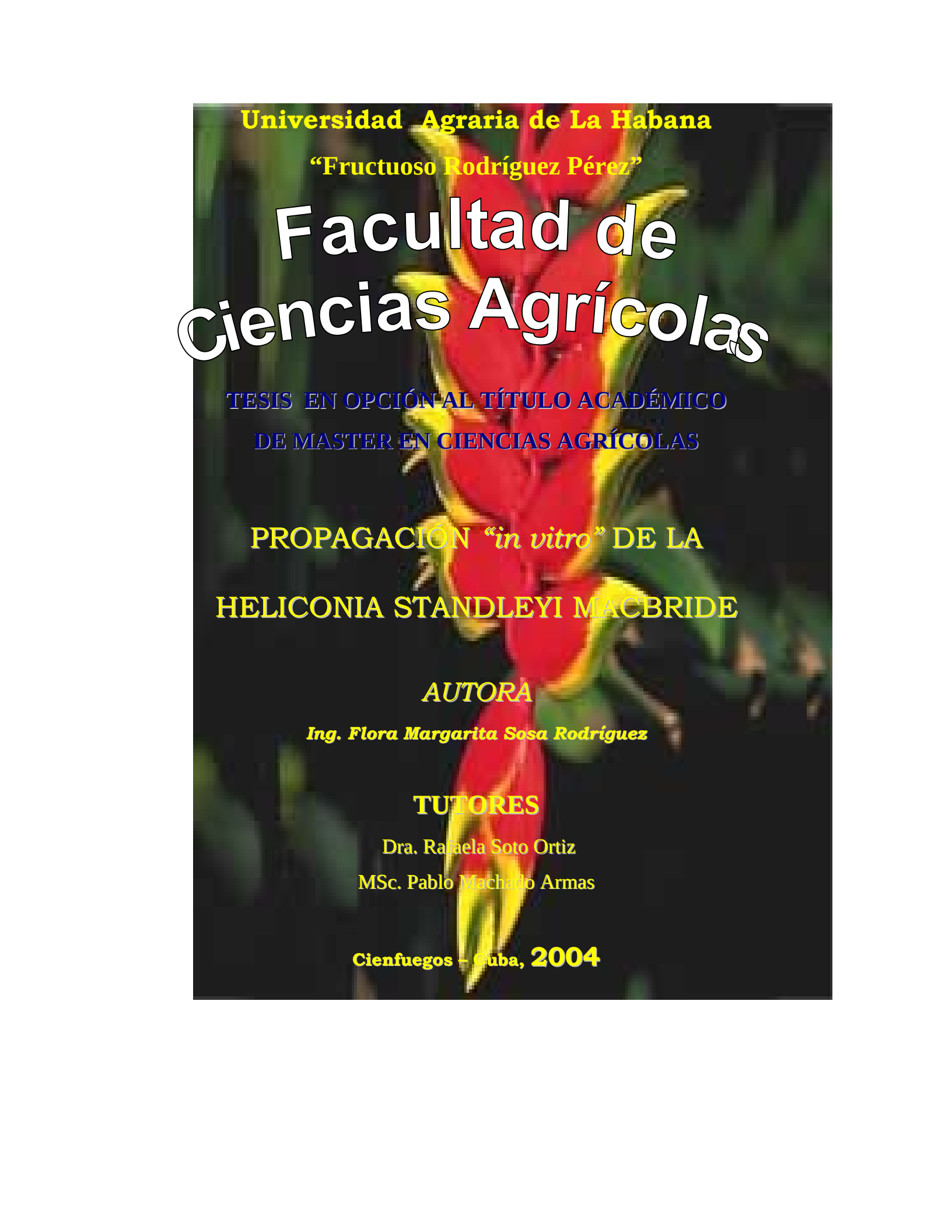




Universidad Agraria de La Habana

“Fructuoso Rodríguez Pérez”

Facultad de Ciencias Agrícolas

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO ACADÉMICO
DE MASTER EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**PROPAGACIÓN “*in vitro*” DE LA
HELICONIA STANDLEYI MACBRIDE**

