

## Regeneración *in vitro* de *Heliconia psittacorum*, variedad choconiana, usando el sistema de sección transversal delgada "Tcls" (thin cells layer)

*In vitro* regeneration of *Heliconia psittacorum*, choconiana variety using thin cell layer (Tcls) culture system.

Andrés Julián MENESES GUZMÁN <sup>1</sup>, Nelson ROJAS MARTÍNEZ<sup>1</sup> y Lucia ATEHORTÚA GARCÉS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad del Cauca. Laboratorio de Investigación en Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Ciudad Universitaria Popayán, sector Tulcán, Colombia y <sup>2</sup>Universidad de Antioquia. Laboratorio de Biotecnología. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Ciudad Universitaria, calle 67 N° 53-108, Medellín, Colombia. E-mails: [ajmeneses@unicauca.edu.co](mailto:ajmeneses@unicauca.edu.co), [julianm419@hotmail.com](mailto:julianm419@hotmail.com), [bionelron@gmail.com](mailto:bionelron@gmail.com), [latehor@yahoo.es](mailto:latehor@yahoo.es) y [latehor@gmail.com](mailto:latehor@gmail.com)  Autor para correspondencia

Recibido: 10/04/2009      Fin de primer arbitraje: 12/07/2009      Primera revisión recibida: 13/08/2009  
Fin de segundo arbitraje: 23/09/2009      Segunda revisión recibida: 11/10/2009      Aceptado: 18/10/2009

### RESUMEN

Las heliconias son especies de gran demanda en el mercado de flores de corte. Esto despierta el interés en las investigaciones de propagación vegetativa rápida, vigorosa y a grandes escalas siendo la micropropagación una alternativa. Además las plantas propagadas mantienen ciertas características de interés satisfaciendo así las exigencias de los productores. El sistema de sección transversal delgada "TCLs" (Thin Cells Layer) es una herramienta importante en el cultivo *in vitro* de las plantas, debido a que se requiere muy poco material para el proceso y se puede obtener gran cantidad de germoplasma, en este sentido, se establecieron las condiciones apropiadas para la propagación *in vitro* de la *Heliconia psittacorum* var. choconiana, mediante este sistema; las secciones transversales delgadas de (1 mm) de grosor se obtuvieron del pseudotallo de esta especie y fueron cultivadas con una respuesta óptima, en el medio Murashige y Skoog (MS, 1962), enriquecido con tiamina 1 mg L<sup>-1</sup>, piridoxina 1 mg L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 1 mg L<sup>-1</sup>, Myoinositol 100 mg L<sup>-1</sup>, carbón activado 0,5 g L<sup>-1</sup>, 2,4-D 1 mg L<sup>-1</sup>; BAP 1 mg L<sup>-1</sup>; Caseína hidrolizada 1 g L<sup>-1</sup> y como agente gelificante Gelrite 1 g L<sup>-1</sup>. Las condiciones de cultivo fueron a una temperatura de 25 ± 1 °C y 16 h luz, diariamente. Resultando finalmente la inducción de organogénesis directa que permitió obtener microplántulas vigorosas de heliconia, después de once semanas de cultivo. Concluyendo que la técnica de sección transversal delgada, es una buena herramienta para cultivar secciones de rizoma.

**Palabras clave:** *Heliconia*, organogénesis directa, TCLs, pseudotallo, cortes transversales, micropropagación.

### ABSTRACT

Heliconias are species with big goals in cut flowers market. It arouses interest in research about vigorous, fast and big scale of vegetative propagation, in that way micropropagation could be an option. Moreover plants propagated maintain several characteristic of interest to satisfy the exigencies of producers. Cross section system or thin cells layer "TCLs" is an important tool for *in vitro* plant culture, due to few vegetative materials that is required for the process and it is possible to obtain big quantity of germoplasm. In this way, were established the appropriated conditions for *in vitro* propagation of *in Heliconia psittacorum* choconiana variety, through this system; Thin cross sections of 1 mm of thickness was obtained of pseudostems in this specie and cultivated with optimal response in Murashige and Skoog culture medium (MS, 1962), supplemented with tiamine 1 mg L<sup>-1</sup>, piridoxine 1 mg L<sup>-1</sup>, Nicotinic acid 1 mg L<sup>-1</sup>, Myoinositol 100 mg L<sup>-1</sup>, activated charcoal 0.5 g L<sup>-1</sup>, 2,4-D 1 mg L<sup>-1</sup>, BAP 1 mg L<sup>-1</sup> hidrolized Casein 1 g L<sup>-1</sup> and Gelrite 1 g L<sup>-1</sup> like gelificant agent, the conditions of culture were at 25 ± 1° C of temperature and 16h light daily. The final result was the inductions of direct organogenesis that permit obtain vigorous microplants of heliconia, after eleven weeks. In conclusion, the technique of thin cross section, is a good tool to grow sections of rhizome.

