

Desinfección y establecimiento *in vitro* de cinco variedades comerciales de heliconias a partir de propágulos vegetativos

Disinfection and establishment *in vitro* of five commercial varieties heliconias by vegetative propagules

Jack A. Moncada Lauriano¹, Kenny T. Gómez Vela², Richard J. Huaranca Acostupa³, Sergio Pinedo Freyre⁴ y Priscila L. Cárdenas García⁵

Recibido: enero 2014
Aceptado: marzo 2014

RESUMEN

El presente trabajo fue de categoría experimental y tuvo como objetivo determinar un protocolo viable en desinfección y establecimiento *in vitro* de cinco variedades comerciales de heliconias a partir de diferentes propágulos vegetativos con fines de producción masiva, por lo que se desarrollaron técnicas de saneamiento fitosanitario para controlar a las plantas en medios naturales, previo a los trabajos *in vitro* de desinfección y establecimiento de los explantes en el laboratorio. Se obtuvo como resultado lo siguiente: el explante recomendado son las yemas del rizoma en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) a dosis completa de las concentraciones de sales, de consistencia líquida con soporte de papel filtro, sometidas a NaOCl 3% durante 45 minutos más tres gotas del antibiótico rifampicina a 300 mg/L para la desinfección y para la fase de establecimiento el medio propuesto por M&S (Murashige y Skoog) a dosis completa de consistencia sólida con la adición de bencil amino purina (BAP) a 5 mg/L más ácido naftil acético constante a razón de 2 mg/L.

Palabras claves: explantes, establecimiento, BAP, heliconia, propágulo vegetativo.

ABSTRACT

This was an experimental category work and aimed to determine a viable protocol in disinfection and *in vitro* establishment of five commercial varieties of heliconias from different vegetative propagules for the purpose of mass production. Therefore, techniques as phytosanitary sanitation were developed to control plants in natural means, prior to *in vitro* disinfection work and establishment of explants in the laboratory. It was obtained the following results: the explant recommended are yolks rhizome in culture medium Murashige and Skoog (1962) to full dose of salt concentrations. Liquid consistency with paper filter, under NaOCl 3% for 45 minutes three drops of antibiotic rifampicin at 300 mg/L for disinfection and for the establishment phase medium proposed by M&S (Murashige and Skoog) full dose of solid consistency with the addition of amino benzyl purine (BAP) at 5 mg/L naphthyl acetic acid constant at 2 mg/L.

Key words: explants establishment, BAP, heliconias, vegetative propagules.

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 (Meneses *et al.*, 2009).

Actualmente, las exportaciones de flores

¹Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Iquitos, Loreto, Perú.

²Facultad de Ciencias Biológicas. UNAP. Iquitos, Loreto, Perú.

³Facultad de Ciencias Biológicas. UNAP. Pevás 5^a cuadra, Iquitos, Loreto, Perú. rijahua@hotmail.com

⁴Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Iquitos, Loreto, Perú.

⁵Facultad de Ciencias Biológicas. UNAP. Iquitos, Loreto, Perú.

exóticas en particular de heliconias, son de alrededor de 24 000 a 30 000 tallos por año, dependiendo de las variedades. El destino de estas exportaciones son Estados Unidos, Canadá, Holanda y Alemania. El sistema de propagación por rizomas en plantas del género *Heliconia* es considerablemente lento y requiere deshijar las plantas madres para poder establecer un nuevo clon de planta; esta dificultad de las semillas se presenta por un bajo porcentaje de germinación y larga latencia, además las plántulas resultantes son de lento crecimiento (Turriago y Flores, 2004; Berry y Kress, 1991).

