

## Propagación *in vitro* de *Heliconia standleyi* Macbride

Flora Margarita Sosa Rodríguez<sup>1\*</sup>, Rafaela Soto Ortiz<sup>1</sup>, Pablo Machado Armas<sup>2</sup>, Ricardo Hernández Pérez<sup>1</sup>

\*Autor para correspondencia

<sup>1</sup>Cetas/ Universidad de Cienfuegos. Carretera Cuatro Caminos, km 2. Cienfuegos. Cuba. e. mail: floras@ucf.edu.co.cu

<sup>2</sup>Estación Experimental de la Caña de Azúcar. Ranchuelo. Villa Clara. Cuba

### RESUMEN

La propagación de *Heliconia* sp. en Cuba está concebida mediante la aplicación de los métodos tradicionales, los cuales se basan fundamentalmente en la siembra o plantación de rizomas. Contar con un protocolo para su cultivo *in vitro* permitiría incrementar la producción y la calidad de las plantas obtenidas. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *H. standleyi*. Se realizaron experimentos en cada una de las fases desde el establecimiento hasta la aclimatización. Se logró la propagación *in vitro* de *H. standleyi*. Para el establecimiento *in vitro* se empleó NaOCl al 2% y el tiempo de desinfección (20 min), así como el estado líquido del medio de cultivo para la fase de establecimiento. Al emplear 2.0 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP y 0.65 mg.l<sup>-1</sup> AIA, en la fase de multiplicación con medio de cultivo semisólido, se logró obtener un coeficiente de multiplicación de 4.6. Se demostró que los explantes deben ser mayores de 3.0 cm para pasar a la fase de enraizamiento. Uno de los factores determinantes en la fase de aclimatización para lograr plantas con mayor supervivencia fue la altura inicial de los explantes (mayores de 5.0 cm) para poder enviarse al campo posterior a los 45 días de cultivo.

Palabras clave: aclimatización, micropropagación

### ABSTRACT

The propagation of *Heliconia* sp. in Cuba is conceived by applying traditional methods, which are mainly based on sowing or planting rhizomes. Having a protocol for the *in vitro* culture would increase the yield and quality of the plants obtained. The aim of this study was to establish a protocol for *in vitro* propagation of *H. standleyi*. Experiments were conducted in each of the stages from establishment to acclimatization. The *in vitro* propagation of *H. standleyi* was achieved. For *in vitro* establishment, 2% of sodium hypochlorite, 20 min of disinfection and liquid culture medium were used. When using 2.0 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP and 0.65 mg.l<sup>-1</sup> IAA, in the multiplication stage in semisolid culture medium, a 4.6 multiplication coefficient was obtained. It was demonstrated that explants should be higher than 3.0 cm to be transferred to rooting stage. A determining factor in the acclimatization stage to achieve a greater plant survival was the initial height of the explants (higher than 5.0 cm) to be sent to field after 45 days of culture.

Key words: acclimatization, micropropagation

### INTRODUCCIÓN

La función básica de la horticultura ornamental radica en la satisfacción de las necesidades estéticas del hombre. Hoy esta se considera uno de los negocios más atractivos ya que puede proporcionar elevados ingresos por unidad de superficie (Borris, 1995).

Durante las décadas recientes ha habido un gran aumento en la cantidad de cultivos de flores de corte, y en las diversas maneras de producirlas. Un ejemplo de estos cultivos lo constituye *Heliconia* sp.

En Cuba, el volumen y la calidad de la producción se ha venido mejorando desde el año 1967 y dentro de la diversidad de flores que se producen y se comercializan en el país las heliconias ocupan un lugar importante pues sus brácteas son muy llamativas por sus vibrantes colores y las inusitadas formas de las diferentes especies y selecciones, lo

que hace populares a estas plantas. Sin embargo, los volúmenes de producción que se logran no satisfacen las demandas cada vez más crecientes del mercado.