**Key words:** *Heliconia*, direct organogenesis, TCLs, pseudosteam, cross sections, micropropagation.

**Abreviaturas:** MS= Murashige y Skoog; 2,4-D= ácido 2,4 diclorofenoxiacético; BAP= Benzilaminopurina

## INTRODUCCIÓN

Entre los grupos taxonómicos más ampliamente representados en los trópicos se encuentra la familia Heliconiaceae, constituida por el género *Heliconia* con cerca de 220 especies taxonómicamente descritas y cuyo centro de diversidad se encuentra en Colombia con más de 98 especies, de las cuales 48 se han descrito como endémicas de este país (Berry y Kress, 1991; Kress, *et al.*, 1999).

Actualmente los mercados internacionales tienen una gran demanda de plantas ornamentales tropicales, entre las que se encuentran las heliconias, que se consideran como plantas exóticas (Berry y Kress, 1991; Kress *et al.*, 1999). La demanda de este tipo de plantas ornamentales se ha incrementado notablemente, tanto a nivel nacional como internacional, y sin lugar a dudas, hoy en día su cultivo se ha convertido en un factor de importancia en la economía agrícola de muchos países (Prevatt y Harbauch, 1985). Un aspecto relevante de las heliconias, es que pueden ser utilizadas tanto para el ornato de parques y jardines, como flores de corte, así como cultivos con miras a la producción de semillas certificadas con fines de exportación (Clay y Hubbard, 1987). Adicionalmente, son varias las especies de heliconias que actualmente se cultivan comercialmente, como flores de corte, para los mercados internacionales en Centro y Sur América, el Caribe y Hawái (Escalona *et al.*, 1992)

No obstante, hay que tomar en cuenta que la mayoría de las heliconias se propagan vegetativamente a través de rizomas, debido a la dificultad en la germinación de las semillas, que suelen tardar entre 2 o 3 meses y hasta 3 años en madurar su embrión (Montgomery 1986; Criley, 1988). Además a pesar de la belleza, diversidad y potencial de las heliconias, estas especies presentan otras limitaciones que impiden aprovechar su potencial dentro del actual mercado de flores de corte, tales como tamaño, peso, disposición de las inflorescencias y estacionalidad (Broschat y Dosenlman, 1984; Atehortúa, 1997).

Actualmente la biotecnología a diferencia de métodos tradicionales, juega un papel primordial en obtener, inducir y mantener características florales más atractivas o competitivas en el mercado. El cultivo de tejidos, conjuntamente con la implementación de la técnica TCLs, ha resultado

todo un éxito en la micropropagación de especies e individuos de interés comercial, entre ellas las heliconias, TCLs (Thin Cells Layer) consiste en cortar capa delgada de tejido, en este caso la región de pseudotallo (Teixeira, 2003).

En esta investigación se estableció un protocolo que permitió propagar bajo condiciones *in vitro* *Heliconia psittacorum* var. Choconiana vía organogénesis directa. Mostrando que las secciones transversales del pseudotallo tienen un gran potencial de respuesta, resultando finalmente microplántulas vigorosas de 15 cm de longitud, después de la onceava semana del inicio del cultivo; por medio del sistema "TCLs" y con un medio nutritivo apropiado para el desarrollo normal de los explantes (Thin Cells Layer) (Tan Nhut, *et al.*, 2003).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Material vegetal:

Plantas madres: microplántulas libres de contaminación.

Explantos: secciones transversales de pseudotallos.

Medios de cultivos:

Tres tratamientos establecidos para el cultivo de los explantes y el medio de preservación del material vegetal (Cuadro 1).

### Métodos de aislamiento de los explantes mediante la técnica de TCLs

- A partir de plántulas cultivadas *in vitro* de *H. psittacorum*, provenientes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Antioquia, se obtuvieron segmentos de pseudotallos, a los cuales se les realizó cortes en secciones transversales (TCLs) de aproximadamente 1 mm de grosor (Teixeira, 2003).
- El aislamiento y cultivo de los explantes, se realizó en cámara de flujo laminar. Tres tratamientos fueron establecidos: utilizando el medio básico de cultivo modificado Murashige y Skoog; con pH ajustados a  $5,7 \pm 0,8$ . Las condiciones de crecimiento establecidas fueron: fotoperíodo de 16 h. luz correspondiente a 1700 Lux y bajo temperatura de  $25 \pm 1$  °C

## Diseño experimental y análisis estadístico

Se diseñó un experimento de bloques completamente al azar, con una variable dependiente que corresponde al número de brotes, y una variable independiente que corresponde a los tratamientos; con un tamaño de la muestra igual a 90 explantes, con 30 repeticiones.