AUTORA

Ing. Flora Margarita Sosa Rodríguez

TUTORES

Dra. Rafaela Soto Ortiz

MSc. Pablo Machado Armas

Cienfuegos – Cuba, 2004

INDICE

1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	3
2.1 Clasificación taxonómica. Características botánicas.....	3
2.2 Importancia de las <i>Heliconias sp</i>	5
2.3 Hábitats y distribución.....	6
o Elementos geobotánicas de las Heliconia	
o Luminosidad	
o Suelo	
o Agua	
o Temperatura	
o Vientos	
o Humedad	
o Manejo agronómico de las Heliconias	
o Crecimiento del rizoma	
o Cuidado de los rizomas	
o Hábitos de crecimiento del pseudotallo	
o Brácteas	
o Propagación	
2.4 Estado actual de la floricultura en el mundo	18
2.5 La floricultura en Cuba.....	29
2.6 Multiplicación “ <i>in vitro</i> ”	30
3. Materiales y Métodos	45
3.1 Fase I: Establecimiento.....	47
3.1.1 El hipoclorito de sodio en la desinfección superficial del material a iniciar	48
3.1.2 Estado físico del medio de cultivo en la fase de establecimiento.....	49
3.2 Fase II: Multiplicación	49
3.2.1 Efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento de 6-BAP	
Con AIA en la multiplicación de <i>H. standenleyi</i>	49
3.2.2 Influencia del estado físico del medio de cultivo en la fase de multiplicación	50
3.2.3 Influencia del manejo de los explantes en la fase de multiplicación.....	51
3.2.4 Influencia de la densidad de explantes por frascos	51
3.3 Fase III: Enraizamiento	51

3.3.1 Efecto de los reguladores del crecimiento y sacarosa en la fase de enraizamiento " <i>in vitro</i> "	51
3.3.2 Influencia del manejo de los explantes y estado físico del medio en la Fase de enraizamiento " <i>in vitro</i> "	52
3.4 Fase IV: Aclimatización	53
3.4.1 Comportamiento de las plantas " <i>in vitro</i> " en la fase de aclimatización	53
4. Resultados y Discusión	55
4.1 Fase I: Establecimiento.....	55
4.1.1 El hipoclorito de sodio en la desinfección superficial del material a iniciar	55
4.1.2 Estado físico del medio de cultivo en la fase de establecimiento.....	57
4.2 Fase II: Multiplicación	58
4.2.1 Efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento 6-BAP Con AIA en la multiplicación de <i>H. standaleyi</i>	58
4.2.2 Influencia del estado físico del medio de cultivo en la fase de Multiplicación.....	59
4.2.3 Influencia del manejo de los explantes en la fase de multiplicación.....	60
4.2.4 Influencia de la densidad de explantes por frascos	61
4.3 Fase III: Enraizamiento	62
4.3.1 Efecto de los reguladores del crecimiento y sacarosa en fase de enraizamiento " <i>in vitro</i> "	62
4.3.2 Influencia del manejo de los explantes y estado físico del medio de cultivo en la fase de enraizamiento	63
4.4 Fase IV: Aclimatización	65
4.4.1 Comportamiento de las plantas " <i>in vitro</i> " en la fase de aclimatización	65
5. Conclusiones	69
6. Recomendaciones	70
7. Bibliografía	71
8- Abreviaturas	79
Anexos	+++++

RESUMEN

La *Heliconia* es una especie hortícola, muy llamativa, pues su inflorescencia tiene un bonito colorido, es muy duradera lo que las hace muy demandadas como flores cortadas.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de establecer una metodología que permitiera la propagación comercial de la *Heliconia standleyi macbride*, para ello se estudiaron variantes de desinfección, los medios de cultivo y el manejo de los explantes en las diferentes fases de la micropropagación. Los resultados mostraron que con el empleo de hipoclorito de sodio al 2%, durante 15 minutos se logró una alta eficiencia en la desinfección de los ápices.

