

**OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE SECCION TRANSVERSAL DELGADA
"TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) EN *Heliconia psittacorum*
var. *choconiana***

ANDRÉS JULIÁN MENESES GUZMÁN

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2007**

**OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE SECCION TRANSVERSAL DELGADA
"TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) EN *Heliconia psittacorum*
var. choconiana**

ANDRÉS JULIÁN MENESES GUZMÁN

Trabajo de Grado presentado como Requisito parcial para optar al título de Biólogo

NELSON BOLÍVAR ROJAS MARTINEZ, M.SC.

Director

LUCIA ATEHORTÚA GARCÉS, Ph.D.

Asesora

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2007**

NOTA DE ACEPTACIÓN

M.Sc. Nelson Bolívar Rojas Martínez.
DIRECTOR.

M.Sc. Leonidas Zambrano Polanco.
JURADO.

M.Sc. Oscar Darío Bermúdez.
JURADO.

Fecha de sustentación, Popayán 16 abril de 2007

Dedico este trabajo a todas las personas que me brindaron su apoyo y colaboración para que este trabajo se llevara a cabo.

Especialmente a mi madre, a mi padre y a mi hermana por su apoyo y comprensión durante todo este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios quien me ha dado sabiduría e inteligencia para poder llevar a cabo tan arduo trabajo.

También quiero agradecerle al M.Sc. profesor Nelson Bolívar Rojas, por su colaboración y respaldo para que se pudiera llevar a cabo la ejecución del proyecto, a la Ph.D Lucia Atehortúa. Profesora de la Universidad de Antioquia, quien me brindo su apoyo incondicional frente al trabajo y me guió en la idea del trabajo, compartiéndome algo de su conocimiento, en el área del cultivo in Vitro de la heliconias y manejo de laboratorio.

A la señora M.Sc. Esther Julia Naranjo del laboratorio de biotecnología de la Universidad de Antioquia, por su colaboración en la revisión y sugerencias en el trabajo realizado.

A los jurados M.Sc. Leonidas Zambrano Polanco y M.Sc. Oscar Darío Bermúdez por su colaboración en la revisión final del documento y por sus sugerencias en el trabajo.

A mi compañera Adriana, por su colaboración en el laboratorio.

A mi familia, que me sirvió de apoyo en los momentos más difíciles

Y finalmente a todas las personas que me brindaron su amistad y su apoyo para que se pudiera realizar este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	16
2. JUSTIFICACION	19
3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS	21
3.1.OBJETIVO GENERAL	21
3.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
4. ANTECEDENTES	22
5. MARCO TEORICO	25
5.1. HELICONIAS	25

5.1.1. Morfología de género heliconia	25
5.1.2. Hábitat y distribución geográfica de las heliconias	29
5.1.3. Descripción de <i>Heliconia psittacorum</i>	31
6. METODOLOGIA	33
6.1. Área de estudio y selección del material vegetal	33
6.2. Aislamiento de los explantes mediante la técnica de (TCS) O TCLs	33
6.3. Evaluación de los diferentes medios de cultivo	34
6.3.1 Medios de cultivo utilizados para la optimización de la técnica de sección transversal delgada TCS	34
6.3.2 Medio de cultivo mas adecuado para la conservación de las plantas obtenidas a través de la técnica de sección transversal delgada TCS.	37
7. RESULTADOS	39
7.1. Experimentos de la técnica de sección transversal delgada TCS.	39

7.2 Análisis estadístico	43
7.3 Medio de cultivo para la conservación de las plantas de <i>Heliconia psittacorum</i> var. choconiana obtenidos mediante la técnica de sección transversal delgada.	48
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIONES	59
10. RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFIA.	63
ANEXOS	67

LISTA DE TABLAS

Pag

- Tabla 1.** Medios de cultivo que finalmente fueron utilizados para evaluar el numero de brotes presentes en cada uno de los tratamientos, mediante la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) en *Heliconia psittacorum* var. choconiana35
- Tabla 2.** Resumen de los datos arrojados en el recuento del numero de explantes de *Heliconia psittacorum* var. choconiana, obtenidos mediante la técnica de sección transversal delgada (TCS) que se mantienen vivos en los tres tratamientos.....43
- Tabla 3.** Tabla de contingencia de regeneración v.s tratamiento de la frecuencia de regeneración de los explantes de *Heliconia psittacorum* var. choconiana obtenidos mediante la técnica de TCS, y donde se puede observar que en el tratamiento numero 1, hay mayor cantidad de explantes regenerados que en los tratamientos números 2 y 3.....43
- Tabla 4.** Prueba de ANOVA, realizada con los datos obtenidos en el recuento del numero de brotes producidos de *Heliconia psittacorum* var. choconiana mediante la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) en cada uno de los tratamientos..... 44
- Tabla 5.** Prueba de Scheffé, donde se compara el numero de brotes producidos en los tres tratamientos en la semana 4, donde se muestra que no hay diferencia entre los tratamientos 2 y 3, pero si en el numero 1 mostrando ser el mejor de ellos.....45
- Tabla 6.** Prueba de Scheffé, donde se compara el numero de brotes producidos en los tres tratamientos en la semana 5, donde se muestra que no hay diferencia entre los tratamientos 2 y 3, pero si en el numero 1 mostrando ser el mejor de ellos.....45

Tabla 7. Prueba de Scheffé, donde se compara el numero de brotes producidos en los tres tratamientos en la semana 8, donde se muestra que no hay diferencia entre los tratamientos 2 y 3, pero si en el numero 1 mostrando ser el mejor de ellos.....	46
Tabla 8. Características de las vitro plantas de <i>Heliconia psittacorum</i> var. Choconiana, en las que se evalúan características como: color, tipo de crecimiento, ausencia o presencia de necrosis; según estas características se propuso el mejor medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido a través de la técnica de sección transversal delgada (TCS).....	53

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. <i>Heliconia humilis</i>	28
Figura 2. Ejemplares de <i>Heliconia psittacorum</i>	31
Figura 3. Fotografías donde se muestran, los recipientes utilizados para la inoculación de los explantes, en cual se aplica los tres tratamientos, que corresponden a tres medios de cultivo diferentes para la evaluar la cantidad de brotes producidos mediante la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) en <i>Heliconia psittacorum</i> var. choconiana.....	39
Figura 4. Fotografía de un corte de <i>Heliconia psittacorum</i> var choconiana. Obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada, sembrado en el tratamiento numero 1, en el experimento 2, donde se puede observar los primeros estadios del desarrollo por organogénesis directa en la tercera semana después de su inoculación. (Escala 1 cm).....	40
Figura 5. Fotografías de un corte de <i>Heliconia psittacorum</i> var choconiana. Obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada, sembrado en el tratamiento numero 1, en el experimento 2, donde se puede observar un aumento en el número de brotes por organogénesis directa en la cuarta y quinta semana después de su inoculación. (Escala 1 cm).....	40
Figura 6. Brotes de <i>Heliconia psittacorum</i> var choconiana obtenidos mediante la técnica de sección transversal delgada; en estadios de desarrollo mas avanzado a través del proceso de organogénesis directa en la semana octava (A, B) y novena (C,D), en el tratamiento numero 1, en el experimento 2, donde se puede observar una comparación entre el tamaño inicial del corte y el tamaño que adquiere cuando ya posee un gran numero de brotes. (Escala 1 cm).....	41

Figura 7. Esquema comparativo entre los diferentes estadios del desarrollo de los brotes de <i>Heliconia psittacorum</i> var choconiana producidos por organogénesis directa; empezando por el corte que se realiza en la técnica de sección transversal delgada “TCS” (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells), hasta obtener una planta casi completamente regenerada. a) corte segunda semana b) octava semana c) novena semana d) onceava semana, después de la fragmentación del corte para separar los brotes; e,f,g,h corresponden al proceso de regeneración con una duración de ocho semanas. (Escala 1 cm).....	42
Figura 8. Ejemplares de plantas de <i>heliconia psittacorum</i> . var choconiana que finalmente fueron regeneradas a través del cultivo <i>in Vitro</i>	42
Figura 9 Comparación entre en número de brotes presentes en <i>Heliconia psittacorum</i> 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 numero uno en comparación, con el dos y el tres es significativamente mas eficiente.....	47
Figura 10 Brotes de <i>Heliconia psittacorum</i> var.choconiana inoculados en el tratamiento A evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).....	48
Figura 11. Brotes de <i>Heliconia psittacorum</i> var.choconiana inoculados en el tratamiento B evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).....	49
Figura 12. Brotes de <i>Heliconia psittacorum</i> var.choconiana inoculados en el tratamiento C evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).....	50
Figura 13. Brotes de <i>Heliconia psittacorum</i> var.choconiana inoculados en el tratamiento D evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).....	51
Figura 14. Brotes de <i>Heliconia psittacorum</i> var.choconiana inoculados en el tratamiento E evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).....	52

Figura 15 Condiciones que permiten realizar el cultivo *in vitro* de *Heliconia psittacorum* var.choconiana para la conservación de las plantas obtenidas mediante la técnica de sección transversal delgada “TCS” (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells).....53

LISTA DE ANEXOS

Pag.

Anexo A. Descripción de la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) en *Heliconia psittacorum* var. Choconiana.
.....67

RESUMEN

Las plantas de *Heliconia psittacorum*, que naturalmente se encuentran en el trópico, tienen características fisiológicas y morfológicas que hacen de ella una planta promisoría en el campo investigativo, y de este mismo modo también en el campo comercial. Actualmente las heliconias hacen parte del mercado internacional como flores exóticas y de corte. (Clay and Hubbard, 1987).

La técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Cells Layer) en *Heliconia psittacorum* es una herramienta importante en el cultivo in vitro de la planta, se utilizan pequeñas cantidades de material vegetal, y además permite obtener una gran cantidad de germoplasma. La técnica se basa principalmente en la totipotencialidad, característica que está presente en todas las células vegetales y permite obtener una planta a partir de una célula o tejido (Texeira, 2003). El tejido usado para la técnica de sección transversal delgada es tomado del pseudotallo de la planta y tiene un tamaño aproximado de 0.5 a 1 mm de grosor. Este tejido se cultiva en medio Murashige y Skoog (1962; MS), enriquecido con tiamina 1 mg/L, piridoxina 1 mg/L, ácido nicotínico 1 mg/L, Myoinositol 100 mg/L, carbón activado 0.5g/L, y el regulador de crecimiento ácido - 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 - D) 1 mg/L. BAP (Benzil amino purina) 1mg/L Caseína hidrolizada 1g/L y como agente gelificante Gelrite 1g/L. Los tejidos fueron mantenidos a una temperatura de 25±1 °C, (condiciones de laboratorio) y con una iluminación continua con lámparas de 1700 Lux. A estas condiciones el tejido tiene la posibilidad de desarrollarse de una forma óptima.