Aunque el cultivo de tejidos es una técnica ampliamente utilizada para la propagación de especies ornamentales, este no ha sido el caso para especies de este género a juzgar por los reportes científicos disponibles (Nathan *et al.*, 1992; Osorio, 1993; Roca y Mroginski, 1991). Por lo cual se realizó este proyecto, con el propósito de generar una metodología que minimice los problemas básicos en el establecimiento *in vitro* de heliconias y poner información a disponibilidad de los interesados en la producción *in vitro* de plántulas de este género.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Estación Experimental Agraria San Roque, Iquitos, del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). El material utilizado para el cultivo *in vitro* estuvo compuesto por cinco variedades de dos especies: *Heliconia orthotricha* L. Anderson, con las variedades Bicolor, She y Edge of nite, y *Heliconia psittacorum* L.f., con las variedades Golden torch y Fire opal. Se usaron como propágulos: yemas del rizoma y ápices florales, siendo cada uno de ellos ensayos

diferentes, para los experimentos de desinfección y establecimiento, respectivamente.

Para la instalación de una parcela experimental, las dos especies de heliconias provenientes de las parcelas ubicadas en la carretera Iquitos-Zungarococha-King Kong, fueron cortadas a una altura de 15 cm desde el rizoma, luego se lavaron con abundante agua limpia. Estas muestras cortadas se sumergieron en una solución antifúngica de Vitavax al 5% por 10 minutos, para su posterior siembra en una parcela de 216 m² que fue instalada dentro de la Estación Experimental San Roque del INIA.

Luego de tres meses de tratamiento, fueron extraídas las plantas jóvenes y sometidas a un primer lavado con agua limpia, para librarlas de sustratos contaminantes. Después, fueron cortadas a una altura aproximada de 10 cm, dejando el rizoma y parte de las envolturas foliares. Con la ayuda de un cepillo, se las lavó con abundante agua limpia y detergente para minimizar contaminantes. Una vez lavadas superficialmente, fueron sometidas a una solución desinfectante (cloruro de benzalconio 0,16%) durante 24 horas. Posteriormente, para la desinfección de yemas del rizoma, estos segmentos de 10 centímetros fueron cortados a una altura de 4 cm y 1,5 cm de base aproximadamente en el laboratorio, para luego ser sumergidos en una solución de Tween 80 (tensoactivo) a 3 ml/L durante 10 minutos; luego el material vegetal se sumergió en diferentes soluciones de NaOCl (hipoclorito de sodio) a concentraciones de 3%, 4% y 5% durante 45 minutos.

Para la siembra del material vegetal, los explantes desinfectados fueron extraídos de los frascos y colocados sobre el papel estéril; donde, con la ayuda de pinzas y bisturíes, se

procedió a separar los primordios foliares (yemas de rizoma) que cubren al meristemo hasta una altura de 1 cm y 0,5 cm de base aproximadamente y las brácteas (ápices florales). Una vez obtenido el tamaño adecuado del explante, se sembraron con la ayuda de una pinza en los tubos de ensayo conteniendo el medio basal M&S sin hormonas, al cual se adicionaron tres gotas del antibiótico rifampicina a una concentración de 300 mg/L.

Para el establecimiento, el medio de cultivo empleado fue de consistencia sólida de Murashige y Skoog (1962) a dosis completa; además, se usó BAP (bencil amino purina) a concentraciones de 2 mg/L y 5 mg/L.

RESULTADOS

Contaminación

Con respecto a la variable contaminación, en la tabla 1 se observa el Anova de la interacción de los desinfectantes y la variedad de heliconias, donde los factores *Variedad de heliconia* y *Desinfectantes* son altamente significativos.

Las pruebas de contraste (tabla 2 y tabla 3) determinan que la especie *Heliconia psittacorum* var. Fire opal, resultó tener bajos índices de contaminación, a una concentración de NaOCl al 3% + rifampicina 300 mg/L. Los tratamientos que no usaron antibióticos presentaron altos porcentajes de contaminación.

Tabla 1. Análisis de varianza para la variable contaminación en yemas del rizoma.

Origen	Suma de cuadrado	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	46,413	1	46,413	245,718	,000
Variedad de heliconia	3,120	4	,780	4,129	,003
Desinfectantes	10,187	5	2,037	10,786	,000
Variedad de heliconia * Desinfectantes	7,280	20	,364	1,927	,011
Error	51,000	270	,189		

Tabla 2. Pruebas de Tukey (de contraste) para la variable contaminación según variedades en yemas del rizoma.