Con la combinación de 6 bencilaminopurina (1.0 mg.l^{-1}) y el AIA (0.1 mg.l^{-1}) en el medio de cultivo fue posible lograr una alta regeneración y crecimiento de los ápices.

En la fase de multiplicación se evidenció un efecto positivo de los reguladores del crecimiento, el manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo sobre el crecimiento de los explantes y el coeficiente de multiplicación. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de 6-BAP (2.0 mg.l^{-1}) con AIA (0.65 y 1.3 mg.l^{-1}). Subcultivando los explantes mayores 1.0 cm individualmente y el estado físico semisólido.

Una influencia significativa sobre el número de raíces y el crecimiento de los explantes se obtuvo con la adición de ácido indolacético al medio de cultivo de enraizamiento y utilizando para el subcultivo explantes mayores de 3.0 cm . La calidad de los explantes también influyó de forma significativa en los resultados de la fase de aclimatización quedando demostrado que las plantas “*in vitro*” provenientes de la fase de enraizamiento deben tener 3.0 cm o más de altura.

INTRODUCCIÓN

La industria de las flores es un sector que cambia con rapidez en el panorama hortícola internacional, por lo que se han evaluado muchas especies de flores nuevas para la producción comercial, y ha sido necesario emprender trabajos de investigación básicas, pues algunas no son bien conocidas y el mercado exige más variedad.

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

Durante las décadas recientes ha habido un gran aumento en la cantidad de cultivos de flores de corte, y en las diversas maneras de producirlas. Nueva Zelanda ha sido especialmente innovadora en estos aspectos (**Cronquist, 1981**). Un ejemplo de estos cultivos lo constituye la **Heliconia sp.**

En Cuba el volumen y la calidad de la producción se ha venido mejorando desde el año 1967 y en la actualidad tiene grandes perspectivas en cuanto a la obtención de calidades y volúmenes, que aseguren una sólida producción, que permita abastecer, de forma adecuada el mercado internacional de flores frescas, así mismo orientar sus pasos hacia el desarrollo de la producción de semillas de las mismas hasta ahora dependiente de las importaciones.

Dentro de la diversidad de flores que se producen y se comercializan en el país las **Heliconias sp** ocupan un lugar importante pues sus brácteas son muy llamativas por sus vibrantes colores y las inusitadas formas de las diferentes especies y selecciones lo que hacen a estas plantas populares con el florista. Desafortunadamente muchos tipos de ellas han sido escasamente usados para decorar a pesar del largo periodo de tiempo en que mantienen su calidad las flores después de cortadas (dos o cuatro semanas).

Los volúmenes de producción que se logran en la actualidad, según **Álvarez (1999)** no satisfacen las demandas cada vez más crecientes del mercado.

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

Por otro lado la propagación agámica por división aunque garantiza al cultivador la homogeneidad de las plantas producidas y por lo tanto un crecimiento, floración y calidad uniforme; no garantiza los volúmenes necesarios de plantas para la plantación de las áreas de-

dicadas a este cultivo. No obstante es el método más utilizado en nuestro país. La propagación “*in vitro*” de esta especie ha sido escasamente abordada por lo que se encuentran muy pocos trabajos realizados con esta temática en la literatura. (Divo *et al.* 1994); (Olivera, 2000).

Las ventajas de este método es que permite obtener altos volúmenes de plantas en un periodo de tiempo relativamente corto, se logra una alta homogeneidad en las características fenotípicas y genéticas de la plantación (Krikorian, 1991) se eliminan la mayoría de los patógenos que afectan el cultivo en las condiciones naturales (Madriz, Noguera y Smits, 1989) y el rejuvenecimiento fisiológico del material vegetal por el efecto del cultivo de tejidos incrementan la calidad de las flores (Maciel, 1999) Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente se establece la siguiente hipótesis de trabajo:

“Es posible establecer una metodología para la micropropagación de la **Heliconia standleyi macbride**, que permita obtener grandes volúmenes de material de propagación para la plantación de las áreas dedicadas a estos cultivos”

Para dar cumplimiento a la hipótesis se trazan los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Establecer la metodología para la micropropagación de la **Heliconia standleyi macbride**

Objetivos específicos:

1. Determinar la dosis de desinfección y tiempo de exposición de los rizomas, así como los reguladores del crecimiento más adecuados para la fase de establecimiento.
2. Definir la composición adecuada del medio de cultivo y el manejo para las fases de multiplicación y enraizamiento.
3. Evaluar el comportamiento de las plantas “*in vitro*” en la fase de aclimatización.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Clasificación taxonómica. Características botánicas

La clasificación sistemática más reciente de las heliconias es la de **Cronquist (1988)** quien las ubica dentro del orden **zingiberales** junto a siete familias más (figura 1).