En el cultivo in vitro de *Heliconia psittacorum* variedad choconiana, la concentración ideal de los reguladores de crecimiento (2,4 - D) y BAP es de 1mg/L de cada uno de ellos, esto permite que el tejido sea inducido a realizar mitosis, y que la regeneración de la planta se de mediante el proceso de organogénesis directa, que es favorable ya que en otros casos se presenta la formación de una masa de células amorfas llamado callo, que implica un incremento en el tiempo de regeneración y además un mayor costo de producción. La técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Cells Layer) en *Heliconia psittacorum* variedad choconiana resulta exitosa para la obtención de un gran número de material vegetal aproximadamente 7 - 9 brotes por explante. Por lo anterior el presente estudio se constituye en un aporte, para el mejoramiento en la producción de este tipo de plantas ornamentales, con miras a la exportación de sus flores.

INTRODUCCION

Entre las familias monotípicas mas ampliamente representada en los trópicos se encuentra la familia Heliconiaceae, constituida por el género *Heliconia* entre 200 y 220 especies taxonómicamente descritas y cuyo centro de diversidad se encuentra en Colombia con más de 98 especies, de las cuales 48 han sido descritas como endémicas de este país (Berry y Kress, 1991; Kress et al, 1999).

Las heliconias son plantas monocotiledóneas ampliamente representadas en el trópico americano con una distribución geográfica que va desde el centro de México hasta Bolivia, incluyendo Brasil y el Caribe y con sólo algunas pocas especies localizadas en las islas del Pacífico desde Indonesia hasta Nueva Guinea y de Nueva Caledonia hasta Samoa (Everet, 1981), entre 50 y 2.200 msnm, pero principalmente en los bosques húmedos tropicales.

En la actualidad, la demanda 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 plantas ornamentales es que las mismas 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).

En los últimos años las heliconias han adquirido importancia hortícola como ornamentales y actualmente varias especies son cultivadas comercialmente, como flores de corte, para los mercados internacionales en Centro y Sur América, el Caribe y Hawai (Escalona et al, 1992)

Se ha estimado que mas de 89 especies de *Heliconia* vienen siendo cultivadas en todo el mundo (Berry y Kress, 1991), siendo Hawaii uno de los principales exportadores de este tipo de flores tropicales, superando inclusive la exportación de ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) y otras especies ornamentales del orden Zingiberales.

A pesar de la belleza, diversidad y potencial de las heliconias, estas especies presentan algunas limitaciones que impiden aprovechar su potencial dentro del actual mercado de flores de corte, tales como tamaño, peso, disposición de las inflorescencias, estacionalidad y durabilidad en florero (Brochat y Dosenlman, 1984; Atehortúa, 1997).

Adicionalmente, poseen una serie de dificultades para el establecimiento de su cultivo a escala industrial. La mayor parte de las heliconias son propagadas vegetativamente a través de rizomas, debido a que sus semillas son difíciles de germinar y suelen tardar entre 2 o 3 meses hasta 3 años debido a que su embrión madura muy lentamente (Montgomery 1986; Criley, 1988).

Los procesos biotecnológicos de micropropagación *in vitro* ofrecen nuevas alternativas para superar en parte los problemas mencionados. La Universidad de Antioquia a través del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales ha venido implementando con bastante éxito varias tecnologías (organogénesis directa e indirecta, embriogénesis somática entre otros) y ha desarrollado y estandarizado varios protocolos de micropropagación de varias especies ornamentales, entre las cuales vale la pena mencionar más de 12 especies de *Heliconia* (Atehortúa y Valencia, 1999; Atehortúa et al., 1999). Además con la creciente demanda de estas especies se hace necesario explorar nuevos métodos y protocolos eficientes que faciliten la obtención masiva de material para el establecimiento de cultivos comerciales. Dentro de las tecnologías disponibles están los sistemas de micropropagación que brindan un valor agregado adicional al permitir la producción de plantas libres de patógenos y la generación de nuevas variedades.

Los procesos biotecnológicos actualmente se han constituido en una herramienta de gran ayuda, para satisfacer las necesidades de los productores; dentro de estas herramientas biotecnológicas vale la pena mencionar la técnica de sección transversal delgada “TCS” (thin cross section) o "TCLs" (Thin Layer Cells), que consiste en tomar una delgada capa de células de la región del pseudotallo de la planta, para luego ser cultivada en un medio adecuado para la formación de brotes desarrollados por medio del proceso conocido como “organogénesis directa” (Texeira, 2003). El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar la técnica de sección transversal delgada “TCS” (thin cross section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) para la obtención de plántulas de *H. psittacorum* var. Choconiana.

2. JUSTIFICACION

Debido al tamaño, variabilidad genética y su producción durante todo el año, *Heliconia psittacorum*, presenta un especial potencial para los procesos de investigación, cultivo, desarrollo e innovación a nivel de flores tropicales exóticas y especialmente para la comercialización como flor de corte (Kress et al, 1993).

Adicionalmente *Heliconia psittacorum* var. choconiana podría servir como modelo dentro de esta especie para estudios futuros que se pueden resumir en los siguientes literales: a) Para el desarrollo de estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines. b) Para la bioconversión y producción de compuesto útiles. c) Para el incremento de la variabilidad genética. d) Para la obtención de plantas libres de patógenos. e) Para la micropropagación masiva con fines comerciales y f) conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Mroginski, 1983). Igualmente, se desconoce su potencial para la producción de metabolitos primarios y secundarios que podría abrir la puerta a nuevos desarrollos y potenciales.

Con el fin de potenciar las posibilidades de mercado y brindar un soporte científico y tecnológico a los productores, con el presente estudio se pretende establecer los primeros aportes para la formación de una plataforma de investigación básica y aplicada para el aprovechamiento de la diversidad genética existente en la región, inicialmente mediante el desarrollo de un protocolo eficiente de micropropagación para *Heliconia psittacorum* var. choconiana.

Heliconia psittacorum en primer lugar es una especie ampliamente representada en nuestro país (Kress et al, 1993), cultivada por su valor ornamental que ofrece la posibilidad de obtener material vegetal durante todo el año para el desarrollo de cualquier investigación.

Por otra parte las características morfológicas y fisiológicas, tales como: tamaño de la inflorescencia, la altura total de la planta, tiempo corto de desarrollo, período de floración y número de inflorescencias, (Kress et al, 1993), en comparación con otras especies indican que el manejo que se le puede dar a esta especie puede ser más ventajoso que el de otras especies.

Por lo anterior, la regeneración in vitro por medio de la técnica facilitará la obtención masiva de plantas para el desarrollo de cultivos comerciales de esta especie y variedad y permitirá evaluar los costos de producción para compararlos con el método desarrollado previamente.

El adelanto de esta tecnología, abrirá las posibilidades de una producción a escala, reduciendo costos y generando posibilidades para nuevas investigaciones y desarrollos. Además, brindará un soporte científico y tecnológico a pequeños, medianos y grandes productores.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Establecer las condiciones de cultivo optimas para la regeneración in vitro de *Heliconia psittacorum* var. choconiana, mediante la técnica de Sección Transversal Delgada conocida como “TCS” (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Cells Layer).

3.2 ESPECIFICOS

- Implementar bioensayos de cultivo para seleccionar el medio más adecuado, basado en reportes de la literatura.
- Definir mediante ensayos con diferentes reguladores de crecimiento las concentraciones ideales para la regeneración de *Heliconia psittacorum*.
- Implementar el protocolo de micropropagación mediante “TCS” o "TCLs" para la especie *Heliconia psittacorum* var. choconiana

4. ANTECEDENTES

En Colombia se cuenta con varios trabajos que describen novedades taxonómicas, así como estudios sobre flora regional, algunos aspectos de cultivo y ecología y sobre la distribución y clasificación preliminar de las especies de heliconias que hay en el país. Sin lugar a dudas el mayor de los aportes en taxonomía lo hicieron Abalo y Morales (Morales, 1987), quienes alcanzaron a describir cerca de 45 nuevas especies para la flora colombiana.

Desde 1985, John Kress empezó una intensa búsqueda de las especies en el campo, con el fin de obtener información precisa sobre su variación morfológica y distribución geográfica, labor a la que se vincularon Beatriz Echeverry y Julio Betancur. Como producto de este trabajo, ellos han publicado varias contribuciones, entre estas una lista preliminar de especies, con su distribución por departamentos, su clasificación subgenérica y la descripción de cinco especies nuevas para la ciencia (Kress et al. 1993). Así mismo, un análisis de la distribución geográfica y altitudinal de la especies en el país (Betancur y Kress 1995)

En forma simultánea, otros investigadores nacionales y herbarios regionales han empezado a interesarse por algunos aspectos de las heliconias, realizándose en Manizales el "primer seminario nacional sobre Heliconias y plantas afines" (Echeverry, 1994).

Algunos jardines botánicos, como el "Juan María Céspedes" de Tuluá y el "Joaquín Antonio Uribe" de Medellín, tienen importantes colecciones de heliconias nativas, las que servirán sin duda como instrumento de reproducción, conservación, y monitoreo de las especies. Las colecciones vivas han sido rotuladas con especial cuidado, acompañadas de los respectivos especímenes testigo, y depositadas en los herbarios "Juan María Céspedes" de Tuluá, Herbario Universidad de Antioquia y Joaquín Antonio Uribe" de Medellín.

Desde 1990, Atehortúa en la Universidad de Antioquia en Medellín, empezó a liderar un grupo de investigación en *Heliconia*, con el objeto de estudiar algunos aspectos de las especies nativas del departamento de Antioquia, en especial su adaptación para comercialización y cultivo "in vitro". Como producto de estas investigaciones se tienen varios trabajos publicados (Atehortúa et al .1999) (Maza, 1992; Henao, 1995).

Por otra parte, los escritos realizados sobre flora regional, y publicadas en Colombia son:

1) "Flora de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada 1783 - 1816" (Morales, 1987), en el cual se registran y describen con brevedad cuatro especies colectadas e ilustradas bellamente durante la expedición dirigida por el sabio don José Celestino Mutis.

2). Los platanillos del Medio Caquetá" (Martínez y Galeano 1994), en donde se presenta el tratamiento taxonómico. Para 11 especies encontradas en la región de Araracuara, Caquetá.

3) Heliconias del Valle del Cauca" (Devia, 1994), es un catálogo de algunas heliconias que crecen en ese departamento, y es curioso encontrar incluidas allí otras especies cultivadas en el Jardín Botánico " Juan María Céspedes" de Tulúa, que no son nativas de ese departamento; y

4) Heliconias de Antioquia, un catálogo de 37 especies que crecen en Antioquia, acompañado de valiosos datos sobre su cultivo y distribución geográfica (Maza, 1992)

Las Heliconias también se encuentran presentes en otros países del mundo, siendo ejemplo de esto Trinidad y Tobago donde fueron identificadas 5 especies endémicas (Simmonds, 1967).

En los últimos tiempos se está trabajando, en gran parte la implementación y estandarización de métodos de cultivo de tejidos, que permitan un mejor manejo para la especie *Heliconia psittacorum*; siendo ejemplo de esto los trabajos realizados por Goh y sus colaboradores en el año de 1992, para la obtención de callos, a partir de secciones transversales de tallo (TCS), realizando tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4 - D, en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) (Goh et al. 1992). Mas adelante Goh realizó un trabajo de cultivo in vitro en *Heliconia psittacorum* similar al anterior en donde su objetivo fue la obtención de plantas por medio de organogénesis directa, y con tratamiento en diferentes concentraciones de 2,4 - D (Goh et al. 1995).