La propagación de *Heliconia* sp. en Cuba está concebida mediante la aplicación de los métodos tradicionales, los cuales se basan fundamentalmente en la siembra o plantación de rizomas.

Por otro lado, la propagación agámica por división aunque garantiza al cultivador la homogeneidad de las plantas producidas y por lo tanto un crecimiento, floración y calidad uniforme; no garantiza los volúmenes necesarios de plantas para la plantación de las áreas dedicadas a este cultivo. No obstante, es el método más utilizado. La propagación *in vitro* de esta especie ha sido escasamente abordada por lo que se encuentran muy pocos trabajos realizados con esta temática en la literatura científica (Divo *et al.*, 1994; Olivera, 2000).

Las ventajas de este método, entre otras, radican en que permite obtener gran número de plantas en un periodo de tiempo relativamente corto, se logra una alta homogeneidad en las características fenotípicas y genéticas de la plantación (Krikorian, 1991), se elimina la mayoría de los patógenos que afectan el cultivo en las condiciones naturales (Madriz *et al.*, 1989) y el rejuvenecimiento fisiológico del material vegetal por el efecto del cultivo de tejidos incrementa la calidad de las flores (Maciel, 1999). Contar con un protocolo para el cultivo *in vitro* permitiría incrementar la producción y la calidad de las plantas obtenidas. El objetivo de este fue establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *H. standleyi*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron rizomas de *H. standleyi* de plantas donantes de la Biofábrica de Villa Clara. Estos fueron sembrados en macetas con un sustrato formado por una mezcla de suelo (60%), estiércol vacuno con dos años de descomposición (30%) y zeolita (10%), la cual fue desinfectada con vapor durante 30 minutos. Se realizaron aspersiones con una frecuencia semanal de fungicidas (Zineb 75% PH, Oxicloruro de cobre 50% PH, Maneb 80%) en dosis de 5 g.l<sup>-1</sup> durante 30 días antes del establecimiento *in vitro*.

Para los experimentos realizados en la fase de multiplicación y en la fase de enraizamiento, el material vegetal utilizado se encontraba en el tercer subcultivo.

Todos los experimentos realizados *in vitro* fueron incubados en cámaras con luz solar y los explantes fueron sometidos a una densidad de flujo fotosintético de 50.0 – 62.5  $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 26 ± 2 °C y 11 horas luz por día.

La aclimatización de las plantas se realizó en contenedores de polietileno de 70 alvéolos con una capacidad de 132 cm<sup>3</sup> cada uno. El riego se efectuó mediante la técnica de riego localizado con microaspersor aéreo con una frecuencia de tres riegos en los primeros 15 días y dos en los restantes, con una duración de tres a cinco minutos. Las plantas crecieron en condiciones de luminosidad reducida al 70% mediante una malla plástica de sombreo (zarán) y rafia plastificada en la parte superior.

### Procesamiento estadístico de los datos

En la totalidad de los experimentos se aplicó un diseño totalmente al azar, para la lectura y la evaluación de las variables, por considerarse homogéneas las condiciones del cultivo dentro de

las cámaras de crecimiento y como única fuente de variación los tratamientos. El procesamiento estadístico de los datos en las diferentes variables y fases experimentales consistió en el análisis de varianza de clasificación simple y unifactorial según los casos de variables continuas, previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad. La comparación entre tratamientos se efectuó según ANOVA por la dística de Duncan y de dos tratamientos según la LSD. El número de réplicas utilizadas en cada experimento *in vitro* fue de quince frascos y para el área de aclimatización fue de veinticinco plantas. Todos los análisis estadísticos se efectuaron en el programa SPSS (2006).

### Desinfección y establecimiento *in vitro*

Para la desinfección del material vegetal este se sometió a la acción de desinfectantes y se redujo a su tamaño final, siguiendo los pasos siguientes:

- Corte de los brotes hasta aproximadamente de 3.0 cm. de pseudotallo y 1.0 cm de rizoma. Lavado con abundante agua y cepillo.

