (0.25 mg/lt) y BAP (2.0 mg/lt). Por su parte, Isaza-Valencia (2004) encontró que la aplicación de 4 y 5 mg/lt de BAP no mostró una respuesta favorable en el crecimiento y producción de brotes, sin embargo una combinación de 2 mg/lt de BAP y 0.25 mg/lt de

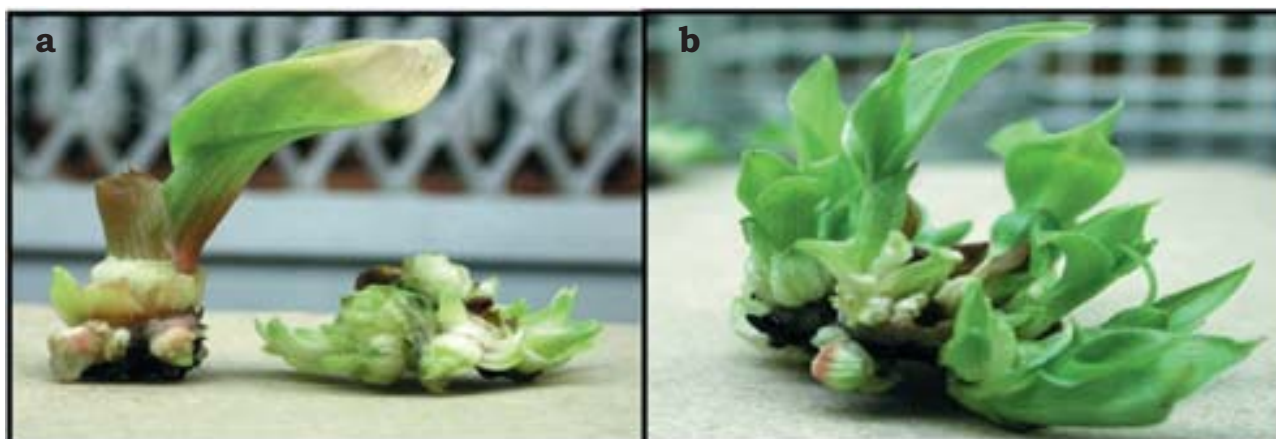


Foto 2. Multiplicación de explantes y producción de brotes en *H. bihai* cv. Lobster Salmón **a.** Primer medio de multiplicación utilizando 6 mg/lt de BAP. **b.** Segundo medio de multiplicación utilizando BAP 2 mg/lt y AIA 0.5 mg/lt.

Cuadro 3. Tasa de multiplicación de *H. bihai* cv. Lobster Salmón en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en fase de multiplicación.

Concentración hormonal (mg/lt)	Tasa de multiplicación	Altura promedio de los brotes (cm)
BAP 0.5	1	3.8
BAP 1.5	1	3.8
BAP 2.5	1	3.4
BAP 3.5	1	3.0
BAP 4.5	1	3.1
BAP 6	2	0.9
BAP 2.0 + AIA 0.5	3	3.2

AIA favoreció el crecimiento de los explantes hasta 4 y 5 cm y tasas de multiplicación máxima de 2.5 yemas.

La formación y crecimiento de las raíces de las plántulas de *H. bihai* cv. Lobster Salmón fue rápida cuando se aplicó AIA a razón de 1.3 mg/lt (Foto 3a). Una respuesta similar encontraron Cockburn (1996) en trabajos in vitro con *H. psittacorum* Var. Golden Torch cuando utilizó AIA (1 mg/lt) y Bora y Paswan (2003) utilizando medio MS suplementado con AIA (0.75 mg/lt), no obstante Ulisses et al. (2010) observaron la mayor tasa de enraizamiento de *H. bihai* cv. Lobster Claw Two cuando no aplicaron hormonas al medio.

Las plántulas con inducción de enraizamiento in vitro mostraron un mayor

crecimiento y producción de hojas nuevas en condiciones de invernadero que aquellas sembradas directamente en sustrato sin raíces. Por el contrario, Rodrigues *et al.* (2005) sugieren omitir la fase de enraizamiento in vitro para la adaptación en vivero de plántulas de *H. bihai* cv. Lobster Claw I debido a que las raíces previamente existentes no son funcionales en este ambiente.

La fase de vivero es una de las más críticas en un protocolo de propagación in vitro. En este estudio se obtuvo una tasa de supervivencia de 92% y un crecimiento, promedio, de 1 cm por semana con formación de hojas nuevas cada 10 - 13 días (Fotos 3b y 3c) y un desarrollo óptimo entre las semanas 5 y 6 de aclimatación en vivero (Foto 3d).



Foto 3. Fases de enraizamiento y vivero de *H. bihai* cv. Lobster salmón. **a.** Formación de raíces en plántulas de heliconia con 2 semanas de aclimatación en vivero. **b.** Plántulas de heliconia en bandejas de polipropileno. **c.** Plántulas de heliconia a raíz desnuda. **d.** Plántulas de heliconia en bolsa con 5 semanas de aclimatación en vivero.