5. MARCO TEORICO

5.1 HELICONIAS

5.1.1. MORFOLOGIA DEL GÉNERO *heliconia*

De acuerdo a Kress et al, (1999), las heliconias son plantas herbáceo-rizomatozas pertenecientes a la familia *Heliconiaceae* (anteriormente asignadas a *Musaceae*) y al orden Zingiberales.

Las heliconias son plantas herbáceas de tamaño variable que pueden alcanzar hasta 12 m de altura. Crecen a través de tallos subterráneos (rizomas) que emiten brotes (vástagos) a la superficie, estos vástagos pueden ser solitarios o agregados, lo cual caracteriza la capacidad de colonización de cada especie. Cada vástago esta compuesto por un pseudotallo, las hojas propiamente dichas y una inflorescencia. El pseudotallo recibe este nombre porque en realidad no es un tallo verdadero y esta formado por las bases de las hojas que se superponen (vainas). Pueden presentar variaciones en la textura y en el color, desde glabros hasta escamosos, como *H.pogonantha* y *H. regalis*; aceitosos, como *H. oleosa*; cerosos, como *H. platystachys*, o pubescentes, como *H. mutisiana*; o desde verdes hasta café rojizos, como *H. rhodantha* y *H. robertoi*, con pecas de color vino tinto o café, como *H. latispatha*.

Las hojas están compuestas por un pecíolo y una lámina, y están colocadas en un solo plano (disposición dística). De acuerdo al tamaño y a la forma en que las hojas se disponen las plantas muestran apariencias diferentes (hábitos de crecimiento), lo que es de gran utilidad para el reconocimiento de las diferentes especies, así: 1) musoide, cuando las hojas tienen pecíolos muy largos y están en posición vertical, tomando la apariencia de plantas de plátano (*Musa*); 2) zingiberoide, cuando las hojas tienen pecíolos muy cortos o carecen de él (hojas sésiles) y, además, se disponen en forma mas o menos horizontal, tomando la

aparición de una planta de jengibre (*Zingiber*); y 3) canoide, cuando las hojas presentan pecíolos cortos o medianos y se disponen en posición oblicua y tienen la apariencia de una planta de achira (*Canna*) (Kress et al. 1999).

El pecíolo es un tallito rollizo que se sostiene de una lámina y al igual que el pseudotallo, varía en tamaño, textura y color. La lámina tiene una nervadura central con coloración variable y con una concavidad que se continúa con la del pecíolo, cuya función es conducir el agua que cae hacia el interior del pseudotallo. Desde el nervio central salen numerosos nervios diagonales y paralelos entre sí (venación pinnado paralela), pero en ocasiones se presentan venas transversales que conectan las venas diagonales, el cual es importante para reconocer algunos grupos, como la sección *Retiformis* del género *Griggsia*. La lámina es por lo general verde, pero en algunas especies el envés puede ser rojo o vino tinto, como en *H. metallica*, *H. gilbertiana* y algunos cultivares de *H. stricta*; en otras especies puede presentar una cobertura cerosa, como en *H. longa*, o textura aterciopelada, como en *H. estherae* (Kress et al. 1999).

Las láminas pueden ser rígidas y permanecer en posición vertical, como en *H. arrecta* o tenderse como en la mayoría de las especies. Por otra parte pueden permanecer enteras o partirse en segmentos laterales delgados, como ocurre en *H. aquetensis*, *H. chartacea* y *H. dielsiana*. La punta de la hoja puede ser aguda, obtusa o acuminada, la base por lo general es desigual, con un lado que se extiende más sobre la nervadura central que el otro, y puede ser aguda, obtusa, atenuada, truncada o cordada.

La inflorescencia es la parte más vistosa de la planta y posee las características morfológicas más importantes para clasificar las especies, casi siempre es terminal, saliendo hacia el ápice del pseudotallo, pero en ocasiones puede originarse desde un vástago basal, sin hojas como en *H. hirsuta* y *H. metallica*. Pueden ser colgantes y en ocasiones rastreras, como en *H. lentiginosa*.

La inflorescencia esta compuesta por un tallo (pedúnculo) que la une al vástago, varias espatas y un eje que las conecta entre si (raquis). Cada una de estas partes puede variar en tamaño, textura y color. El raquis puede ser recto u ondulado (flexuoso) (Kress et al. 1999).

A las espatas también se les llama brácteas cincinales o espataceas y por lo general llevan varias flores, de 5 a 50, aglomeradas en sus axilas (cincino), cada una acompañada por una bráctea floral.

Las espatas se disponen de forma alterna sobre el raquis y pueden hacerlo en un solo plano (disticas) o en varios planos (espiraladas o polísticas). Las espatas pueden tener colores diferentes sobre las superficies interna y externa (adaxial y abaxial), pero esta última es la que contiene los caracteres morfológicos más utilizados en la taxonomía. Esta es por lo general de color rojo o amarillo, pero puede ser verde, rosada, o combinada con dos o más colores.

En algunas especies las espatas no tienen pelos (glabras), otras tienen pelos largos y espaciados y otras pelos cortos y densos.

Además de pelos, las espatas pueden tener un indumento parecido a la cera, el cual da a la estructura una apariencia blanquecina (glauca) como ocurre en *H. aurea* y *H. psittacorum*.

Las márgenes de las espatas pueden permanecer desde rectas a revolutas e involutas. Por lo general las espatas permanecen sobre la inflorescencia, aunque algunas especies se caracterizan por tenerlas deciduas y efímeras.

Las brácteas florales que acompañan a cada una de las flores pueden ser transparentes u opacas, membranáceas o coriáceas, permanecer o caer durante el desarrollo del fruto. Cada flor lleva un pedicelo que la une al cincino, casi siempre muy corto, y que generalmente permanece oculto por las brácteas florales, pero que en especies tales como *H. impudica* y *H. trichocarpa* esta expuesto (Kress et al. 1999).

Las flores son hermafroditas pues poseen parte masculina y femenina. Tienen cinco estambres fértiles, cada uno de los cuales está compuesto por un filamento y una antera que lleva el polen, el sexto estambre se modifica y no es funcional (estaminodio), siendo su forma, ápice y su longitud característicos para cada especie. Parece que la función del estaminodio es guiar a la lengua del colibrí hacia los nectarios, situados en la base de la flor. El pistilo está formado por el ovario, el estilo y el estigma. El ovario está ubicado por debajo del perianto (ovario infero) y es trilocular, cada una de las cavidades contiene un solo ovúlo de posición basal (Kress et al. 1999).

El fruto de las heliconias es una drupa con un endocarpo muy duro que contiene una a tres semillas. La parte externa es carnososa y se vuelve azul al madurar, lo que las hace muy atractivas para los pájaros que las dispersan. Las semillas son desnudas (sin arilo) y el embrión que contiene no está bien diferenciado cuando la semilla madura, lo que podría ser una de las causas que explican el retraso de su germinación (Kress et al. 1999).



Figura 1. *Heliconia humilis*

Tomado de <http://www.heliconiasocietypr.org/heliconias.htm>

5.1.2. HABITAT Y DISTRIBUCION GEOGRAFIA DE LAS HELICONIAS

A nivel del trópico las especies mas llamativas suelen habitar zonas abiertas de crecimiento secundario, a orillas de los ríos o bordeando las carreteras o en zonas abiertas de la selva. Estas hermosas inflorescencias son polinizadas por colibríes especialmente las heliconias rojas, amarillas, rosadas y naranjas; mientras los murciélagos que se alimentan del néctar, son los principales polinizadores de la heliconias verdes especialmente en las islas del Pacífico del continente asiático (Kress et al. 1999).

El género *Heliconia* posee entre 200 y 220 especies que se distribuyen naturalmente en las regiones tropicales del mundo. Casi todas las especies crecen en América tropical, desde México hasta Bolivia, incluyendo las islas del Caribe, y solo seis de ellas se encuentran en la región del Pacifico Sur del continente Asiático. La mayor riqueza esta en los piedemontes de la cordillera de los Andes y en las tierras bajas de Choco biogeográfico, región comprendida entre el sur de Centroamérica y el norte de Ecuador (Kress, et al. 1999).

Las heliconias crecen una gran variedad de ambientes, pero prefieren los húmedos y lluviosos, también pueden vivir en ecosistemas con régimen de lluvia mas estacionales (Kress, et al 1999). Entre las especies con menor tamaño y con mayor demanda se encuentra *Heliconia psittacorum* la cual esta conformada por una serie de ecotipos y fenotipos bastante variados y por esta razón esta especie se constituye en una prioridad para el desarrollo de procesos de mejoramiento e innovación. Entre los ecotipos o variedades de interés que pueden ser trabajados en investigación están: *H. psittacorum* var. choconiana; *H.psittacorum* var. “Strawberry and Cream” y *H. psittacorum* var. “andrómeda” (Atehortúa, 1997).

En general las especies de *Heliconia* son características de el interior sombreado de los bosques como *H donstonea*, por ejemplo estas especies son mas expuestas a la deforestación a la que están siendo sometidos nuestros bosques. Existen otras especies que crecen en terrenos totalmente inundados o que prefieren suelos arcillosos. Las características físicas del relieve colombiano y su ubicación geográfica han convertido al país en escenario de particular importancia, por la ploriferaion de especies que allí han evolucionado. De hecho Colombia es el país del mundo con más especies de *Heliconia* aproximadamente un centenar que se distribuyen por todo el país, a su largo y ancho de sus cinco regiones geográficas, con notable preferencia por la región Andina, en donde están presente cerca del 75% de ellas. La región Pacifica alberga el 37% de las especies, mientras que la Amazonia posee el 22%, el Caribe el 15% y la Orinoquia cerca del 10 % para estos cálculos debe tenerse en cuenta que algunas de las especies están presentes en mas de una región geográfica (Kress, et al 1999).

La distribución general de las especies muestra que existe una diversidad más baja en las regiones más secas, como en la Orinoquia y Caribe, las cuales son, fisiográfica y climáticamente, muy homogéneas. Las heliconias prefieren entonces, lugares montañosos, quebrados y con alta humedad, lo que crea una gran variedad de microclimas diferentes que favorecen la diversificación del grupo. Dentro del escenario geográfico del país, las subregiones con más especies son la vertiente Occidental Andina, con el 35% de las especies, el Valle de río Atrato y las vertientes Magdalenense y Oriental Andina, cada una de las cuales con el 25% de las especies totales conocidas para el país (Kress et al. 1999).

Aproximadamente la mitad de las especies que crecen en Colombia son endémicas, lo que nos hace poseedores únicos de poco mas de una cuarta parte de las especies que crecen sobre el planeta. Las regiones naturales con mayor proporción de endemismos son la Andina, con el 75%, y la Pacífica, con cerca del 20 % de las especies endémicas del país (Kress et al. 1999).