En este experimento cada uno de los tratamientos es un medio de cultivo de diferente composición, con el medio básico de cultivo Murashige y Skoog, que varía en la concentración de fitoreguladores y algunos componentes referenciados en la bibliografía (Cuadro 1) (Goh, *et al.*, 1995; Nayak, *et al.*, 2002).

Una vez a la semana se contaron los brotes presentes en cada explante y para cada tratamiento de *Heliconia psittacorum* var. choconiana.

Dado que los datos se ajustaron a la distribución normal y son paramétricos se realizó la prueba de significancia estadística, (ANOVA) para saber si hay diferencias significativas.

Posteriormente se realizó una prueba estadística de comparación de medias (Scheffé, 1959) con los resultados de la 4, 5 y 8 semanas de cultivo, para determinar si hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

### Aislamiento de explantes y subcultivos de brote.

Se establecieron tres tratamientos (Cuadro 1) para inducir la respuesta de los explantes, en este

caso, inducción de brotes. Posterior al cultivo del explante, el tejido fue fragmentado en la onceava semana para separar cada uno de los brotes obtenidos, además para el desarrollo normal de los brotes se amerito un proceso de conservación a través de subcultivo, estableciéndose un medio nutritivo con base en las experiencias del laboratorio y en los reportes bibliográficos del cultivo *in vitro* de heliconias (Atehortúa, 1997; Roca *et al.*, 1983; Tan Nhut, *et al.*, 2003), y bajo las siguientes condiciones: Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con 120 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 80 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 40 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, con 100 mg L<sup>-1</sup> de Myo-inositol, 30 g de sacarosa y 1 mg L<sup>-1</sup> de la hormona BAP (benzil amino purina), AIB (Ácido Indolbutírico) 1 mg L<sup>-1</sup>, Gelrite 1,6 g L<sup>-1</sup>. pH: 5,7 durante ocho semanas, esto debido a que es de gran importancia mantener las plantas cultivadas *in vitro*, hasta que estén preparadas para ser llevadas a su fase *ex vitro*.

## RESULTADOS

Los medios de cultivo que se utilizaron para optimizar el sistema de sección transversal delgada "TCLs" (Thin Cells Layer) en *Heliconia psittacorum* var. choconiana, indicaron que los tejidos se mantuvieron vivos en los tres tratamientos pero la eficiencia en la producción de brotes no fue la misma, se observa que en el tratamiento 1, hubo mayor cantidad de explantes regenerados que en los tratamientos 2 y 3 (Cuadro 2). Esto se pudo apreciar por medio de las pruebas estadísticas realizadas (Cuadro 3), donde el análisis de varianza muestra que hay un alto grado de diferencias significativas y por tanto al menos uno de los tres tratamientos fue diferente.

Cuadro 1. Medios de cultivo para la obtención de brotes de *Heliconia psittacorum*, var. Choconiana mediante TCLs.

Medio N° 1 (MS 1962)	[ C ]	Medio N° 2 (MS 1962)	[ C ]	Medio N° 3 (MS 1962)	[ C ]
Tiamina	1 mg L <sup>-1</sup>	Tiamina	1 mg L <sup>-1</sup>	Tiamina	1 mg L <sup>-1</sup>
Acido Nicotínico	1 mg L <sup>-1</sup>	Acido Nicotínico	2 mg L <sup>-1</sup>	Sacarosa	30 g L <sup>-1</sup>
Piridoxina	1 mg L <sup>-1</sup>	Acido Ascórbico	50 mg L <sup>-1</sup>	Acido Ascórbico	200 mg L <sup>-1</sup>
Myo-inositol	100 mg L <sup>-1</sup>	Myo-inositol	100 mg L <sup>-1</sup>	2,4-D	0,42 mg L <sup>-1</sup>
2,4 -D	1 mg L <sup>-1</sup>	BAP	1,5 mg L <sup>-1</sup>	Zeatina	1,5 mg L <sup>-1</sup>
BAP	1 mg L <sup>-1</sup>	Kinetina	0,3 mg L <sup>-1</sup>	Myo-inositol	100 mg L <sup>-1</sup>
Carbon Activado	0,5 g L <sup>-1</sup>	ANA	0,25 mg L <sup>-1</sup>	Carbon Activado	0,2 g L <sup>-1</sup>
Sacarosa	30 g L <sup>-1</sup>	Sacarosa	30 g L <sup>-1</sup>	Gelrite®	1 g L <sup>-1</sup>
Caseína Hidrolizada	1 g L <sup>-1</sup>	Gelrite®	1 g L <sup>-1</sup>		
Gelrite®	1 g L <sup>-1</sup>				

C= cantidad de compuesto en la preparación de medios

Se observó que uno de los tratamientos fue diferente y más eficiente para la producción de brotes (Cuadro 2); la evidencia se obtuvo mediante la aplicación de la prueba estadística de separación de medias “Scheffé” (Cuadro 4), en las semanas 4, 5 y 8 después de la siembra del explante.