Variedad de heliconia	Tukey	Duncan
Fire opal	0,28 a	0,28 a
Golden torch	0,33 a	0,33 a
She	0,38 ab	0,38 a
Bicolor	0,38 ab	0,38 a
Edge of nite	0,58 b	0,58 b

Tabla 3. Pruebas de Tukey (de contraste) para la variable contaminación según desinfectantes en yemas del rizoma.

Desinfectantes	Tukey	Duncan
T2: NaOCl 3% + rifampicina 300 mg/L	0,18 a	0,18 a
T6: NaOCl 5% + rifampicina 300 mg/L	0,22 ab	0,22 a
T4: NaOCl 4% + rifampicina 300 mg/L	0,26 ab	0,26 a
T1: NaOCl 3%	0,46 bc	0,46 b
T5: NaOCl 5%	0,58 c	0,58 bc
T3: NaOCl 4%	0,66 c	0,66 c

Oxidación

En la tabla 4, se observa el Anova de la interacción de los desinfectantes y la variedad de heliconias con respecto a la variable oxidación, donde los factores *Variedad de heliconia* y *Desinfectantes* son altamente significativos.

Con la prueba de Tukey se determinaron los tratamientos que menos oxidación tuvieron en los diferentes factores. En la tabla 5 se

muestra que la especie *Heliconia psittacorum* var. Fire opal tuvo menor porcentaje de oxidación con respecto de las otras variedades.

Al realizar las pruebas de contraste para la concentración de los desinfectantes (tabla 6) se determinó una baja oxidación a una concentración de NaOCl al 3% + rifampicina 300 mg/L. Además, a altas concentraciones del desinfectante aumenta el porcentaje de oxidación del explante.

Tabla 4. Análisis de varianza para la variable oxidación en yemas del rizoma

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	1260,750	1	1260,750	1467,885	,000
Variedad de heliconia	239,500	4	59,875	69,712	,000
Desinfectantes	20,230	5	4,046	4,711	,000
Variedad de heliconia x Desinfectantes	32,620	20	1,631	1,899	,013
Error	231,900	270	,859		

Tabla 5. Pruebas de contraste para la variable oxidación según la variedad de heliconia en yemas del rizoma.

Variedad de heliconia	Tukey	Duncan
Fire opal	0,45 a	0,45 a
Golden torch	1,70 b	1,70 b
Edge of nite	2,53 c	2,53 c
She	2,78 c	2,78 c
Bicolor	2,78 c	2,78 c

Tabla 6. Pruebas de contraste para la variable oxidación según el tratamiento en yemas del rizoma.

Tratamientos	Tukey	Duncan
T2: NaOCl 3% + rifampicina 300 mg/L	1,56 a	1,56 a
T6: NaOCl 5% + rifampicina 300 mg/L	2,00 ab	2,00 b
T1: NaOCl 3%	2,04 ab	2,04 b
T5: NaOCl 5%	2,04 ab	2,04 b
T4: NaOCl 4% + rifampicina 300 mg/L	2,28 b	2,28 b
T3: NaOCl 4%	2,38 b	2,38 b

Tabla 7. Análisis de varianza para la variable sobrevivencia de yemas del rizoma según el tipo de medio de cultivo.

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2,250 ^a	1	2,250	10,756	,001
Intersección	42,250	1	42,250	201,976	,000
Medio de cultivo	2,250	1	2,250	10,756	,001
Error	20,500	98	,209		

Tabla 8. Análisis de varianza de oxidación en yemas del rizoma según el tipo de medio de cultivo con respecto a la variable sobrevivencia.

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	22,083 ^a	4	5,521	786,719	,000
Intersección	26,360	1	26,360	3756,314	,000
Oxidación	22,083	4	5,521	786,719	,000
Error	,667	95	,007		

Sobrevivencia

El Anova (tabla 7) indica una alta significancia del factor *Medio de cultivo* con respecto de la variable sobrevivencia. Los explantes se desarrollaron de forma óptima utilizando el medio de Murashige y Skoog (1962) a dosis completa, de consistencia sólida y adicionando 5 mg/L de BAP.