Familias afines a las Heliconias

Clase: **Liopsida** (monocotiledonea)

Superorden: **Zingiberanae**

Orden: **Zingiberales**

Familias	N Géneros	N especies
- Strelitziaceae	3	7
- Heliconiaceae	1	150
- Musaceae	2	42
- Lowiaceae	1	6
- Zingiberaceae	476	1000
- Costaceae	4	150
- Connaceae	1	50
- Maranthaceae	30	400

Las Heliconias son el único género en la familia de las **Heliconiaceas**, que es un miembro de un gran orden botánico llamado orden de los **Zingiberales**. Hay varias características que hacen de éste, un orden de fácil reconocimiento, entre esas características se puede incluir las hojas largas y grandes inflorescencias de vistosos colores. La mayoría de los taxónomos reconocen ocho familias en el orden de los **Zingiberales**, a saber: **Musácea** (los bananos y plátanos), **Strelitziacea** (aves del paraíso), **Lowiacea**, **Heliconiacea** (heliconias), **Zingiberacea** (los gingers); **Costacea** (Costus), **Cannacea** (las cannas y chirillas) y **Marantacea** (las calateas).

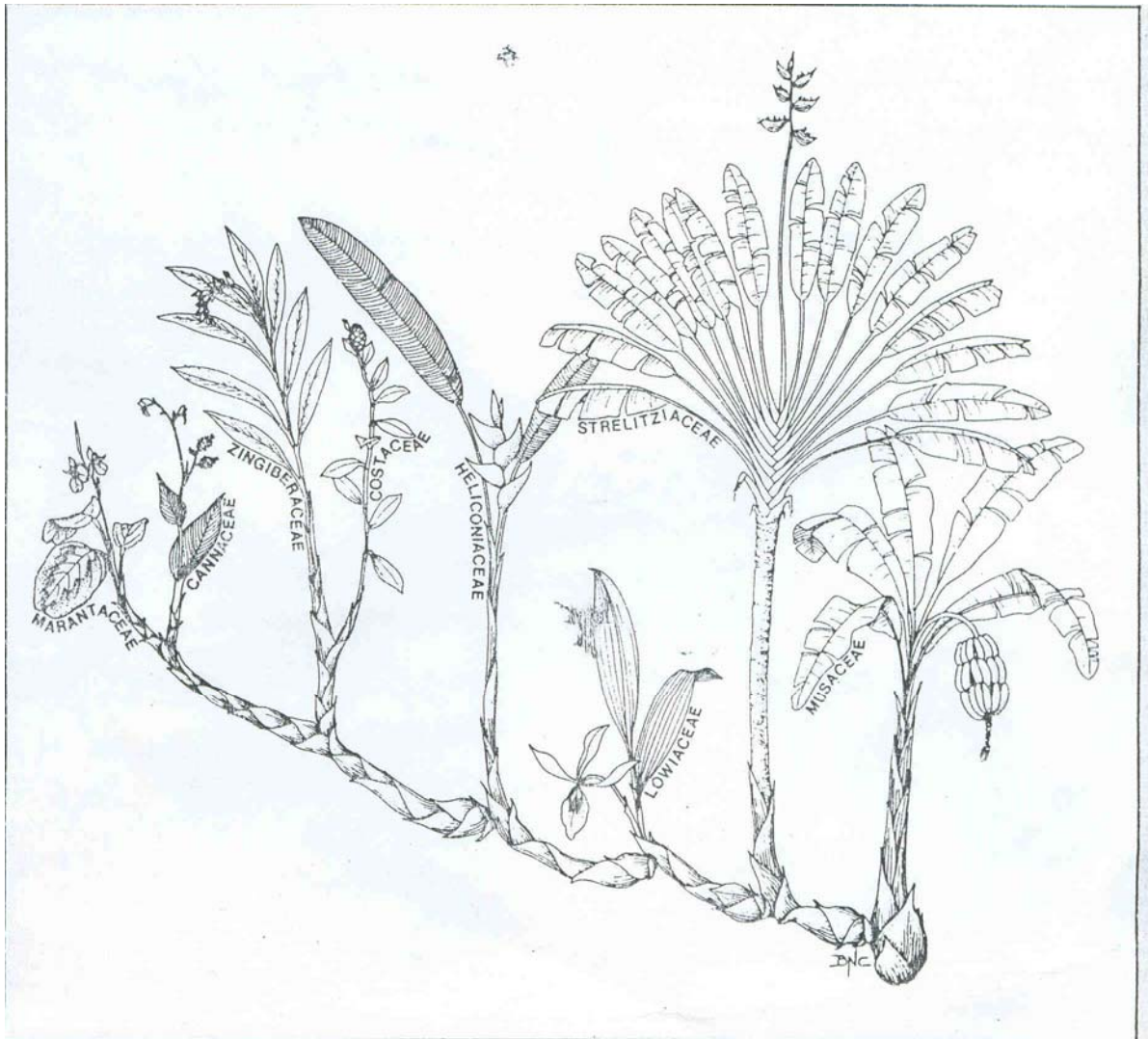


FIGURA 1.-Diagrama representativo de las familias afines a las heliconias.

Las Heliconias, son plantas de apariencia idéntica a los plataneros pero de porte menor, cuyas inflorescencias, coloridos racimos, son admirados por su belleza y utilizadas para elaborar llamativos arreglos florales (**Vargas, 2002**).

Del género *Heliconia* se han descrito cerca de 200 especies en el mundo, la mayoría de las cuales tienen origen en América tropical, y otras en el Indopacífico. En Colombia se tiene el registro aún parcial de 93 especies, lo cual convierte al país en el más rico del mundo en diversidad de estas plantas (**Devia, 1995**).