Las especies se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 2300 m de altitud, pero existen mayor riqueza entre los 0 y los 1400 m; a partir de esta altura, la riqueza de especies disminuye progresivamente. Las especies endémicas prefieren altitudes entre los 1000 y los 1800 m, lo que indica que las especies ubicadas en zonas mas bajas se encuentran en gran variedad de lugares, mientras que las de las regiones montañosas presentan áreas de distribución mas restringida. En los Andes encontramos también otros grupos de plantas que comparten con las heliconias el mismo patrón de distribución, como las bromeliáceas, gesneriáceas, ericáceas etc (Kress et al. 1999).

Así la región Andina debería ser considerada Zona prioritaria para establecer planes de conservación y manejo de los recursos naturales, dada su alta riqueza florística y la acelerada destrucción y deforestación a la que han sido sometidos sus ambientes autóctonos (Kress et al. 1999).

5.1.3. DESCRIPCION DE *Heliconia psittacorum*



Figura 2. Ejemplares de *Heliconia psittacorum*

<http://www.birdsoftt.com/scenes%20info/heliconia.htm> y

<http://mgonline.com/heliconia.html>

Heliconia psittacorum es una planta de tipo musoide a canoide, que puede tener desde los 0.5 a 1.5 m de altura, posee una hoja con un pecíolo de 11 a 32 cm. de largo y una lamina que puede variar entre los 37 y 60 de largo por 6 a 10 cm de ancho (Kress et al. 1999).

Posee una inflorescencia erecta de 8 a 18 cm. de largo, con un raquis flexuoso, anaranjado por lo general y glabro o glauco, espatas disticas de 3 a 7 cm. en inflorescencias orientadas en un Angulo de 30 a 45°, rojas o amarillas con ápice verde oscuro, glabras y rectas parabólicas.

Se distribuye en Brazil, Colombia, Guayana Francesa, Guyana, Surinam, Trinidad y Venezuela. En Colombia la podemos encontrar en los Llanos Orientales, Serranías dispersas del Arauca, Casanare, Meta y Vichada; también en algunas localidades de la selva Amazónica (Guaviare) y en la Vertiente Oriental Andina. Según la escala de Holdridge (1978) se encuentra ubicada en los pisos térmicos: tropical y de transición al premontano.

Heliconia psittacorum es una planta pequeña, florece de 3 a 8 meses después de sembrada, a pleno sol puede tener una producción de 130 inflorescencias/mes, cuando se reduce la luz en un 37% tiene una producción de 35 inflorescencias/mes (Kress et al, 1999).

6. METODOLOGIA

6.1. ÁREA DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El presente trabajo se llevo a cabo en el Departamento de Biología, en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular (CELMOLEC) de la Universidad del Cauca, en la ciudad de Popayán, Colombia. El material vegetal de *Heliconia psittacorum* var. choconiana fue seleccionado a partir de plántulas "In Vitro" obtenidas en el Lab. BioVeg del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia.

6.2. AISLAMIENTO DE LOS EXPLANTES MEDIANTE LA TÉCNICA DE (TCS) O TCLs

Procedimiento:

- A partir de plántulas in vitro se obtuvieron segmentos de pseudotallos, a los cuales se les realizó cortes en secciones transversales (TCS o TCLs) de aproximadamente 0.5 mm a 1 mm de grosor. Dichos segmentos fueron cultivados en los diferentes medios de cultivo (Ver anexo A) (Teixeira, 2003).
- Inicialmente los tejidos se cultivaron en medio MS; (Murashige y Skoog, 1962) a una temperatura de 25 ± 1 °C, (condiciones de laboratorio) y con una iluminación continua con lámparas de 1700 Lux. Para luego determinar cual es el medio de cultivo óptimo que permita regenerar el material cultivado.

- Se evaluaron los siguientes medios de cultivo:
 1. Medio de Nayak et al. 2002 sólido (desarrollado para orquídeas)
 2. Medio de Goh et al, 1995 (desarrollado para *H. psittacorum*)
 3. Medio propuesto por el Autor, basado en los reportes de la literatura.

6.3. EVALUACIÓN DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO:

6.3.1 Medios de cultivo utilizados para la optimización de la técnica de sección transversal delgada TCS

En el presente trabajo se evaluaron tres tratamientos y los medios de cultivo desarrollados por los siguientes autores:

1. Goh et al, (1995) que esta compuesto por medio basal MS (Murashige and Skoog 1962), enriquecido con tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, Myo inositol, carbón activado, y diferentes concentraciones del regulador de crecimiento 2,4D.
2. El descrito por Nayak et al, (2002), desarrollado para orquídeas, y que esta compuesto por medio basal Murashige y Skoog (1962; MS), enriquecido con tiamina, ácido nicotínico, Myo inositol, ácido ascórbico, y diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 6- benzilaminopurina, Kinetina y ANA.
3. El medio propuesto por el autor del proyecto, basado en los reportes de la literatura.

Tabla 1. Medios de cultivo que finalmente fueron utilizados para evaluar el número de brotes presentes en cada uno de los tratamientos, mediante la técnica de sección transversal delgada “TCS” (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) en *Heliconia psittacorum* var. choconiana.

Medio 1	Medio 2	Medio 3
Medio basal Murashige y Skoog (1962;MS) Tiamina 1 mg/L, Piridoxina 1 mg/L, Acido nicotínico 1 mg/L, Myo inositol 100 mg/L, Carbón activado 0.5g/L, 30g de sacarosa, 2,4D (2,4-Acido diclorofenoxiacético) 1 mg/L. BAP (Benzil amino purina) 1mg/L Caseína hidrolizada 1g/L Gelrite 1g/L.	Medio basal Murashige y Skoog (1962;MS), Tiamina 1 mg/L, Acido nicotínico 2mg/L, Myo inositol 100 mg/L, Acido ascórbico 50 mg/L, BAP (benzilaminopurina) 1.5 mg/L. Kinetina 0.3mg/L ANA 0.25 mg/L. Sacarosa 30g/L. Gelrite 1g/L.	Medio basal Murashige y Skoog (1962;MS), Myo inositol 100mg/L, sacarosa 30 g/L, Zeatina 1.5 mg/L 2,4D 0.42mg/L, Acido ascórbico 200 mg/l, Tiamina 1g/L, Carbón activado 0.2g/L Gelrite 1g/L.

En primera instancia se realizó un experimento preliminar con algunas modificaciones en la concentración de los reguladores de crecimiento en todos los tratamientos y seguidamente un segundo experimento que finalmente fue usado para evaluar el número de brotes presentes en cada uno de los tratamientos; en este experimento en cada uno de los tratamientos se varía en la concentración de hormonas y algunos componentes referenciados en la bibliografía. Goh et al, (1995); Nayak et al, (2002).

Siendo en total 180 unidades experimentales (90 por experimento), 30 repeticiones por tratamiento.

De otro modo también a medida que se buscó optimizar e implementar la técnica de sección transversal delgada (TCLs), se realizaron bioensayos para garantizar medio de cultivo mas adecuado para la conservación de las plantas *in vitro* obtenidas mediante esta.

En el experimento un numero 1, se usan los medios de cultivo que aparecen a continuación, partiendo de la información suministrada en los reportes bibliográficos Goh et tal, (1995); Nayak et al, (2002).

- Goh et tal, (1995), con algunos ajustes y compuesto por: Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con tiamina 0.5mg/L, piridoxina 1 mg/L, acido nicotínico 1 mg/L, Myo inositol 100 mg/L, carbón activado 0.5g/L, 2,4-D (2,4-Acido diclorofenoxiacetico) 2 mg/L. BAP (Benzil amino purina) 3 mg/L, Caseina hidrolizada 1g/L , sacarosa 30g/L y Gelrite 1g/L.
- Nayak et al, (2002), con algunos ajustes y compuesto por: medio basal MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con tiamina 1 mg/L, acido nicotínico 2mg/L, Myo inositol 100 mg/L, acido ascórbico 50 mg/L, BAP (benzilaminopurina) 3 mg/L Kinetina 0.64 mg/L y ANA 0.52 mg/L. Sacarosa 30g/L. y de Gelrite 1g/L.
- Medio propuesto por el autor, compuesto por: medio basal MS (Murashige y Skoog 1962), Myo inositol 100mg/L, sacarosa 30 g/L, Zeatina 1mg/L 2,4D 0.8 mg/L acido ascórbico 200 mg/l, tiamina 1g/L, carbón activado 0.2g/L y Gelrite 1g/L.

Los tres tratamientos con un pH de 5.8

En el experimento numero 2, se utilizan los medios de cultivo que aparecen a continuación, que finalmente son utilizados para evaluar y decidir cual es el mejor para la regeneración de las plantas de *Heliconia psittacorum* var. choconiana., mediante la técnica de sección transversal delgada “TCS” (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells).

- Goh et al, (1995), Modificado y compuesto por: Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con tiamina 1 mg/L, piridoxina 1 mg/L, ácido nicotínico 1 mg/L, Myo inositol 100 mg/L, carbón activado 0.5g/L, 30g de sacarosa, 2,4D (2,4-Acido diclorofenoxiacético) 1 mg/L. BAP (Benzil amino purina) 1mg/L Caseína hidrolizada 1g/L y Gelrite 1g/L.
- Nayak et al, (2002), Modificado, y compuesto por: medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con tiamina 1 mg/L, ácido nicotínico 2mg/L, Myo inositol 100 mg/L, ácido ascórbico 50 mg/L, BAP (benzilaminopurina) 1.5 mg/L. Kinetina 0.3mg/L y ANA 0.25 mg/L. Sacarosa 30g/L. y de Gelrite 1g/L.
- Medio propuesto por el autor, compuesto por: medio basal MS (Murashige y Skoog 1962;), Myo inositol 100mg/L, sacarosa 30 g/L, Zeatina 1.5 mg/L 2,4D 0.42mg/L, ácido ascórbico 200 mg/l, tiamina 1g/L, carbón activado 0.2g/L y Gelrite 1g/L.

Los tres tratamientos con un pH de 5.8

6.3.2 Medio de cultivo más adecuado para la conservación de las plantas obtenidas a través de la técnica de sección transversal delgada TCS.

Medio de cultivo A

Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con 1.5 mg/L de tiamina, 1mg/L de ácido ascórbico, con 100mg/L de Myo – Inositol, 30 g de sacarosa y 3mg/L de la hormona BAP (benzil amino purina) y Agar – Agar 7% pH: 6.

Medio de cultivo B

Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962) enriquecido con 1.5 mg/L de tiamina, 0.7mg/L de piridoxina, 1mg/L de ácido ascórbico, con 100mg/L de Myo – Inositol, 30 g de sacarosa y 4mg/L de la hormona BAP (benzil amino purina) y Agar – Agar 6%. pH: 6.

Medio de cultivo C

Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con 300 mg/L de tiamina, 300 mg/L de piridoxina, 500mg/L de ácido ascórbico, con 100mg/L de Myo – Inositol, 30 g de sacarosa y 2.5mg/L de la hormona BAP (benzil amino purina), AIB (Ácido indolbutírico) 3mg/L, Gelrite 1.6 g/L. pH: 5.8.

Medio de cultivo D

Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con 150 mg/L de tiamina, 120 mg/L de piridoxina, 100mg/L de ácido ascórbico, con 100mg/L de Myo – Inositol, 30 g de sacarosa y 2.mg/L de la hormona BAP (benzil amino purina), AIB (Ácido indolbutírico) 2mg/L, Gelrite 1.6 g/L. pH:5.7.