Según los resultados de la prueba estadística, se estableció que los tratamientos 2 y 3 se comportaron de forma semejante, es decir que no hay diferencias significativas en la eficacia de producción de brotes entre los dos tratamientos, mientras que el tratamiento 1 tuvo un comportamiento diferente, de modo que presenta diferencias altamente significativas con respecto a los otros dos tratamientos (cuadro 4). Esto se hace evidente en el tiempo, además durante la octava, novena y onceava semana, se puede apreciar claramente la respuesta de los explantes al tratamiento 1, por la formación de una gran cantidad de brotes, en promedio 15 por explante; mostrando ser el tratamiento mas efectivo en la micropropagación de *Heliconia psittacorum* var. *choconiana* (Figura 1).

Cuadro 2. Frecuencia de regeneración de los explantes de *Heliconia psittacorum* var. choconiana obtenidos mediante la técnica de TCLs.

TCLs	PB	Tratamientos †			Total de Cortes
		Medio N° 1	Medio N° 2	Medio N° 3	
RE	No	2	20	20	42
	Si	28	10	10	48
Total		30	30	30	90

PB: Presencia de brotes y RE: Respuesta del explante  
† Ver cuadro 1.

Cuadro 3. Prueba de ANOVA realizada con los datos obtenidos en el recuento del número de brotes producidos de *Heliconia psittacorum* var. choconiana mediante TCLs.

Semana		Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Media cuadrática	F	Sig.
4	Inter-grupos	30,489	2	15,244	29,256	**
	Intra-grupos	45,333	87	0,521		
	Total	75,822	89			
5	Inter-grupos	67,222	2	33,611	38,510	**
	Intra-grupos	75,933	87	0,873		
	Total	143,156	89			
8	Inter-grupos	249,956	2	124,978	69,108	**
	Intra-grupos	157,333	87	1,808		
	Total	407,289	89			

Sig.= Significación, \*\* indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (al menos uno de los tres) con una probabilidad del 99%.

Cuadro 4. Prueba de separación de medias (Scheffe), en la cuarta, quinta y octava semana de inoculado el explante. Se analizan los tres tratamientos para evaluar el mejor medio para la obtención de brotes de *Heliconia psittacorum* var. choconiana mediante TCLs

Semana 4		Medias armónicas	
Tratamiento †	N	a ‡	B
3	30	0,40	
2	30	0,47	
1	30		1,67
Sig.		0,938	1,000
Semana 5		Medias armónicas	
Tratamiento	N	A	b
3	30	0,57	
2	30	0,57	
1	30		2,47
Sig.		1,000	1,000
Semana 8		Medias armónicas	
Tratamiento	N	a	b
3	30	0,67	
2	30	0,80	
1	30		4,27
Sig.		0,929	1,000

† Ver cuadro 1.

‡ Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. (a: Agrupa las medias de los tratamientos que no poseen diferencias significativas) y (b: Agrupa las medias del tratamiento que difiere del grupo). Usa el tamaño muestral (n) de la media armónica = 30.

## Etapas de producción de brotes mediante TCLs

Después de haber realizado los cortes transversales, se observó que hacia la tercera, cuarta y quinta semana, los tejidos inician las respuestas de inducción de brotes (Figura 2).

En el tratamiento 1, los tejidos continúan con su desarrollo normal y el número de brotes producidos por el proceso de organogénesis directa, empieza a incrementarse a medida que transcurre el tiempo en cada uno de los explantes.

En la octava semana después de establecido el cultivo, se registró un incremento en la producción de brotes por organogénesis directa, la capacidad de los tejidos para regenerarse se hace mayor y se registró la aparición de un gran número de brotes (Figura 3).

Según trabajos realizados por otros autores (Goh, *et al.*, 1995; Nayak, *et al.*, 2002) en el establecimiento de heliconias *in vitro* se estableció un medio de cultivo que permitió la conservación del material vegetal para que las plantas continuaran su proceso normal, hasta que fuesen llevadas a su fase de adaptación *ex vitro* (Figura 4).