En Cuba se conocen algunas especies, se han realizado trabajos pero hay que seguir profundizando en ellos e introducir nuevas variedades y estudiarlas (**Tropical Gardening, 1999**).

Resulta notable, además, que de las especies colombianas, 48 son exclusivas de alguna región dentro del territorio nacional, endemismo que se concentra principalmente en la zona andina.

El nombre genérico evoca el monte griego Helicón, consagrado a las musas de la poesía. Se trata de plantas de climas cálidos y templados, que crecen principalmente sobre terrenos húmedos, al borde de las cañadas, sea en el sotobosque o en playas recién formadas sobre las riberas de los ríos. Las inflorescencias pueden ser péndulas o erectas, con predominio de tonalidades rojas y amarillas, como es el caso de la **Heliconia standleyi macbride** cuya inflorescencia es pendular, (**Berry and Kress, 1998**).

Las hojas se usan artesanalmente para la envoltura y conservación de alimentos, en particular carne y queso, gracias a su consistencia fibrosa y la acumulación natural de sales de calcio que actúan como preservantes.

Es una planta ideal como ornamental para sembrar en fincas o antejardines, al borde de cañadas o lagunas. Como flores de corte tienen la ventaja de tener una prolongada duración, ya que pueden permanecer frescas hasta por un mes.

Estas plantas representan un excelente ejemplo de recurso vegetal promisorio y nos ofrece una clara y concreta oportunidad de poner en práctica el concepto de manejo sostenible de nuestra biodiversidad, en el cual la investigación científica, la conservación, la protección legal y la comercialización tendrían que actuar de manera integrada (**Edgar Jardinería, 2000**).