Medio de cultivo E

Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con 120 mg/L de tiamina, 80 mg/L de piridoxina, 100mg/L de ácido ascórbico, 40 mg/L de ácido nicotínico, con 100mg/L de Myo – Inositol, 30 g de sacarosa y 1.mg/L de la hormona BAP (benzil amino purina), AIB (Ácido indolbutírico) 1mg/L, Gelrite 1.6 g/L. pH: 5.7.

7. RESULTADOS

7.1 Experimentos de la técnica de sección transversal delgada TCS.

Después de varios ensayos preliminares, los medios de cultivo que se utilizaron para evaluar la optimización e implementación de la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) en *Heliconia psittacorum* var. choconiana, muestran que los tejidos se mantienen vivos en los tres tratamientos pero la eficiencia en la producción de brotes no es la misma. Esto se puede apreciar por medio de las pruebas estadísticas realizadas (Tabla 4), donde el análisis de varianza muestra que hay un alto grado de significancia y por tanto al menos uno de los tres tratamientos es diferente. Mediante la tabla de contingencia (Tabla 3), se puede observar según los datos, al realizar el recuento de la cantidad de brotes producidos en cada uno de los tratamientos, los medios de cultivo números 2 y 3, no poseen la misma eficacia en comparación con el tratamiento número 1.

Es evidente que uno de los tratamientos es diferente y más eficiente para la producción de brotes mediante la técnica; y esto se hace evidente mediante la interpretación de la prueba estadística de Scheffé, donde los tratamientos 2 y 3 se comportan de manera semejante, mientras que el tratamiento número 1 se comporta de manera diferente.



Figura 3. Fotografías donde se muestran, los recipientes utilizados para la inoculación de los explantes, en cual se aplica los tres tratamientos, que corresponden a tres medios de cultivo diferentes para la evaluar la cantidad de brotes producidos mediante la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) en *Heliconia psittacorum* var. choconiana,

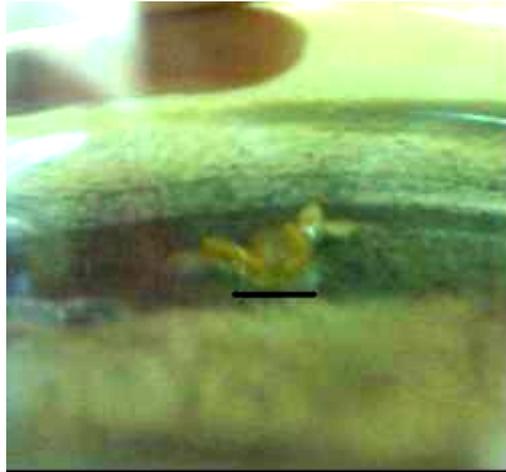


Figura 4. Fotografía de un corte de *Heliconia psittacorum* var choconiana. obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada, sembrado en el tratamiento numero 1, en el experimento 2, donde se puede observar los primeros estadios del desarrollo por organogénesis directa en la tercera semana después de su inoculación. (Escala 1 cm).

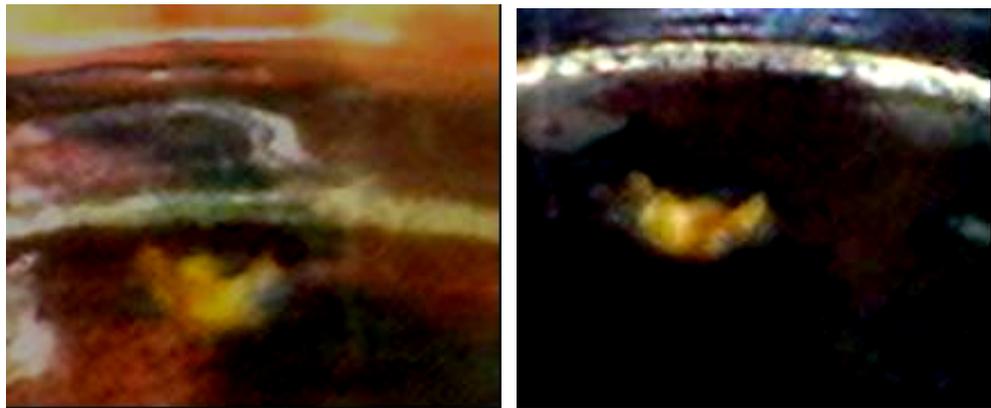


Figura 5. Fotografías de un corte de *Heliconia psittacorum* var choconiana. obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada, sembrado en el tratamiento numero 1, en el experimento 2, donde se puede observar un aumento en el numero de brotes por organogénesis directa en la cuarta y quinta semana después de su inoculación. (Escala 1 cm).

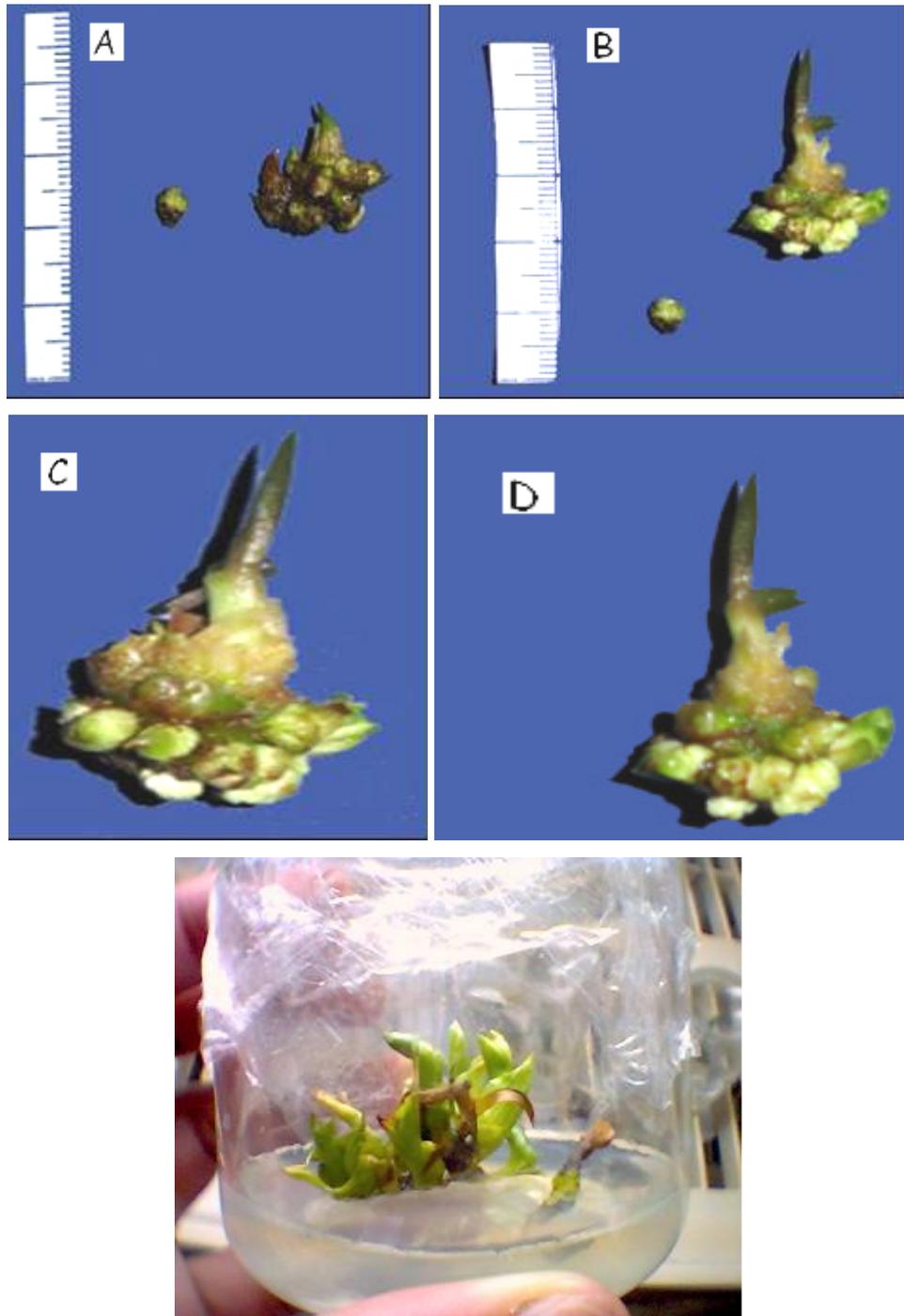


Figura 6. Brotes de *Heliconia psittacorum* var choconiana obtenidos mediante la técnica de sección transversal delgada; en estadios de desarrollo mas avanzado a través del proceso de organogénesis directa en la semana octava (A, B) y novena (C,D), en el tratamiento numero 1, en el experimento 2, donde se puede observar una comparación entre el tamaño inicial del corte y el tamaño que adquiere cuando ya posee un gran numero de brotes. (Escala 1 cm)

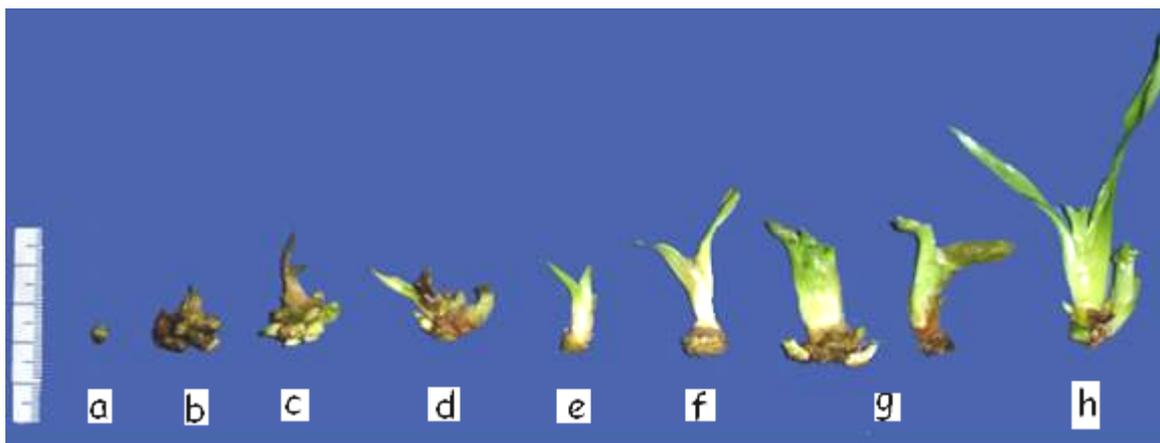


Figura 7. Esquema comparativo entre los diferentes estadios del desarrollo de los Brotes de *Heliconia psittacorum* var choconiana producidos por organogénesis directa; empezando por el corte que se realiza en la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells), hasta obtener una planta casi completamente regenerada. a) corte segunda semana b) octava semana c) novena semana d) onceava semana, después de la fragmentación del corte para separar los brotes; e,f,g,h corresponden al proceso de regeneración con una duración de ocho semanas. (Escala 1 cm)



Figura 8. Ejemplares de plantas de *heliconia psittacorum*. var choconiana que finalmente fueron regeneradas a través del cultivo *in Vitro*.