- Lavado con detergente al 1% durante cinco minutos y enjuague con abundante agua.

- Inmersión de los brotes en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) y enjuague con agua estéril, tres veces. Se conservaron en agua hasta la siembra. En este paso se determinó el efecto de tres concentraciones del desinfectante (1.0, 2.0 y 3.0%) sobre el establecimiento *in vitro* de los brotes.

- Posteriormente, en condiciones asépticas se redujo el tamaño de los explantes hasta 0.5–0.8 mm. Estos incluían el meristemo apical con uno o dos primordios foliares.

- Establecimiento *in vitro* en medio de cultivo líquido con soporte de papel de filtro. El medio de cultivo incluyó las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina y 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (6-BAP).

Se realizaron observaciones semanales hasta 40 días después del establecimiento. Se cuantificaron los explantes con presencia de contaminantes microbianos y se determinó la calidad de la brotación según Isaza (2004).

### Efecto del estado físico del medio de cultivo

Se probó la influencia del estado físico del medio semisólido y líquido con soporte de papel de filtro, en el establecimiento *in vitro*. Se realizaron evaluaciones semanales hasta los 30 días y como criterio de evaluación se tuvieron en cuenta el

número de explantes contaminados con microorganismos, de color verde y muerto. El medio de cultivo utilizado fue el mismo descrito anteriormente.

### Multiplicación

#### Efecto de 6-BAP y AIA

Partiendo de la composición de distintos medios de cultivo recomendados para la multiplicación de otras plantas se determinó el efecto del 6-BAP y el ácido indol acético (AIA) en la multiplicación de *H. standleyi*. De cada regulador del crecimiento se emplearon tres concentraciones que se combinaron para formar 12 tratamientos (Tabla 1).

Se realizaron evaluaciones semanales hasta 30 días para el conteo de brotes, altura (cm), coeficiente de multiplicación y número de hojas por explante con el objetivo de seleccionar las mejores combinaciones de reguladores del crecimiento para la multiplicación de esta especie.

El coeficiente de multiplicación se calculó como:

$$CM = \frac{\text{Número de explantes obtenidos en el frasco de cultivo}}{\text{Número de explantes adicionados al frasco de cultivo}}$$

#### Efecto del estado físico del medio de cultivo

Se determinó el efecto del estado físico del medio de cultivo (líquido y semisólido) sobre la multiplicación de los explantes y su crecimiento.

El medio de cultivo utilizado fue el MS modificado por Zárraga y Granada (1990), con 30 g de sacarosa, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 3.0 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 4 g.l<sup>-1</sup> de agar.

En las tres evaluaciones realizadas en intervalos de 21 días se midió la altura de la planta (cm) y se cuantificó el número de hojas y brotes por explante. Además, se calculó el coeficiente de multiplicación.

#### Influencia del manejo de los explantes

Con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación y el crecimiento de los explantes en esta fase de multiplicación se determinó la influencia de tres tipos de manejo.

Se tomaron plantas *in vitro* de altura uniforme que habían sido subcultivadas tres veces en medio de cultivo semisólido. Se tomaron explantes mayores de 1.0 cm y se establecieron tres grupos:

- no se seccionaron,
- corte del 50% de las hojas
- corte del 75% de las hojas

A los 21 días se evaluaron las siguientes variables: altura (cm), número de hojas, número de brotes y coeficiente de multiplicación.

### Enraizamiento

Para la fase de enraizamiento se siguieron los criterios establecidos por Villalobos (1982) para crisantemo (*Chrysanthemum*).

#### Efecto del manejo y el estado físico del medio de cultivo

El objetivo del experimento fue evaluar el manejo de los explantes combinados con el estado físico del medio de cultivo (Tabla 2) y para ello se transfirieron plantas *in vitro* procedentes de la fase de multiplicación con tres subcultivos.