2.2 Importancia de las Heliconias sp.

Las Heliconias son plantas asombrosas por la belleza de sus flores. Cualquier persona que viaje por los trópicos no puede dejar de notar estas largas y conspicuas plantas cuando están floreciendo. A pesar de que estas hermosas flores son nativas solo del centro, Sur de América y algunas islas del Pacífico Sur, su cultivo no es muy difícil y su exuberante belleza las ha convertido en plantas favoritas de los jardines tropicales. También se han convertido en flores de cortes muy populares especialmente en aquellos países en donde pueden ser cultivadas (**Schwartz, and Blumenthat, 2001**).

En Cuba son empleados en algunos casos cuando tienen a su alcance las flores en arreglos florales y distintos tipos de decoraciones, pero aún se cuenta con muy poca diversidad de ellas (**Fuentes, 2003**).

La importancia principal de este grupo taxonómico está en su popularidad como plantas ornamentales, por lo llamativo de sus inflorescencias, siendo a la vez, una característica importante para distinguirlas en el campo, dado su colorido y su forma. Su crecimiento aglomerado las hace una especie apta para la protección de laderas erosionadas y nacimientos de quebradas. También se aprovechan con arte y gracia en los jardines modernos, utilizándose para formar senderos laterales a las entradas de las haciendas y fincas de recreo (**Kress, 1998**).

2.3 Hábitat y Distribución

La gran mayoría de las especies habitan en regiones húmedas y lluviosas, pero algunas pocas se pueden hallar en zonas secas. Aunque la mayoría de ellas alcanzan su máximo esplendor vegetativo en las zonas bajas y húmedas de los trópicos, a elevación por debajo de los 1500 pies de altura, un gran porcentaje de las especies suelen encontrarse en elevaciones medias. Las especies más llamativas suelen habitar en zonas abiertas de crecimiento secundario, en las orillas de los ríos, bordeando las carreteras o en zonas abiertas en la selva.

Según **Cronquist (1988)**, existen más de 100 especies de Heliconias distribuidas en las regiones tropicales del mundo; incluye 19 especies para Venezuela; **Styler (1983)** reportó 37 especies para Costa Rica; describieron 45 especies nuevas, 35 colombianas y 10 ecuatorianas; **Kress (1998)** reportó 50 especies para Sudamérica y 19 especies péndulas para Panamá; **Criley (1998)** estima entre 120 y 250 especies de Heliconias en los trópicos. El número de especies para Colombia se estima en más de 100, pero se cree que este número es mayor, lo que se podrá apreciar al incrementar los trabajos de campo y realizar los tratamientos respectivos. **Kress (1998)** dan las listas preliminares de las heliconias de Colombia. Para el valle del Cauca se pueden estimar que tienen 50 o más especies distribuidas a lo largo de su territorio administrativo (**Criley, 1998**).

Se ha evidenciado también que con el incremento de la destrucción del bosque Pluvial Tropical, muchas especies de estos hábitats han invadido y colonizado estas nuevas

áreas desforestadas. Durante este proceso, otras especies no logran adaptarse a estos cambios y van siendo restringidas a las pocas áreas cubiertas que van quedando de los bosques primarios. Estas especies son generalmente endémicas localmente y corren el riesgo de desaparecer a medida de que el bosque primario va siendo reducido. (**Keppler, 1999**).

Sobre la distribución geográfica de las especies de este género, se tiene un importante artículo escrito por **Betancourt y Kress (1998)**. Otros trabajos hacen distribución de especies basados en observaciones puntuales o generalidades que se hacen con relación al grupo como tal. Se consideran que las Heliconias tienen una mayor abundancia en alturas a los 500 metros, pero tiene una mayor diversidad de especies entre 500 y 1400 metros; especialmente en las vertientes pacíficas y amazónicas del sistema andino. Pocas especies crecen por encima de los 2000 metros de altura y el mayor endemismo está en las elevaciones medias de zonas húmedas, entre 800 y 1500 metros. (**Kress, 1998**). De acuerdo a las regiones naturales de Colombia, las heliconias se distribuyen principalmente en tres categorías: la región Andina, con una diversidad alta de especies (74% de las especies), región pacífica y amazónica, con diversidad media de especies (31% y 23% del total de las especies), región Caribe y Orinoquías, con una diversidad baja de especies (14% y 11% del total de las especies). (**Maciel, 2003**). De acuerdo al número de especies por área de cada región geográfica, la más diversa es la costa del pacífico, seguida por la región Andina, luego la región Caribe, Amazónica y Orinoquías. La región pacífica es el segundo centro de concentración de especies de Heliconias en Colombia. Esto está relacionado por la preferencia que tienen estas plantas por los ambientes húmedos.