Conclusiones

La mejor tasa de propagación in vitro de yemas florales de *H. bihai* cv. Lobster Salmón se obtuvo con la combinación de BAP (2mg/lt) y AIA (1 mg/lt) (medio IIA). Este tratamiento produjo la mayor tasa de crecimiento, cambio de color y brotación entre la sexta y octava semanas luego del establecimiento.

Después de seis semanas en un medio de cultivo con BAP (6 mg/lt) y 4 semanas en un segundo medio de cultivo con BAP (2 mg/lt) y AIA (0.5 mg/lt) se alcanzó una tasa de multiplicación de 3 yemas nuevas por cada explante.

El enraizamiento in vitro de plántulas se logra utilizando AIA (1.3 mg/lt) en el medio de cultivo y sustrato arena - Forzamid® en proporción 3:1, lo cual permitió la aclimatación exitosa de las plántulas en la fase de vivero.

El uso de meristemas florales como explante requiere de un estímulo continuo y prolongado de hormonas para lograr la misma respuesta morfogénica que se obtiene a través de rizomas, siendo un proceso que demanda mayor tiempo en la fase de establecimiento.

Agradecimientos

Las autoras expresan sus agradecimientos al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, a la Gobernación de Risaralda y a la Universidad Tecnológica de Pereira por la financiación del presente proyecto. A todos los floricultores que generosamente han contribuido al desarrollo de la presente investigación.

Referencias

- Atehortua, L.; Urrea, A. L.; Gel, U.; Mora, B.; Valencia, C.; y Corrales, M. 1999. Heliconia tissue culture. Bull. Heliconia Soc. Intern. 9:16 - 17.
- Bora, S. y Paswan, L. 2003. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* through axillary bud. J. Ornam. Hort. 6(1):11 - 15.
- Castro, C. E. F. y Graziano, T. T. 1997. Espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae) no Brasil. Rev. Brasil. Hortic. Ornam. 3:15 - 28.
- Cockburn, B. V. 1996. Studies on the in vitro propagation of *Heliconia* spp. Thesis (M.phil). Dep. of Plant Science. The University of the West Indies, Trinidad and Tobago, Agriculture and Life Sciences Division. 158 p.
- Días, M. A. S. y Rodrigues, P. H. V. 2001. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo in vitro de *Heliconia bihai* (Heliconiaceae). Rev. Bras. Hortic. Ornam. 7:165 - 168.
- Goh, C. J.; Nathan, M. J.; y Kumar, P. P. 1995. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. Holanda. Sci. Hortic. 62:113 - 120.
- Infostat. 2004. Infostat, versión 2004. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Isaza-Valencia, L. 2004. Desarrollo de un protocolo de propagación in vitro de heliconias. Informe final Joven investigador Colciencias. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales, Laboratorio de Biotecnología Vegetal.
- Jerez, E. 2007. El cultivo de las heliconias. Cultivos Tropicales 28(1):29 - 35.
- Marulanda, M. L. e Isaza, L. 2004. Establecimiento in vitro de heliconias con fines de producción masiva. Sci. Tech. 10:(26).
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473 - 497.
- Nakano, V. A. 2008. Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes. Dissertação (Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. 81p.
- Nathan, M. J.; Goh, C. J.; y Kumar, P. P. 1992. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. HortScience 27(5):450 - 452.
- Rodrigues, P. H. V. 2005. In vitro establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). Piracicaba, Braz. Sci. Agric. 62(1):69 - 71.
- Rodrigues, P. H. V.; Pereira Lima, A. M. L.; Ambrosano, G. M. B.; y Dutra, M. F. B. 2005. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. Piracicaba, Braz. Sci. Agric. 62(3):299 - 301.
- Santos, M. R. A.; Timbó, A. L. O.; Carvalho, A. C. P. P.; y Jmorais, J. P. S. 2006. Estudo de adubos e substratos orgânicos no desenvolvimento de mudas micropropagadas de helicônia. Hort. Brasil. 24:273 - 278.
- Sosa-Rodríguez, F. M. 2004. Propagación in vitro de *Heliconia standleyi* Macbride. Tesis en Opción Al Título Académico De Master En Ciencias Agríco-

- las. Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez. Cienfuegos – Cuba.
- Talukdar, M. C.; Lalrinawmi, C.; y Singh, S. 2002. In vitro propagation of *Heliconia*. J. Ornam.Hortic. (New Series) 5(1):45 - 46.
- Ulisses, C.; Melo-de-Pinna, G. F. A.; Willadino, L.; Albuquerque, C. C.; y Camara, T. R. 2010. In vitro propagation of *Heliconia bihai* (L.) L. from zygotic embryos. Acta Bot. Bras. 24(1):184 - 192.
- Urrea, A. I. y Atehortua, L. 1994. Propagación in vitro de algunas especies silvestres del género *Heliconia* del Departamento de Antioquia. En: Memorias. Primer Congreso Nacional sobre Biodiversidad. Cali, Colombia.