Tabla 1. Tratamientos para evaluar el efecto de dos reguladores del crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *H. standleyi*.

Tratamientos	Concentración (mg.l <sup>-1</sup> )	
	6-BAP	AIA
1	0	0
2	0	0.65
3	0	1.3
4	1	0
5	1	0.65
6	1	1.3
7	2	0
8	2	0.65
9	2	1.3
10	3	0
11	3	0.65
12	3	1.3

Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto del manejo de explantes y el estado físico del medio de cultivo en la fase de enraizamiento de *H. standleyi*.

Tratamientos	Tipo de explante	Estado físico del medio de cultivo
1	Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados	semisólido
2	Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados	líquido
3	Explantes mayores de 3.0 cm individualizados	semisólido
4	Explantes mayores de 3.0 cm individualizados	líquido
5	Explantes sin individualizar Semisólido	semisólido
6	Explantes sin individualizar	líquido

Tabla 3. Efecto de la concentración y tiempo de exposición al hipoclorito de sodio sobre el establecimiento *in vitro* de *Heliconia standleyi* Macbride.

Trat.	NaOCl (%)	Tiempo de exposición (min)	Contaminación microbiana (%)*	Necrosis (%)	Brotación (%)
1	1	10	21.15 c	0.26 a	78.4 b
2	1	20	20.7 c	1.74 a	76.7 b
3	1	30	14.7 b	3.09 b	74.3 bc
4	2	10	12.5 b	2.16 a	79.8 b
5	2	20	7.2 a	2.72 a	89.6 a
6	2	30	7.2 a	4.96 b	87.3 a
7	3	10	7.5 a	10.28 c	80.5 ab
8	3	20	4.75 a	14.51 d	78.7 b
9	3	30	4.15 a	25.34 e	70.2 c
ES (±)			1.53	0.61	2.57
CV (%)			16.42	14.86	12.57

Medias con letras distintas dentro de cada columna difieren significativamente según la prueba de Duncan para  $p < 0.05$ .

El medio de cultivo estuvo compuesto por sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1.3 mg.l<sup>-1</sup> de AIA y 4% de sacarosa.

Las evaluaciones se realizaron a los 21 días y las variables evaluadas fueron: altura de la planta (cm), número de hojas por planta, número de raíces por planta, número de plantas vivas (supervivencia, %).

### Aclimatización

Para analizar la influencia de la altura de las plantas procedentes de la fase de enraizamiento *in vitro* sobre la aclimatización, se desarrolló el siguiente experimento. Se emplearon plantas *in vitro* mayores de 5 cm, plantas de 3–5 cm y plantas menores de 3 cm.

A los 30, 45 y 60 días después de la siembra se midió la altura de la planta (cm) y se cuantificó el número de hojas por planta y el número de plantas vivas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Desinfección y establecimiento *in vitro*

Se logró el establecimiento *in vitro* de rizomas de *H. standleyi*. El hipoclorito de sodio en concentraciones

del 2% (20 y 30 min de exposición) y al 3% (10 min) permitió reducir significativamente la presencia de contaminantes microbianos y obtener los mayores porcentajes de brotación (Tabla 3).

Las afectaciones por necrosis se incrementaron significativamente a partir del tratamiento con 2.0% y 20 min.

El hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes más frecuentemente utilizados para el tratamiento de los explantes en la fase de establecimiento (Enjalric *et al.*, 1998). En trabajos realizados en otras especies de heliconias que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio se obtuvieron resultados muy similares (2% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos) (Isaza, 2004).

Como es conocido la presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias es uno de los principales problemas durante el establecimiento *in vitro*, sobre todo de plantas adultas y cultivadas directamente en campo (Ramírez y Salazar, 1997; Ramírez *et al.*, 1999).