La tabla 8 muestra el análisis de varianza del factor *Oxidación* sobre la variable sobrevivencia, resultando altamente significativo, ya que este factor influyó totalmente en el establecimiento de las yemas de rizomas de heliconia de una manera negativa impidiendo su desarrollo y posterior crecimiento.

DISCUSIÓN

Sosa (2004), menciona que en la desinfección de ápices de *Heliconia standleyi* Macbride existe una tendencia a la disminución de la contaminación, en la medida que se aumenta la concentración del desinfectante (NaOCl) y el tiempo de exposición de los

explantes; y en relación con la necrosis, al aumentar la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición de los explantes, se incrementan los explantes necrosados. Resultado del cual ratificamos, ya que con los tratamientos que tenían mayor concentración de NaOCl la necrosis de los explantes pasado los veinte días eran sistémicos.

La propagación *in vitro* de heliconias a partir de ápices del rizoma presentó problemas complejos de contaminación por la susceptibilidad del explante de estar en contacto directo con el suelo y de exhibir contaminación sistémica, en tanto el uso del antibiótico rifampicina a 300 mg/L fue óptimo en la desinfección de estos explantes en las variedades de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum*. Atehortúa (1997) y Viegas (2005) recomiendan el uso de antibióticos en el medio de cultivo, así también lo reporta Hurtado y Merino (1994).

La utilización de BAP (bencil amino purina) a 5 mg/L fue óptimo en la conservación de los explantes viables durante el

establecimiento *in vitro* de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum* con sus variedades. Sosa (2004), reporta una combinación de BAP (1,0 mg/L) y el AIA (0,1 mg/L) en el medio de cultivo fue posible lograr una alta regeneración y crecimiento de los ápices, lo cual no pudimos comprobar.

CONCLUSIONES

La desinfección y viabilidad de los explantes de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum* en sus variedades comerciales se realiza utilizando NaOCl al 3% durante 45 minutos, adicionando 300 mg/L de rifampicina.

El propágulo viable para el cultivo *in vitro* de heliconias son las yemas de rizomas o yemas basales de plantas jóvenes. Los ápices florales evaluados no mostraron índices de sobrevivencia prolongada después de los ensayos de desinfección.

El medio de cultivo favorable para el establecimiento *in vitro* de yemas del rizoma de heliconias está conformado por M&S 100% de consistencia sólida y adicionando 5 mg/L de BAP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atehortúa L. 1997. Heliconia: A new challenge for The Colombian Floricultural Industry. In: Biotechnology and development, pp. 20-22.

Berry F, Kress WJ. 1991. Heliconia: An identification guide. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.

Hurtado D, Merino M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales; pp. 44-46. En: Merino, M., Técnicas de esterilización y manipulaciones asepticas. México, D. F.

Meneses A, Rojas N, Atehortúa L. 2009. Regeneración *in vitro* de *Heliconia psittacorum*, variedad Choconiana, usando el sistema de sección transversal delgada "Tcls" (thin cells layer). Revista UDO Agrícola 9 (3): 547-555.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15 (3): 472-497.

Nathan M, Goh C, Kumar P. 1992. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. Hort Science. 1992: 450-4.

Osorio J. 1993. Propagación clonal de heliconias a través de meristemas. En memorias del Congreso de heliconias y afines. Manizales. Pp.1-3.

Roca W, Mroginski L. 1991. Principios básicos, metodologías y técnicas del cultivo de tejidos vegetales. Pp. 3-16. En: Roca, W. y Mroginski. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Cali (Colombia): Publicación CIAT.

Sosa F. 2004. Propagación *in vitro* de la *Heliconia standleyi* Macbride. Tesis maestrado en Ciencias Agrícolas, Universidad Agraria de La Habana, Cienfuegos, Cuba. Disponible en: (on line) URL: <http://revistas.mes.edu.cu/eduniv/maestria/maestria-en-ciencias-agricolas/año2004/Flora%20Margarita%20Sosa%20Rodriguez.pdf/view>

Turriago K, Flores V. 2004. Heliconias. Disponible en: [on line] URL:http://www.encolombia.com/economia/floricul turandina_Heliconias.htm

Viegas P. 2005. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliana* (Heliconiaceae), Brasil. Pp. 49-55.