De las 184 especies del género Heliconias descritas en el mundo, 93 se reportan en Colombia, convirtiéndose así, en la región del mundo con más de la cuarta parte (26%) de todas las especies del mundo y que según **Andersson (1996)** este patrón de diversidad, con alta concentración de especies en el noroeste de Suramérica, sugiere que el origen del género se localiza en esta misma región. La distribución de las Heliconias en el departamento del Valle del Cauca (Colombia) según **Pierik (1995)** está dada por factores como la altitud, la temperatura y la precipitación.

Maciel (1999) plantea que el comportamiento de cada especie en particular difiere marcadamente. Entre sus miembros, existen especies que únicamente se localiza en orillas de ríos, como sucede con especies de la costa del Pacífico. Otras especies tienen amplia distribución a lo largo de franjas ecológicamente similares, ejemplo, **H. griggsiana**. Se distribuye en las franjas de los 1300 a 2000 metros en las dos Cordilleras que cruzan el Valle del Cauca, con una mayor presencia en las zonas más húmedas de cada franja. **H. huilensis**, se distribuye en la franja húmeda de los 1800 a 2200 metros de las dos Cordilleras (Central y occidental de los Andes). Otras especies presentan diferentes tipos de agrupación; unas se conglomeran formando grandes manchas de la misma especie: **H. latispatha**, **H. Griggsiana**, **H. Montana**. Otras tienen una presencia, casi esporádica: **H. mutisiana**, **H. cordata**. En general la tendencia de la mayoría de las especies es la de tener una alta presencia a lo largo de una quebrada o un sitio específico con determinadas características ecológicas, con poca presencia en los sectores aledaños. Según **Schwartz and Blumenthal (2001)** los posibles factores de este comportamiento son los patrones de movimiento de los polinizadores diseminadores de semillas y los requerimientos ecológicos de las mismas. Generalmente las Heliconias no se encuentran dentro del bosque primario, prefieren zonas abiertas dentro del bosque, buscando aprovechar al máximo las horas luz. **(Kepler, 1999)**. Estos factores, en cierto modo facilitan el estudio de este grupo de plantas. La radiación solar influye directamente sobre los procesos metabólicos que determinan el crecimiento y desarrollo, así como la producción.

Otro factor determinante para algunas especies es el drenaje. En **H.intermedia**, y **H.regalis** se puede apreciar que tiene un mejor desarrollo en áreas de mucha humedad, incluso crecen muy bien sobre montículos de tierra bañadas por los arroyos de las quebradas.

En la zona intertropical solo se presentan épocas de lluvias y épocas de sequía, ya sea de tipo unimodal (una zona de humedad alternando con una seca) o de tipo bimodal (dos zonas de humedad alternando con dos épocas secas). Como un ejemplo de lo anterior se tiene el caso de Colombia en donde los regímenes climáticos de tipo unimodal o bimodal dan las pautas para conocimiento y posterior manejo de las especies en mención.

Se puede observar que en las regiones donde predomina el tipo unimodal la mayoría de las Heliconias se encuentran donde la zona de humedad es larga y alterna con una seca muy corta (ejemplo, región fitogeográfica del chocó); en ella la temperatura promedio es de 26° - 28° C, la humedad relativa oscila entre 80 y 95%, la precipitación varía entre los 4 000 y 9 000 mm y la altura sobre el nivel del mar está comprendida entre 0 y 1 000 metros. Al pasar dentro del mismo régimen climático a una zona húmeda alternando con otra zona seca más o menos igual, el número de especies va disminuyendo debido a la época de sequedad, la cual actúa como desfavorable.