*Efecto del estado físico del medio de cultivo*

El estado físico del medio de cultivo no tuvo efecto sobre las variables contaminación microbiana, mortalidad ni brotación, sin embargo, afectó significativamente la longitud del tallo (Tabla 4).

En los medios de cultivo líquidos es más fácil la absorción de los nutrientes, hay una oxigenación constante y mejor intercambio gaseoso (Grabin, 1998). El medio de cultivo líquido permite diluir con mayor facilidad los metabolitos tóxicos que afectan el desarrollo de los explantes. George (1999) expresa que al cultivar brotes de aráceas como *Syngonium podophyllum* y *Scindapsus aureus*, solo en el caso de esta última hubo una respuesta al medio de cultivo semisólido.

**Multiplicación***Efecto de 6-BAP y AIA*

Se comprobó que la adición de 6-BAP y AIA al medio de cultivo tuvo influencia significativa sobre las variables evaluadas (Tabla 5). Los mejores

tratamientos fueron el ocho y el nueve, dado que el 6-BAP en ausencia de AIA muestra, en sentido general, indicadores inferiores en los tratamientos 1, 4, 7 y 10 para todas las variables, lo que ratifica la necesidad del balance auxina-citoquinina.

Se lograron buenos resultados cuando se combinaron en el medio de cultivo 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP + 0.65–1.3 mg.l<sup>-1</sup> de AIA en todas las variables analizadas, siendo los mejores tratamientos el ocho y el nueve. Machado (2002) y Olivera *et al.* (2000) señalan que el uso del 6-BAP incrementó el número de brotes en *Gerbera sp.* cuando se emplearon concentraciones entre 1.0 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>, mientras que en *Heliconia*, Isaza (2004) obtuvo resultados similares al utilizar 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.01 g.l<sup>-1</sup> de AIB.

*Efecto del estado físico del medio de cultivo*

Las plantas subcultivadas en medios de cultivo semisólidos mostraron valores significativamente superiores para todas las variables evaluadas (Tabla 6). El sostén o soporte dado a los explantes por el agar es importante para el crecimiento *in vitro* (Kaetha *et al.*, 1996).

Tabla 4. Efecto del estado físico del medio de cultivo sobre el establecimiento *in vitro* de *Heliconia standleyi* Macbride.

Tratamiento	Medio de cultivo	Contaminación microbiana (%)	Mortalidad (%)	Brotación (%)	Longitud del tallo (cm)
1	Líquido con soporte de papel	6.95 a	2.34 a	88.2 a	3.8 a
2	Semisólido	7.12 a	2.09 a	89.5 a	2.9 b
ES (±)		0.83	00.22	1.06	0.27
CV (%)		11.25	70.64	12.38	9.41

Medias con letras distintas dentro de cada columna difieren significativamente según LSD para  $p < 0.05$ .

Tabla 5. Influencia de las combinaciones de reguladores del crecimiento en la fase de multiplicación de *Heliconia standleyi* Macbride.

Trat.	6-BAP (mg.l <sup>-1</sup> )	AIA (mg.l <sup>-1</sup> )	Altura (cm)	No. de hojas	No. de brotes	Coef. de multiplicación
1	0	0	2.1 e	3.2 c	1.3 e	0.9 e
2	0	0.65	2.8 d	3.6 b	2.9 cd	1.8 d
3	0	1.3	3.2 c	3.4 bc	2.6 d	1.7 d
4	1	0	2.8 d	3.3 c	3.9 b	2.3 cd
5	1	0.65	3.3 bc	3.2 c	4.3 b	3.6 b
6	1	1.3	3.2 c	3.3 c	4.0 bc	3.7 b
7	2	0	3.4 bc	3.6 b	4.3 b	3.5 bc
8	2	0.65	4.8 a	4.2 a	5.0 a	4.5 a
9	2	1.3	4.5 ab	4.5 ab	4.9 a	4.6 a
10	3	0	3.3 bc	3.5 bc	3.8 c	3.5 bc
11	3	0.65	3.6 b	3.6 b	4.0 bc	3.7 b
12	3	1.3	3.8 b	3.4 bc	3.6 c	3.0 c
ES (±)			0.21	0.15	0.18	1.1

Medias con letras distintas dentro de cada columna difieren significativamente según la prueba de Duncan para  $p < 0.05$ .