7.2. ANALISIS ESTADISTICO

Tablas de contingencia.

Tabla 2. Resumen de los datos arrojados en el recuento del numero de explantes de *Heliconia psittacorum* var. choconiana, obtenidos mediante la técnica de sección transversal delgada (TCS) que se mantienen vivos en los tres tratamientos.

	Casos					
	Validos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Regeneración/ tratamiento	90	100%	0	0%	90	100%

Tabla 3. Tabla de contingencia de regeneración v.s tratamiento de la frecuencia de regeneración de los explantes de *Heliconia psittacorum* var. choconiana obtenidos mediante la técnica de TCS, y donde se puede observar que en el tratamiento numero 1, hay mayor cantidad de explantes regenerados que en los tratamientos números 2 y 3.

			Tratamiento			Total
			1	2	3	
Regeneración	NO	Recuento	2	20	20	42
	SI	Recuento	28	10	10	48
Total		Recuento	30	30	30	90
		F.esperada	30	30	30	

ANOVA de un factor

Tabla 4. Prueba de ANOVA, realizada con los datos obtenidos en el recuento del número de brotes producidos de *Heliconia psittacorum* var. choconiana mediante la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) en cada uno de los tratamientos.

		Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F	Significancia
Número de brotes semana 4.	Inter-grupos	30.489	2	15.244	29.256	***
	Intra-grupos	45.333	87	0.521		
	Total	75.822	89			
Número de brotes semana 5.	Inter-grupos	67.222	2	33.611	38.510	***
	Intra-grupos	75.933	87	0.873		
	Total	143.156	89			
Número de brotes semana 8.	Inter-grupos	249.956	2	124.978	69.108	***
	Intra-grupos	157.333	87	1.808		
	Total	407.289	89			

Dado que los datos se ajustan a curva normal y son paramétricos se realiza la prueba de significancia estadística, de análisis de varianza (ANOVA), esta prueba indica una significancia alta entre los tratamientos, por tanto al menos uno de los tres tratamientos es diferente.

Para saber cual de los tres tratamientos es diferente y más eficiente para la producción de brotes de *Heliconia psittacorum* var. choconiana mediante la técnica de sección transversal delgada, se realizan unas pruebas estadísticas post, (Scheffé), en las semanas 4, 5 y 8 después de haber inoculado el explante.

Pruebas post.

Tabla 5. Prueba de Scheffé, donde se compara el numero de brotes producidos en los tres tratamientos en la semana 4, donde se muestra que no hay diferencia entre los tratamientos 2 y 3, pero si en el numero 1 mostrando ser el mejor de ellos.

Numero de brotes 4 semana

Scheffé ^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
2	30	.40	
3	30	.47	
1	30		1.67
Sig.		.938	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30.000.

Tabla 6. Prueba de Scheffé, donde se compara el numero de brotes producidos en los tres tratamientos en la semana 5, donde se muestra que no hay diferencia entre los tratamientos 2 y 3, pero si en el numero 1 mostrando ser el mejor de ellos.

Numero de brotes 5 semana

Scheffé ^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
2	30	.57	
3	30	.57	
1	30		2.40
Sig.		1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30.000.

Tabla 7. Prueba de Scheffé, donde se compara el numero de brotes producidos en los tres tratamientos en la semana 8, donde se muestra que no hay diferencia entre los tratamientos 2 y 3, pero si en el numero 1 mostrando ser el mejor de ellos.

Numero de brotes 8 semana

Scheffé ^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
3	30	.67	
2	30	.80	
1	30		4.27
Sig.		.929	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30.000.

Por medio de la prueba de Scheffé, en las semanas 4,5 y 8 después de haberse inoculado el explante, puede observarse que el numero de brotes producidos por los medios de cultivo numero 2 y 3, son similares y no presentan diferencias significativas; pero además en el medio de cultivo numero 1 se puede observar la diferencia que existe con los dos medios anteriores, esto se puede afirmar por una cantidad mayor en la producción de brotes; por tanto el medio de cultivo numero 1 muestra una mayor eficacia en la regeneración de la planta.

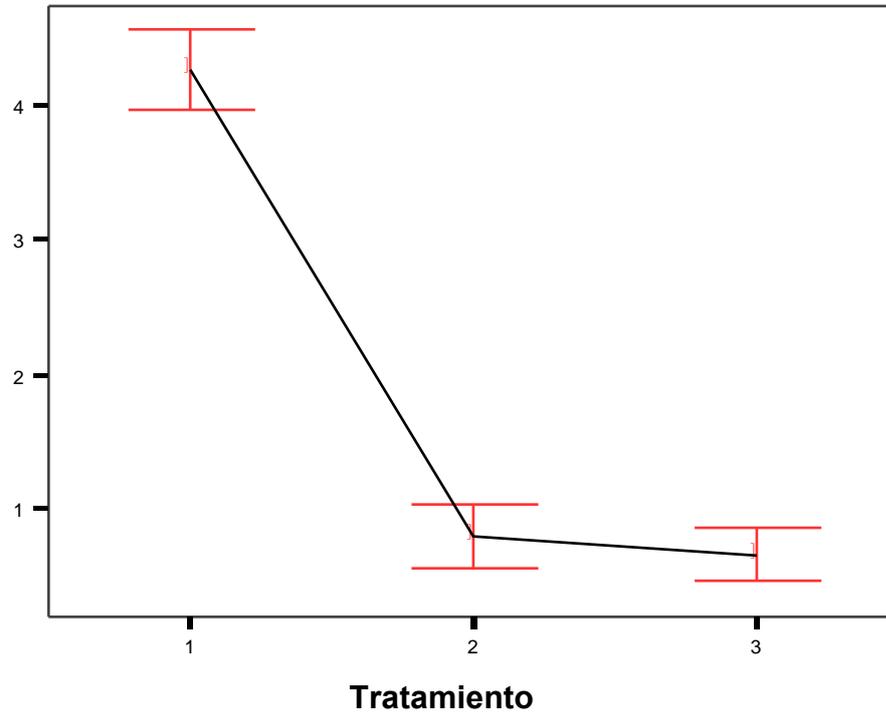


Figura 9. Comparación entre en número de brotes presentes en *Heliconia psittacorum* var. choconiana a la octava semana en los tres tratamientos usados para la evaluación de la técnica de sección transversal delgada, aquí puede observarse que el tratamiento numero uno en comparación, con el dos y el tres es significativamente mas eficiente.

7.3. MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONSERVACION DE LAS PLANTAS DE *Heliconia psittacorum* var. choconiana. OBTENIDAS MEDIANTE LA TECNICA DE SECCION TRANSVERSAL DELGADA.

El medio de cultivo seleccionado para la conservación de las plantas *in vitro*, que fueron obtenidas a través de la técnica, fue seleccionado por una serie de ensayos realizados, en los cuales se varió la concentración de los reguladores de crecimiento, principalmente el regulador BAP (Benzil-amino-purina) y algunos de sus otros componentes.

Para realizar la selección se observó las plantas, y se tuvieron en cuenta características tales como: color, tipo de crecimiento, supervivencia, y la presencia o ausencia de necrosamiento en los órganos de la planta.

Medio de cultivo A: En este medio de cultivo la concentración 3mg/L del regulador de crecimiento BAP (benzil amino purina) y el uso de Agar – Agar 7% muestra características desfavorables para el desarrollo de la planta (ver tabla 8).



Figura 10. Brotes de *Heliconia psittacorum* var.choconiana inoculados en el tratamiento A evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).

Medio de cultivo B: En este medio de cultivo la concentración del regulador de crecimiento BAP (benzil amino purina) se incrementa a 4mg/L y se usó como agente gelificante Agar – Agar 6%. Con características menos favorables para el desarrollo de la planta , en comparación con el anterior tratamiento (ver tabla).

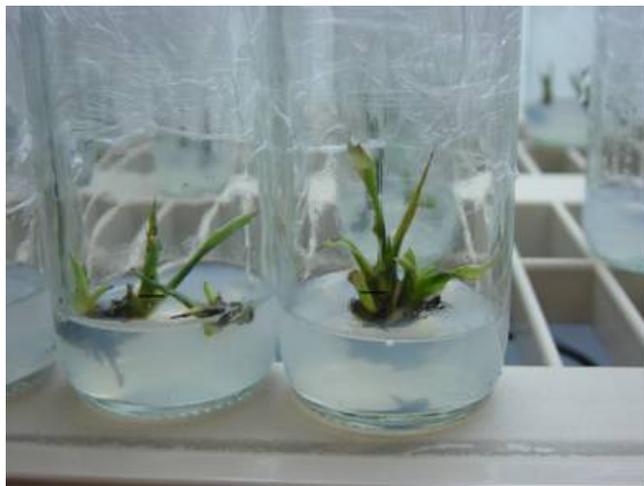


Figura 11. Brotes de *Heliconia psittacorum* var.choconiana inoculados en el tratamiento **B** evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).

Medio de cultivo C: En este medio de cultivo se disminuyó la concentración del regulador de crecimiento; 2.5mg/L de BAP (benzil amino purina), y además se adicionó AIB (Acido indolbutirico) en una concentración 3mg/L, también se utilizó Gelrite en una concentración de 1.6 g/L como agente gelificante, y el pH fue ajustado a 5.8; este medio de cultivo presenta características mas favorables para la conservación del material vegetal.



Figura 12. Brotes de *Heliconia psittacorum* var.choconiana inoculados en el tratamiento **C** evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).

Medio de cultivo D: En este medio de cultivo se disminuyó la concentración de los reguladores de crecimiento; 2 mg/L de BAP (benzil amino purina), y 2mg/L AIB (Acido indolbutirico), se utilizó Gelrite en una concentración de 1.6 g/L como agente gelificante, y el pH fue ajustado a 5.7; este medio de cultivo, las plantas presentan características mas favorables para su conservación. Sin embargo como puede observarse en la tabla 8, aun persiste el necrosamiento en algunas de las hojas de las planta regeneradas.



Figura 13. Brotes de *Heliconia psittacorum* var.choconiana inoculados en el tratamiento **D** evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm).

Medio de cultivo E: en este medio se utilizó: Medio basal; MS (Murashige y Skoog 1962), enriquecido con 120 mg/L de tiamina, 80 mg/L de piridoxina, 100mg/L de ácido ascórbico, 40 mg/L de ácido nicotínico, con 100mg/L de Myo – Inositol, 30 g de sacarosa y 1.mg/L de la hormona BAP (benzil amino purina), AIB (Ácido indolbutírico) 1mg/L, Gelrite 1.6 g/L. pH:5.7. Finalmente, la concentración de los reguladores de crecimiento se disminuyeron a 1mg/L y además se adiciono al medio de cultivo ácido nicotínico; según lo observado en la tabla 8, este medio de cultivo presenta las características más deseadas para el desarrollo normal del material vegetal y su conservación.