## DISCUSIÓN

La multiplicación *in vitro* de plantas del orden Zingiberales, especialmente plátanos y bananos entre otros, se realiza principalmente a través de la proliferación de los meristemas vegetativos. El desarrollo reciente de suspensiones de células embriogénicas abre la posibilidad para la producción masiva de este tipo de plantas a bajo costo (Haicour, *et al.*, 1998). Varios estudios sobre las suspensiones celulares se han realizado en la Universidad Nacional de Vietnam en la ciudad de Ho Chi Minh (Tran, *et al.*, 2000), (Tran, *et al.*, 2003), (Cung, *et al.*, 2000). A diferencia de otros tipos de técnicas de cultivo *in vitro* usadas en otras plantas del orden Zingiberales, "TCLs" es un sistema novedoso para la multiplicación masiva de este tipo de plantas, incluyendo las plantas de la familia Heliconiaceae. De forma más precisa *Heliconia psittacorum* var. choconiana fue el objeto de la presente investigación, en donde la producción de brotes por organogénesis directa, con ayuda de la técnica de sección transversal delgada "TCLs", se obtuvo con una concentración del fitoregulador 2,4-D en una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> que favoreció la organogénesis directa, para la obtención de plántulas. Valores superiores de este

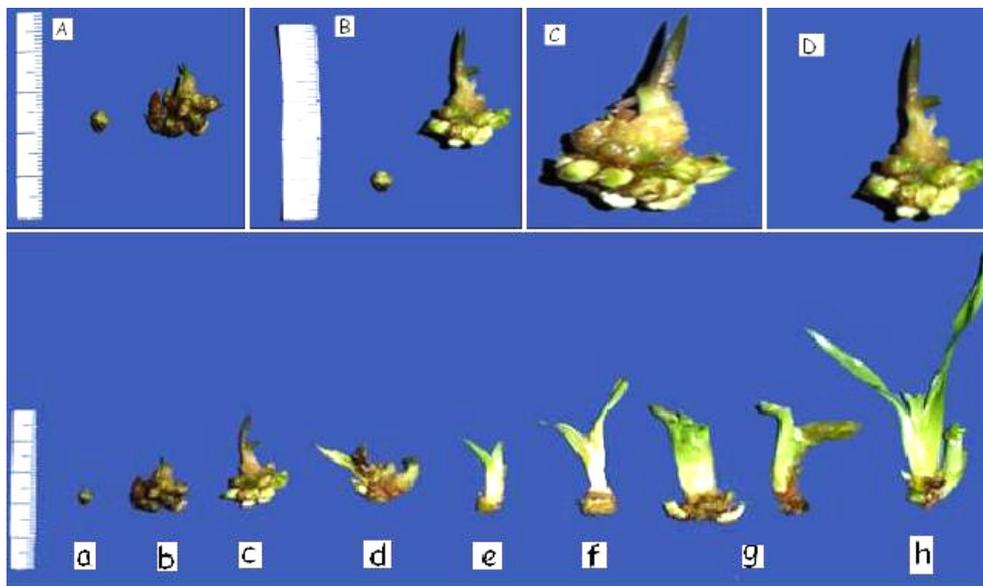


Figura 1. (Arriba) Brotes de *Heliconia psittacorum* var choconiana obtenidos mediante TCLs; en estadios de desarrollo más avanzado a través del proceso de organogénesis directa en la octava y novena semana (A, B, C y D), en el tratamiento numero 1, donde se puede observar una comparación entre el tamaño inicial del corte y el tamaño que adquiere cuando ya posee un gran número de brotes. (Escala 1 cm). (Abajo) Esquema comparativo entre los diferentes estadios del desarrollo de los Brotes de *Heliconia psittacorum* var choconiana producidos por organogénesis directa; con TCLs a) Segunda semana b) octava semana c) novena semana d) onceava semana, después de fragmentar el corte para separar los brotes; para su posterior desarrollo individual. Letras e,f,g,h corresponden al proceso de regeneración con una duración de ocho semanas (Escala 1 cm).

fitoregulador (2,4 -D) 80µM, inhiben o disminuyen la producción de brotes, activando la división celular para la obtención de callos (Goh, *et al.*, 1995).