Tabla 6. Efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación de *H. standley*.

Tratamientos	Altura (cm)	No. de hojas	No. de brotes	Coefficiente de multiplicación
Estado líquido	3.8 b	3.2 b	3.5 b	3.0 b
Estado semisólido	5.0 a	4.3 a	4.7 a	4.5 a
ES(±)	0.11	0.14	0.13	0.12

Medias con letras distintas dentro de cada columna difieren significativamente según la prueba de Duncan para  $p < 0.05$ .

Tabla 7. Comportamiento del manejo de los explantes en la fase de multiplicación de *H. standley*.

Tratamientos	Altura (cm)	No. de hojas	No. de brotes	Coefficiente de multiplicación
1-(Explantes > 1.0 cm)	3.8 a	4.3 a	3.6 a	3.4 a
2-(Explantes > 1.0 cm y con corte 50% follaje)	3.1 b	3.5 b	2.5 b	2.1 b
3-(Explantes > 1.0 cm y con corte 75% follaje)	2.0 c	3.0 c	2.3 b	2.0 b
ES(±)	0.2	0.1	0.1	0.1

Medias con letras distintas dentro de cada columna difieren significativamente según la prueba de Duncan para  $p < 0.05$ .

Según Grapin (1998) hay un efecto negativo de los medios de cultivo líquidos en condiciones estáticas. Similares resultados han sido observados por otros autores como Orellana (1998b) en plátanos y bananos, y Agramonte *et al.* (1998) en *Solanum tuberosum* L. Mientras, Bomman y Vogelman (1998) y Kordan (1999) refieren que para optimizar algunas de las fases de la micropropagación o solucionar problemas que pueden surgir en el transcurso del cultivo, es factible emplear el medio de cultivo semisólido.

#### Influencia del manejo de los explantes

El manejo influyó en el comportamiento de las plantas *in vitro* en la fase de multiplicación. Cuando se individualizaron los explantes mayores de 1.0 cm se elevaron los coeficientes de multiplicación respecto a otros tratamientos (Tabla 7). Martínez (1995) demostró que no es preciso eliminar follaje de las plantas *in vitro* para estimular la brotación.

#### Enraizamiento

##### Efecto del manejo y el estado físico del medio de cultivo

Se pudo determinar que los explantes deben ser mayores de 3.0 cm y que el estado físico del medio de cultivo tuvo una influencia menor sin afectar la calidad del explante (Tabla 8). Resultados equivalentes han sido obtenidos por Martínez (1995) en la micropropagación de plátanos y bananos (*Musa* spp.).

Cuando se usaron explantes menores de 3.0 cm y sin individualizar, tanto en medio de cultivo líquido como semisólido, fue baja la supervivencia, lo que

indica que la calidad del explante es determinante en esta fase, siempre que se usen medios de cultivo semisólidos o líquidos para obtener mayor calidad de la planta. Este efecto favorable durante el enraizamiento ha sido mencionado por Grout y Millan (1985) y Wainwright y Scrace (1998) en *Gerbera*, los que tuvieron en cuenta el tamaño de los explantes al ser subcultivados a medios de cultivo de enraizamiento, lo que permite una mejor planificación de la producción ya que se obtienen plantas *in vitro* con una mayor homogeneidad en tamaño y número de raíces, las que tienen mejores condiciones cuando se establecen en invernaderos.

#### Aclimatización

Los resultados indicaron que la altura de las plantas al final de la fase de enraizamiento influye en la aclimatización. Las plantas mayores de 3cm fueron significativamente superiores a las menores de 3 cm.