Figura 14. Brotes de *Heliconia psittacorum* var.choconiana inoculados en el tratamiento **E** evaluado como posible medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada. (Escala 1 cm)



Figura 15. Condiciones que permiten realizar el cultivo *in vitro* de *Heliconia psittacorum* var.choconiana para la conservación de las plantas obtenidas mediante la técnica de sección transversal delgada “TCS” (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells).

Tabla 8. Características de las vitro plantas de *Heliconia psittacorum* var. Choconiana, en las que se evalúan características como: color, tipo de crecimiento, ausencia o presencia de necrosis; según estas características se propuso el mejor medio de cultivo para la conservación del material vegetal obtenido a través de la técnica de sección transversal delgada (TCS).

	Color de hojas	Tipo de crecimiento	Necrosis en hojas	Necrosis en otro tejido
Medio de cultivo A	Verdes	Normal (Lento)	10%	Ninguna
Medio de cultivo B	Verde claro	Plantas enanas	12%	3%
Medio de cultivo C	Verdes	Normal	10%	Ninguna
Medio de cultivo D	Verdes	Normal	8%	Ninguna
Medio de cultivo E	Verdes	Normal	2%	Ninguna

8. DISCUSION

Este estudio realizado en *Heliconia psittacorum* variedad choconiana, se basa principalmente en el principio de la totipotencialidad que es una característica fundamental, de las células vegetales y que permite regenerar toda una planta a partir de una pequeña célula o de un grupo de ellas. En el cultivo de los cortes transversales de *Heliconia psittacorum*, que básicamente consiste en cultivar una pequeña porción de células, provenientes del rizoma (Teixeira, 2003); se puede observar una gran exigencia de nutrientes para que el tejido se mantenga vivo, así como en la mayoría de los tejidos cultivados *in vitro* (Roca y Mroginski, 1983). Además la consistencia del medio de cultivo tiene que ser bastante blanda para permitir un desarrollo adecuado de los explantes.

Uno de los aspectos más importantes es la precisión en la concentración de los reguladores de crecimiento utilizados, ya que una alteración en estos produce cambios en el desarrollo del tejido, según los trabajos realizados sobre Heliconias las variaciones en la concentración de los reguladores de crecimiento pueden hacer que el explante presente la formación de un callo de células indiferenciadas (Goh et al, 1995) haciendo mas compleja la regeneración de la planta.

La concentración de reguladores de crecimiento utilizados en el presente estudio estuvo basada en los reportes de la literatura sin sufrir alteraciones de forma drástica; además estuvo soportado básicamente en los trabajos realizados de forma previa, por investigadores con una mayor trayectoria, en el cultivo *in vitro* de Heliconias y otro tipo de plantas, Goh et tal, (1995), Nayak et al, (2002).

Los resultados obtenidos en el primer experimento muestran que la concentración de reguladores de crecimiento Auxina – citoquininas promueven la elongación y

multiplicación celular, y permiten que el tejido produzca brotes pero no de la forma esperada, ya que la proporción en la producción de esta, sigue siendo, tal y como se reporta en la bibliografía en el año de 1992, cuando Goh, Chong-Jin., Marie J. Nathan and Prakash P. Kumar, realizan una publicación titulada: **High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum***, donde como su título lo indica la producción de brotes era aparentemente alta, esto indicando tres o cuatro brotes por explante.

De igual manera más adelante Goh (et al, 1995) realiza una nueva publicación titulada: **Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum***. En la revista *Scientia Horticulturae*; que fue la base de la idea del presente trabajo.

En el año 2002, Nayak, Nihar Ranjan; Sahoo, Susmita; Patnaik, Satyanarayan & Rath, Shiba Prasad, publican un artículo titulado: Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L). and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) en la revista *Scientia Horticulturae*, en donde se puede ver claramente que la producción de brotes por organogénesis directa en este tipo de orquídeas es mayor que la reportada para *Heliconia psittacorum*, ya que la producción de brotes en orquídeas de aproximadamente cuatro veces lo que se produce para heliconias. De modo que por lo anterior en este estudio se planteó utilizar como uno de los tratamientos para la implementación y optimización de la técnica, el mismo medio de cultivo que Nayak y sus colaboradores desarrollaron para este tipo de orquídeas.

Por otro lado, se propuso usar hipotéticamente un medio de cultivo como uno de los tratamientos y evaluarlo en la optimización e implementación de la técnica; pero que finalmente no produjo los resultados esperados, en ninguno de los dos experimentos. Este medio simplemente fue desarrollado con los aportes sobre el cultivo in vitro de plantas y la composición de medios de cultivo reportados por autores tales como: (Roca, y Mroginski, 1983) y (Goh et al, 1995).

Según el comportamiento observado en la producción de brotes en el primer experimento,

se planteo un segundo, donde se evaluaron los tres tratamientos utilizados en el primero pero con ciertas modificaciones en la concentración de los reguladores de crecimiento. Es así como el medio de cultivo propuesto por Goh et al 1995, y que se uso como uno de los tratamientos del primer experimento, fue modificado en cuanto a la concentración del regulador (2,4 – D), arrojando mejores resultados, en contraste con los objetivos planteados en un comienzo en el presente estudio. Según los análisis estadísticos anteriormente presentados, se puede ver claramente que la producción de brotes se incremento de una manera significativa con respecto a los demás tratamientos, en otras palabras quiere decir que el rendimiento en cuanto al porcentaje de regeneración y el numero de brotes que se producen por explante aumento notablemente en promedio 7, 8 y 9 brotes, con respecto al primer experimento y por tanto con respecto a lo que se reporta en las fuentes bibliográficas (Goh et al, 1995),(Goh et al, 1992), siendo este uno de los mayores aportes de este trabajo.

Según las pruebas de significancia estadística usadas para seleccionar el medio de cultivo mas adecuado para la regeneración in vitro de *Heliconia psittacorum*, mediante la técnica (TCS), se puede notar que de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) existe un alto grado de significancia, por lo tanto se puede deducir que al menos uno de los tres tratamientos es diferente; y por tanto fue necesario analizar los datos mediante la prueba de **Scheffé**, en las semanas 4, 5 y 8, después de haber inoculado los explantes en los respectivos tratamientos a ser evaluados.

Una de las características fundamentales, con respecto al mejor medio de cultivo (tratamiento numero1), como se puede ver en la tabla 3, es que los resultados que se obtuvieron están cerca de la frecuencia total esperada (30 unidades), por tanto esta por encima de los otros tratamientos en lo que corresponde a la eficacia como medio apropiado para la producción de brotes. Además como se mencionó anteriormente al realizar el análisis estadístico mediante la prueba de **Scheffé**, (ver tablas 5, 6 y 7) se puede ver claramente que el tratamiento numero 1, es diferente de los tratamientos numero 2 y 3, esto

es observado en el incremento del número de brotes producidos en este tratamiento, mientras que en los tratamientos 2 y 3, no hay una diferencia significativa y producen una cantidad inferior de brotes con respecto al mejor medio de cultivo (tratamiento 1).

Un aspecto para tener en cuenta es que la concentración del regulador de crecimiento utilizado es 1mg/L, esto debido a que en ensayos previos puede observarse que una concentración mayor del regulador de crecimiento 2,4-D, induce primeramente una formación de callo para luego de ahí obtener los brotes, haciendo más difícil la producción. Uno de los alcances de la técnica es que al usar una concentración menor de 2,4 – D (1 mg /L) en asociación del regulador de crecimiento BAP con una concentración de 1mg/L, 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 (figura 6), 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 pueden aislarse para ser cultivados en otro medio que les permita el desarrollo completo para obtener una nueva planta.

Por otra parte para la conservación del material vegetal obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada, según los ensayos realizados puede observarse que *Heliconia psittacorum* var. choconiana, como en la mayoría de las plantas, tiene una buena respuesta a los nutrientes que le brinda las sales del medio nutritivo, Murashige y Skoog (1962;MS), y además enriquecido con tiamina, piridoxina, ácido ascórbico, ácido nicotínico, Myo – Inositol, sacarosa y una concentración de la hormona benzil amino purina de 1 mg/L; y en un medio semisólido en el cual se usa 1.5 mg/L, Gelrite, como agente gelificante; este medio nutritivo brinda a la planta las mejores condiciones para que alcance su completo desarrollo con las características deseadas (ver tabla 8, figura 14, pag.50).

Finalmente, y en forma global el aporte principal de este estudio, es haber logrado los resultados deseados, ya que se observó un incremento en la producción de brotes por medio del proceso de organogénesis directa, en un número que oscila entre 7 y 8 brotes por corte; por tanto se puede afirmar, que la optimización e implementación de la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells), resulta exitosa, con posibilidades de seguirla mejorando y abriendo las 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.

9. CONCLUSIONES.

- Los cortes tomados del pseudotallo de *Heliconia psittacorum* a través de la técnica de sección transversal delgada “TCS” (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells), responden de una forma positiva, manteniéndose vivos y presentando 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) en una concentración de 1mg/L y Caseína hidrolizada.
- Los explantes de *Heliconia psittacorum*, obtenidos por medio de la técnica de sección transversal delgada (TCS) además de la precisión en la concentración de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP, pueden ser cultivados con los nutrientes brindados por la sales MS, (Murashige y Skoog 1962), estas permiten que el tejido se mantenga vivo y se desarrolle de una forma adecuada.
- Una concentración de 1mg/L de 2,4-D, hace que los tejidos de *Heliconia psittacorum* cultivados por medio de la técnica de sección transversal delgada se desarrollen por organogénesis directa, que representa un menor periodo de tiempo en la obtención de plantas totalmente regeneradas y además una disminución en el costo requerido para la producción.

- Para la conservación del material vegetal de *Heliconia psittacorum* var. choconiana obtenido mediante la técnica de sección transversal delgada "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells), el cultivo in vitro puede llevarse a cabo en un medio nutritivo que se basa principalmente en los macro y micro elementos brindados por las sales Murashige y Skoog (1962;MS), y además suplementado con tiamina, piridoxina, ácido ascórbico, ácido nicotínico, Myo – Inositol, sacarosa y reguladores de crecimiento: BAP (benzil amino purina) y AIB (ácido indolbutírico) en una concentración de 1 mg/L .

10. RECOMENDACIONES.

Para el cultivo in vitro de *Heliconia psittacorum* var. choconiana, por medio de la técnica de sección transversal delgada, puede tenerse en cuenta que el pseudotallo, es una región adecuada para la obtención de explantes para la regeneración del material vegetal. En el momento de manipular los pseudotallos para la obtención de los finos cortes, debe hacerse con cuchillas finas y totalmente esterilizadas para evitar la contaminación del material vegetal; ya que por su tamaño tiende a ser más susceptible y por tanto se debe tener la mayor precaución al manipular el material vegetal. Todo el procedimiento para obtener los explantes se debe hacer bajo cámara de flujo laminar y con las medidas más estrictas en cuanto a uso y manejo de un laboratorio de biotecnología vegetal.

Se debe tener cuidado en el momento de la preparación de los reguladores de crecimiento, pues cualquier error, en los cálculos para realizar conversiones de las unidades de medida, podría tener como consecuencia una alteración, en el desarrollo del explante y que difícilmente podría ser detectada.