Al emplear una concentración de fitoreguladores; 2,4-D (1 mg L<sup>-1</sup>) en asociación con BAP en una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> (tratamiento 1), los tejidos forman órganos directamente; y esto podría explicarse debido al efecto producido por la asociación de los fitoreguladores (Auxina: Citoquinina), ya que mientras el 2,4-D (Auxina sintética) promueve la elongación celular, el BAP (Citoquinina), promueve la multiplicación celular, permitiendo la formación de brotes directamente del explante cultivado, lo cual representa un menor periodo de tiempo en la producción de plantas. A pesar de que en el tratamiento 3 se tiene relación igual de Auxina/Citoquinina, entre Zeatina 1,5 mg / L y 2,4 - D 0,4 mg / L, no se presenta una inducción mayor al explante para la producción de brotes; aunque algunos tejidos presentan brotes la cantidad no se iguala a la cantidad de brotes que se presentan en el tratamiento 1, esto muestra que si se disminuye demasiado la concentración de 2,4 - D en asociación a una citoquinina como es el caso del tratamiento 3, la respuesta del explante no es la mejor, además aunque la Zeatina es también una citoquinina, la estructura química es similar pero no igual a la estructura química del BAP (Benzil amino purina), que sería una razón importante para que los dos reguladores actúen de forma diferente sobre un tejido, dependiendo de la concentración en la que se encuentren (Pierik, 1990).

El uso de los fitoreguladores BAP 1,5 mg L<sup>-1</sup>, Kinetina 0,3 mg L<sup>-1</sup> y ANA 0,25 mg L<sup>-1</sup>, empleados en el tratamiento 2, presentan una respuesta similar al tratamiento 3 en cuanto a la inducción de brotes por organogénesis directa; aunque esta combinación de reguladores ha sido utilizada para la propagación por "TCLs" en orquídeas del género *Cymbidium*, no resultó para la propagación de *Heliconia psittacorum* var. choconiana (Nayak *et al.*, 2002).

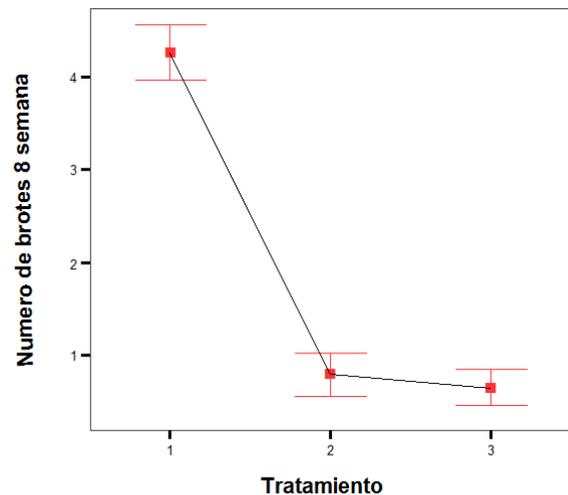


Figura 3. Comparación entre en número de brotes presentes en *Heliconia psittacorum* var. choconiana a la octava semana en los tres tratamientos usados para la evaluación de la técnica de sección transversal delgada, aquí puede observarse que el tratamiento 1 en comparación, con los tratamientos 2 y 3 fue significativamente más eficiente.

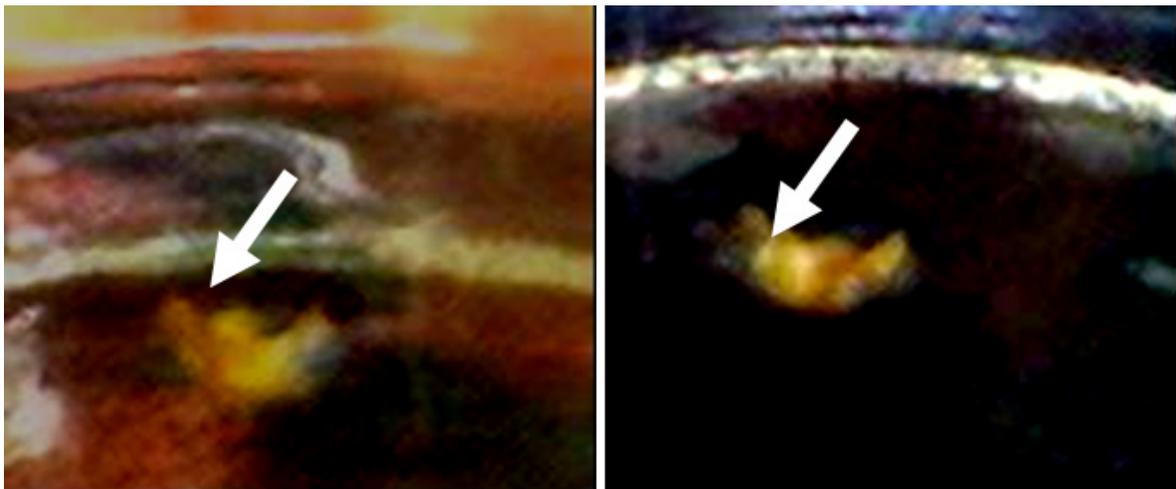


Figura 2. Inicio de la organogénesis en *Heliconia psittacorum* var choconiana obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada, en el tratamiento número 1, donde se puede observar los primeros brotes por organogénesis directa en la cuarta y quinta semana después de la siembra del explante (Escala 1 cm).