Se observó un incremento en la altura de las plantas a 30, 45 y 60 días. El número de hojas por día fue incrementándose, pero sin diferencia entre los tratamientos dos y tres a los 30 días y tampoco entre el uno y el dos a los 60 días. En la supervivencia, altura de la planta y número de hojas, los mejores resultados fueron para las plantas cuando tenían más de 5 cm (Tabla 9).

Según Pérez *et al.* (2001) en el cultivo de ginger (*Alpinia purpurata* L.) el tamaño de la planta *in vitro* al ser transferida al área del invernadero es directamente proporcional al porcentaje de supervivencia y al tiempo de estancia en el invernadero.

Tabla 8. Comportamiento del manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo en la fase de enraizamiento de *H. standleyi*.

Tratamientos	Altura (cm)	No. de hojas	No. de raíces	Supervivencia (%)
Explantos entre 1.0 – 2.9 cm individualizados, semisólido	4.4 b	3.1 b	4.2 b	95.4 b
Explantos entre 1.0 – 2.9 cm individualizados, líquido	4.6 b	3.2 b	4.5 b	96.1 b
Explantos mayores de 3.0 cm individualizados, Semisólido	5.3 a	3.6 a	5.4 a	100 a
Explantos mayores de 3.0 cm individualizados, Líquido	5.6 a	3.8 a	5.7 a	100 a
Explantos sin individualizar, Semisólido	3.8 c	2.9 c	3.5 c	77.3 c
Explantos sin individualizar, Líquido	4.0 c	2.8 c	3.8 c	79.4 c
ES(±)	0.06	0.08	0.12	4.2

Medias con letras distintas dentro de cada columna difieren significativamente según la prueba de Duncan para  $p < 0.05$ .

Tabla 9. Influencia de la altura de las plantas en la fase de aclimatización de *H. standleyi*.

Altura (cm)	Superviv. (%)	Altura (cm)			No. de hojas por planta		
		30 días	45 días	60 días	30 días	45 días	60 días
>5.0	99.4 a	11.6 a	13.8 a	14.4 a	5.2 a	6.4 a	7.8 a
3.0-5.0	95.6 b	8.9 b	12.0 b	13.9 ab	3.9 b	5.3 b	7.5 a
<3.0	76.6 c	5.5 c	8.4 c	11.8 b	3.0 b	4.8 c	6.7 b
ES(±)	3.9	2.7	2.2	2.0	1.9	1.4	1.7

Medias con letras distintas dentro de cada columna difieren significativamente según la prueba de Duncan para  $p < 0.05$ .

## CONCLUSIONES

Se logró la propagación *in vitro* de *H. standleyi*. Para el establecimiento *in vitro* se empleó NaOCl al 2% y el tiempo de desinfección (20 min), así como el estado líquido del medio de cultivo para la fase de establecimiento. Al emplear  $2.0 \text{ mg.l}^{-1}$  6-BAP y  $0.65 \text{ mg.l}^{-1}$  AIA, en la fase de multiplicación con medio de cultivo semisólido, se logró obtener un coeficiente de multiplicación de 4.6 explantes con un crecimiento y desarrollo adecuados. Se comprobó que los explantes deben ser mayores de 3.0 cm para pasar a la fase de enraizamiento. Uno de los factores determinantes en la fase de aclimatización para lograr plantas con mayor supervivencia fue la altura inicial de los explantes (mayores de 5.0 cm) pudiendo ser enviados al campo después de 45 días.

## REFERENCIAS

Agramonte, D, JN Pérez, F Jiménez, M Pérez (1998) Empleo del G-1 para la esterilización química de los medios de cultivo en la propagación masiva de plantas, en Libro de resúmenes

III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, pp. 46-47. Ciudad Habana, Cuba

Bomman, Ch, TC Vogelmann (1998) Effect of rigidity of gel medium on benziladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*, *Physiol. Plant.* 61: 502-512

Borris, P (1995) Manual de Floricultura, pp. 2-3. La Habana.