Téngase en cuenta que el material que se obtiene mediante la técnica TCS, no debe permanecer más de ocho semanas en el mismo medio de cultivo, por tanto debe ser reemplazado por el medio donde el material permanezca viable y pueda alcanzar su mayor grado de desarrollo.

Las condiciones de luz, humedad y temperatura influyen, evidentemente en el desarrollo del explante, esto debe tenerse en cuenta para futuros estudios donde se pretenda llevar el material obtenido a su fase ex vitro, pues de lo contrario el cultivo podría fracasar en el estado de adaptación fuera de los frascos de vidrio.

Finalmente se tiene que seguir atentamente todas las recomendaciones y cada uno de los pasos para el cultivo in vitro de este tipo de plantas, además se debe tener un conocimiento mas o menos amplio frente al tema; es decir manejo del laboratorio, condiciones para la preparación de medios de cultivo y en general conocer condiciones optimas para poder llevar a cabo un experiencia de cultivos in vitro; para esto documéntese de material bibliográfico apropiado que será de gran utilidad para evitar errores graves; al final de este documento se encuentra una bibliografía que puede ser provechosa, para quienes deseen ahondar en el fascinante mundo de las Heliconias y su cultivo in vitro.

BIBLIOGRAFIA.

ATEHORTÚA, Lucia. Heliconia: A new challenge for The Colombian Floricultural Industry. In: Biotechnology and Development 1997, 20-22 p.

ATEHORTÚA, Lucia. y VALENCIA, Claudia.. Inducction of somatic embriogenesis in *Heliconia stricta*. 1999, 14 p.

ATEHORTÚA, Lucia., URREA, A.I., GIL, Uriel., VALENCIA, Claudia., CORRALES, M., CARMONA, A., y VALLEJO, A. Heliconia Tissue Culture. 1999, 16-17 p.

BERRY, F y KRESS W.J.. Heliconia: An identification guide. Smithsonian Institucion Press, Washinton, D. C. 1991.

BETANCUR, J y KRESS W.J.. Distribución geográfica y altitudinal del género Heliconia (Heliconiaceae) en Colombia. In: S.P. Churchill, H. Balsev, E. Forero & J.L. Luteyn (eds), Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forests, The New York Botanical Gardens, New York .1995, 513 – 523 p.

BROSCHAT, T.K. y DONSELMAN H.M.. Growing *Heliconia psittacorum* for cut flowers. Nurseryments Digest. 1984, 42 – 43 p.

CLAY, H.F. y HUBBARD J.C.. The Hawain Garden. Tropical Exotics. The University Press of Hawai. Honolulu. 1987, 143-173 p.

CRILEY, R.A. Propagation of tropical cut flowers: *Strelitzia*, *Alpinia* and *Heliconia*. Acta Hort. 226. 1988, 509 – 517 p.

DEVIA - A, W. Platanillos (Heliconia: Heliconiaceae) del departamento del Valle del Cauca, Colombia Cespedesia. 1994.

ESCALONA, F, Maciel. y RENAUD, J. Un manchado de las inflorescencias de heliconias. Fitopatol. Venez. 1992, 32 p.

EVERET, T.H. The New York Botanical Garden. Illustrated encyclopedia of horticulture. New York. EE.UU. Garland Publishing. Inc. 1981.

ECHEVERRY; B. E. First Colombian Heliconia meetings in Manizales. Bull. Heliconia Soc. Int. 1994.

GOH, Chong-Jin. MARIE J. Nathan y PRAKASH P. Kumar ., High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum* L.f. Plant Science 90 (1): 63 -71. 1992.

GOH, Chong-Jin. MARIE J. Nathan y PRAKASH P. Kumar. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. Scientia Horticulturæ 62(1-2): 113-120. 1995.

KRESS, W. J., BETANCUR, J. ROESEL C.S. y ECHEVERRY B.E. Lista preliminar de las Heliconias de Colombia y cinco especies nuevas. Caldasia 17(2): 183 - 197. 1993.

KRESS, W. J., BETANCUR, J. ROESEL C.S. y ECHEVERRY B.E. Heliconias llamaradas de la selva colombiana. Bogota, Colombia. 1999.

HENAO - S., M.I. Estudio preliminar sobre Micorrizas vesículo arbusculares (MVA) en *Heliconia marginata* y *H. platystachys*.. Tesis de pregrado Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 1995.

MARTINEZ; X. y GALEANO G. Los platanillos del medio Caqueta (las Heliconias y el Phenakospermum). Estudios en la Amazonia Colombiana VII, Tropenbos Colombia. 1994.

MONTGOMERY, R. Propagation of *Heliconia* from seeds. Bull. Heliconia Soc. Int. 1(2): 6- 7. 1986.

MORALES, L., G. Musaceae. Flora de Mutis, Instituto de Cultura Hispanica. Madrid. 1987.

MORALES, L., G. Una *Heliconia* nueva de Colombia. Phytologia 55: 14 – 16. 1984.

MURASHIGE y SKOOG, Physiology plant., 15, 473 – 497, 1962.

MAZA V.M. Fenología y ecología de *Heliconia laxa* (Heliconiaceae) en un bosque pluvial premontano (Guatapé, Antioquia, Colombia). Tesis de pregrado en Biología Universidad de Antioquia, Medellín. 1992.

NAYAK, Nihar Ranjan; SAHOO, Susmita; PATNAIK, Satyanarayan y RATH, Shiba Prasad Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L). and *Dendrobium nobile* Lindl. Orchidaceae) Scientia Horticulturae. 94, (1 - 2) 107 - 116. . 2002.

PREVAT, J. y B.K.HARBAUCH. Economic considerations and ornamental enterprise. Proc. Fla. State Hort. Soc. 98:131-134. 1985.

ROCA, W.M. y MROGINSKI, L. A Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. .Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT, Cali, Colombia. 1983, 20 p.

SIMMONDS, N. W. Family 1. Strelitziaceae: *Heliconia* L. vol 3(2): 4 - 9. Flora of Trinidad. Ministry of Agriculture, Industry and Commerce, Port of Spain, Trinidad and Tobago. 1967.

TEIXEIRA DA SILVA, Jaime A. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. Vol. 2 (12). African Journal of Biotechnology, December. 2003.

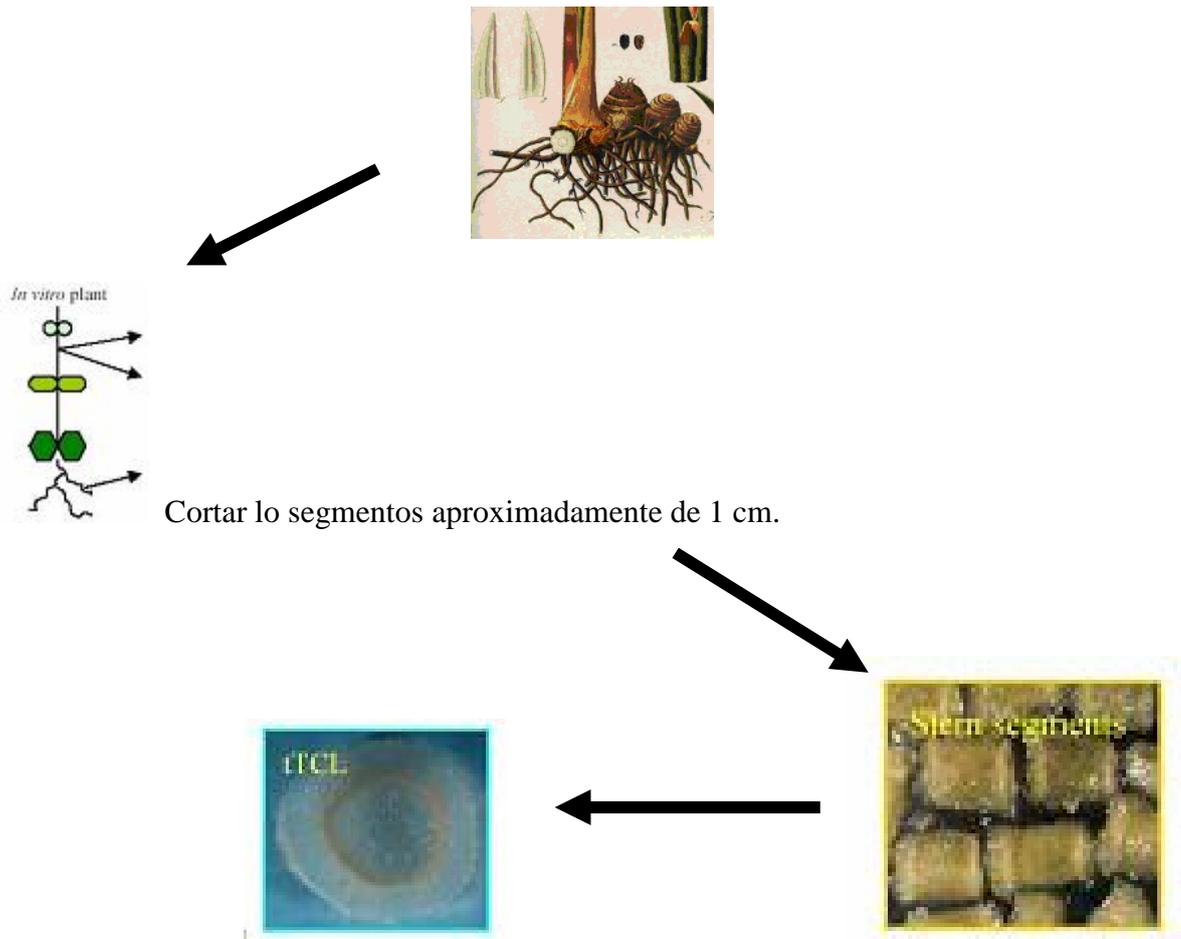
Heliconia humilis [on line] Tomado de la world wide web
<http://www.heliconiasocietypr.org/heliconias.htm>

Heliconia psittacorum [on line] Tomado de la world wide web
<http://www.birdsoftt.com/scenes%20info/heliconia.htm>.

Heliconia psittacorum [on line] Tomado de la world wide web
[http:// mgonline.com/heliconia.html](http://mgonline.com/heliconia.html).

ANEXO A

DESCRIPCION DE LA TECNICA DE SECCION TRANSVERSAL DELGADA "TCS" (Thin Cross Section) o "TCLs" (Thin Layer Cells) EN *Heliconia psittacorum* var. Choconiana



Cortar lo segmentos aproximadamente de 1 cm.

Obtener los cortes (TCLs) con un grosor aproximado de 0.5 a 1mm con ayuda de cuchillas finas.

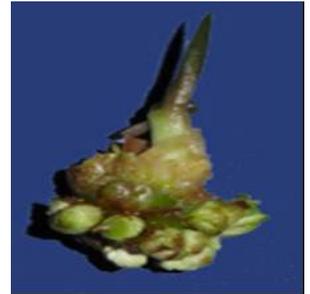
Luego realizar el Cultivo in vitro en el respectivo medio.



Producción de brotes por organogénesis directa



Cultivo *in vitro* de los cortes obtenidos por la técnica de TCS



Fragmentación o aislamiento de los brotes para ser regenerados en el medio de cultivo



Plantas de *Heliconia psittacorum* var *choconiana* regeneradas *in vitro*