Según los trabajos realizados, en *Heliconia psittacorum* L, los valores altos de 2,4 D, inducen la producción de polifenoles, generando un color pardo oscuro, característica indeseable en el cultivo de tejidos, principalmente para este tipo de planta; además dificultan el proceso de diferenciación, para la obtención de brotes a partir de callo (Goh, *et al* 1995).

El protocolo establecido mostró que el tratamiento 1, presentó mayor cantidad de brotes que el resto de los tratamientos, Alcanzando finalmente el desarrollo de microplántulas vigorosas de *Heliconia psittacorum* var. *choconiana*. Confirmando el éxito de los resultados, es decir la obtención de brotes, con el análisis estadístico realizado. La octava semana muestra una diferencia significativa en la producción de brotes, comparado con los tratamientos 2 y 3. Un aspecto para tener en cuenta es que los componentes del medio nutritivo que hacen referencia al tratamiento 1 (cuadro1), y la concentración de los reguladores de crecimiento utilizados es baja (1 mg /

L), esto debido a que en ensayos previos pudo observarse que una concentración mayor del regulador de crecimiento (Goh *et al*, 1992), 2,4-D (Goh *et al*, 1995), induce primeramente una formación de callo para luego de ahí obtener los brotes, haciendo mas difícil la producción. Uno de los alcances del sistema es que al usar una concentración baja de 2,4 - D (1 mg /L) en asociación del regulador de crecimiento BAP con una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>, los tejidos se desarrollan por organogénesis directa, que puede explicarse gracias al efecto producido por la asociación de los dos reguladores de crecimiento, ya que mientras el 2,4- D promueve la elongación celular, el BAP, promueve la multiplicación celular permitiendo la formación de brotes directamente del explante cultivado (Roca *et al*, 1983), lo cual representa un menor periodo de tiempo en la producción de plantas y además una disminución en el costo de la producción, y simplemente los Brotes que fueron aislados evitando así la competencia entre ellos y permitiendo el buen desarrollo de los mismos



Figura 4. *Vitro* plantas obtenidas a partir de brotes de *Heliconia psittacorum* var. choconiana que fueron inoculadas en el medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada (a, b, c, d, e) (Escala 1 cm). Condiciones de laboratorio que permitieron realizar el cultivo *in vitro* de *Heliconia psittacorum* var. choconiana para la conservación de brotes obtenidos mediante la técnica de sección transversal delgada "TCLs" (Thin Layer Cells) (f, g).

al ser subcultivados, también bajo condiciones estériles, en un medio nutritivo alcanzando obtener microplántula.

Finalmente, y en forma global uno de los aportes de esta investigación, fue haber logrado un incremento en la producción de brotes mediante organogénesis directa. Por tanto se puede afirmar, que el proceso de optimización de la técnica de sección transversal delgada "TCLs" (Thin Cells Layer) en combinación con el medio de cultivo utilizado, es exitoso y es una buena herramienta para la producción de plantas de *Heliconia psittacorum*, variedad choconiana. Sin embargo se requieren numerosos estudios para lograr mayor eficiencia en la producción de esta variedad ornamental de plantas que presenta limitaciones para reproducirse sexualmente.

Esta investigación abre puertas a estudios con mayor profundidad acerca del tema; que ayuden al mejoramiento en la calidad y productividad en este tipo de plantas cultivadas con fines tanto científicos como netamente comerciales.