Divo de Sesar, M, F Vilella (1994) Primer Congreso Argentino de Biotecnología. Buenos Aires.

Enjalric, F, PP Carron, L Lardet (1998) Contamination of primary culture in tropical areas: The case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Hort.* 225: 57-66

George, EF (1999) Plant propagation by tissue culture, pp.130-192. The Technology Exegetics Limited

Grapin, A, N Michaux Ferriere, H Etienne, M Carron (1988) Effects of hypoxia on induction and development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. En: Claude Teisson (Ed.) *In vitro* culture of tropical plants, pp. 23-25. CIRAD. Paris

Grout, B, S Millan (1985) Photosynthetic developmet of micropropagated strawberry plantlets following transplanting, *Ann. Bot.* 55: 129-131

- Isaza, L (2004) Establecimiento *in vitro* con fines de producción masiva. *Sciencia et technica* 10 (26):193-198
- Kaetha, K, A Belcher (1996) Elimination of viruses from culture in presence of antiviral chemical. En: LA, Alderson PG (Eds) *Plant tissue culture and its application*, pp. 219-238. Butterworth, London
- Kordan, H (1999) Inorganic ions present in commercial agar. *Physiol. Pflanz.* 183: 355-359
- Krikorian, AD (1991) Propagación clonal *in vitro*. En: Willians M Roca y Luis Mroginski (Eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*, pp. 95-96. CIAP. Cali
- Machado, P (2002) Micropropagación *in vitro* de la *Gerbera Jamesonii* H Bolus. Tesis presentada en opción al título académico de Master en Ciencia en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba
- Maciel, N (1999) Consideraciones sobre el género *Heliconia* L. Características del crecimiento, desarrollo y floración de *Heliconia biahí* (L) L. y *H. Latisphata* Benth. bajo diferentes luminosidades, Tesis Mag. Sc. Barquisimetro, Venezuela. Universidad Centro occidental Lisandro Alvarado.
- Madriz, R, R Noguera, G Smits (1989) Patógenos foliares en *Heliconia psittacorum* L. *Fitopatol. Venez.* 2: 61-64
- Martínez, SJ (1995) Perfeccionamiento de la tecnología para la micropropagación de Plátanos y Bananos (*Musa* spp), Tesis de Maestría Instituto de Biotecnología de las Plantas, UCLV
- Murashige, T, F Skoog (1992) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-479
- Olivera, Z, A Gutiérrez, J Gutiérrez, M Rodríguez (2000) Cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera Jamesonii* H. Bolus) y su aclimatización en invernaderos. *BIOAGRO*: 12(3): 75-80
- Orellana, P (1998) Introducción a la Propagación Masiva (capítulo 9). En: JN Pérez (Ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 81-160. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara
- Pérez, M, C Pastelón (2001) Establecimiento aséptico a partir de ápices de ginger (*Alpinia purpurata*). Decimocuarta reunión científica-tecnológica-forestal y agropecuaria. Veracruz, México
- Ramírez, M, E Salazar (1997) Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Rev. Fac. Agron. (Luz)* 14: 497-506
- Ramírez, M, S León, A Urdaneta (1999) Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrich thalianum* (Berg) Nierdz. *Rev. Fac. Agron.* 16: 243-255
- SPSS (2006) Paquete estadístico SPSS para Windows, versión 15.0. SPSS Inc.
- Villalobos A, V A García (1982) Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y ápices vegetativos. *Agrociencia* 48: 107-118
- Wainwright, H, J Scrace (1998) Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. *Sci. Hort.* 38: 261-267
- Zárraga de Galdeano, J, J Granada (1990) Micropropagación *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii*) Boletín informativo de FIRA. 216 (22): 14-20