### CONCLUSIONES

- Los cortes del pseudotallo de plantas de *H. psittacorum*, variedad choconiana aislados a través de la técnica de sección transversal delgada, al ser cultivados *in vitro* respondieron exitosamente. Los explantes de *H. psittacorum* cultivados con el sistema de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells), responden de una forma positiva, manteniéndose vivos, e induciendo a la formación de brotes en el medio nutritivo compuesto principalmente por: MS, (Murashige y Skoog 1962), suplementado con tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, Myo inositol, carbón activado, sacarosa, los reguladores de crecimiento 2,4-D (2,4-Acido diclorofenoxiacético) y BAP (Benzil amino purina) y Caseína hidrolizada.
- Los explantes cultivados no tuvieron la mejor respuesta en cuanto a inducción de organogénesis directa, con la asociación de reguladores de crecimiento como 2,4 - D y Zeatina. La combinación de fitoreguladores Kinetina, ANA y BAP, no fue ideal para *H. psittacorum*, variedad choconiana y aunque hay respuesta en algunos tejidos no es la ideal para este tipo de plantas.
- Los brotes obtenidos se desarrollan mediante organogénesis directa, mediado por una baja concentración de fitoreguladores; 2,4-D y BAP. Los brotes pueden fragmentarse y conservarse en un medio donde se mantengan vivos y continúen su desarrollo, hasta su posterior adaptación a la fase *ex vitro*.
- El sistema de sección transversal delgada, es una herramienta innovadora para cultivar secciones de rizoma, que pueden diferenciarse, mediante combinaciones adecuadas de fitoreguladores, como los utilizados en el presente trabajo de investigación.
- En el medio 1 (tratamiento 1), la respuesta de los tejidos es mayor en cuanto a la producción de brotes, presentando hacia la octava y novena semana el mayor número de brotes por explante.

### LITERATURA CITADA

- Atehortúa, L. 1997. Heliconia: A new challenge for The Colombian Floricultural Industry. *In*: Biotechnology and Development. p. 20-22.
- Berry, F y W. J. Kress. 1991. *Heliconia*: An identification guide. Smithsonian Institution Press, Washinton, D. C.
- Broschat, T. K. y H. M. Donselman. 1984. Growing *Heliconia psittacorum* for cut flowers. *Nurseryments Digest*. p. 42-43.
- Bui Trang Viet, Cung Hoang Phi Phuong, Tran Thanh Huong and Pham Thanh Luong. 2000. Callus and cell suspension initiation from male flowers of *M. balbisiana* cv. Hot and *M. cavendishii* cv. Gia cui. Viet Nam National University-HCM City, College of Natural Sciences. p. 114-118.
- Clay, H. F. y J. C. Hubbard. 1987. The Hawaii Garden. Tropical Exotics. The University Press of Hawaii. Honolulu. p. 143-173.
- Criley, R.A. 1988. Propagation of tropical cut flowers: *Strelitzia*, *Alpinia* and *Heliconia*. *Acta Hort*. 226: 509-517.
- Cung Hoang Phi Phuong and Bui Trang Viet. 2000. Development of embryos and callus initiation from immature embryos of *Musa balbisiana* (abstract in

- English). J. Science and Technology Development 3 (5-6): 38-44.
- Goh, C.; J. N. Marie and K Prakash. 1992. High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum* L.f. Plant Science 90 (1): 63 -71.
- Goh, C.; J. N. Marie and K Prakash.1995. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. Scientia Horticulturæ 62 (1-2): 113-120.
- Haicour R.; V. Bui Trang, D. Dhed'a , A. Assani, F. Bakry and F. X. Cote. 1998. Banana improvement through biotechnology-ensuring food security in the 21st century (Abstract in English). Cahiers Agricultures 7: 468-475.
- Kress, W. J.; J. Betancur, C. S. Roesel y B. Echeverry. 1993. Lista preliminar de las Heliconias de Colombia y cinco especies nuevas. Caldasia 17(2): 183-197.
- Kress, W. J; J. Betancur, C. S. Roesel y B. Echeverry. 1999. Heliconias llamas de la selva colombiana. Bogota, Colombia.
- Montgomery, R. 1986. Propagation of *Heliconia* from seeds. Bull. Heliconia Soc. Int. 1(2): 6- 7.
- Murashige, T. and F. Skoog1982. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15 (3): 472-497.
- Nayak, N.; S. Sahoo, S. Patnaik and S. Rath. 2002. Establishment of thin cross section (TCLs) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L). and *Dendrobium nobile* Lindl. Orchidaceae) Scientia Horticulturæ 94 (1-2): 107-116.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi prensa. España.
- Roca, W. M. y L. Mroginski.1983. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT, Cali, Colombia, 20 p.
- Scheffé, H. 1959. The Analysis of Variance. John Wiley Sons, Inc. USA. 38,39,417 p.
- Teixeira da Silva, J. 2003. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal of Biotechnology. 2 (12).
- Tran Thanh Huong and Bui Trang Viet. 2000. Effects of various antioxidants on *Musa cavendishii* cell suspension culture (abstract in English). Viet Nam National University-HCM City, College of Natural Sciences. 17-23 p.
- Tran Thanh Huong and Bui Trang Viet. 2003. Growth of the cell suspension of *Musa paradisiaca* L. cv. Cau Man (abstract in English). Viet Nam National University-HCM City, College of Natural Sciences. 423-430 p.