El carácter higrófilo también se puede encontrar en las altitudes medias en donde la precipitación es mayor de 2000mm anuales en los ecosistemas de montaña y es precisamente ese carácter el factor más importante que se considera como punto de partida, para adelantar estudios en Colombia sobre heliconias y por que no decirlo con sus relacionados del orden **Zingiberales**, ya que el desarrollo de rizomas, tamaño, número y coloración de las inflorescencias depende dentro de un ecosistema a los parámetros climáticos, entre ellos la luz. Prueba de ello es que no son muchas especies que dentro de la selva neotropical inferior están en completa sombra, la mayoría están en lugares abiertos, pero las horas de sol promedio no pasan de seis, al contrario del carácter tropófilo o xerófilo en donde las horas de luz son mayores, pero que va a tener una estación desfavorable (época seca) lo que se traduciría en una desventaja de tipo fisiológico para el desarrollo del vegetal. **(Maciel, 2003)**.

En Cuba se ven algunas especies en las zonas montañosas aunque hay en lugares llanos, y pequeñas plantaciones en jardines particulares. **(Fuentes, 2003)**.

El viento también actúa sobre los procesos metabólicos, la fotosíntesis, la transpiración, además provoca daños morfológicos como pueden ser el rasgado foliar, la eliminación de porciones de la hoja, doblamiento de las plantas por elseudotallo y destrucción de la plantación por volcamiento.

Cuando los vientos son fuertes pueden causar la destrucción de los cultivos, muchas veces se colocan paralelos con la dirección predominante del viento para prevenir estos desastres.

Cada especie tiene diferentes requerimientos de iluminación, pero en general puede decirse que prefieren pleno sol o sombra parcial. A plena exposición necesitan más

agua y fertilizantes además de ser más susceptibles a deficiencias por elementos menores; bajo estas condiciones de iluminación crecen en forma más vigorosa y producen mayor número de inflorescencias. Hay que anotar que la mayoría de las especies colombianas endémicas y con potencial comercial crecen bajo sombra. **H. psittacorum** es una de las especies más comercializadas, con mayor número de variedad y tal vez la especie más estudiada por su fácil manejo y ser de tamaño pequeño. Cuando son cultivadas a plena exposición, con buena fertilización producen 130 flores/metro/año (durante el primer año). Si la luz se les reduce en 37%, el promedio de producción disminuye a 35 flores/metro/año. **H. stricta** variedad “Dwarf Jamaica” requiere de 13 a 19 semanas con noches largas para producción de flores. La intensidad de la luz parece ser uno de los grandes limitantes en la producción de las heliconias. Estas se comportan mejor en la luz brillante pero no a pleno sol, aunque son razonablemente adaptables a condiciones de sombra. Hay que anotar que muchas de las especies colombianas endémicas y con potencial ornamental crecen bajo sombra, a plena exposición solar necesitan más agua y fertilizantes; bajo las condiciones de luz brillante crecen de forma más vigorosa y producen mayor número de inflorescencias. **H. psittacorum** es una de las especies más comerciales, con mayor número de variedades y tal vez la más estudiada por presentar inflorescencias pequeñas y de fácil manejo. (Berry & Kress, 1998).

Datos sobre porcentaje de luz y sombra de algunas especies y cultivariedades de heliconias en Colombia. (Kress, 1998).

Especies Variedad – Exposición Porcentaje

Heliconia caribea cv. Gold.	Pleno sol hasta 40%
Heliconia bihai cv. Lobster Claw One.	Pleno sol hasta 30%
Heliconia wagneriana	Pleno sol hasta 40%
Heliconia orthotricha cv. Edge of Nite.	Pleno sol hasta 50%
Heliconia reticulata	Sombreado 30-75%
Heliconia psittacorum cv. Chconiana	Pleno sol hasta 50%
Heliconia lasiorachis	Pleno sol hasta 30%
Heliconia lingulata cv. Fan	Pleno sol hasta 40%
Heliconia episcopalis	Pleno sol hasta 70%

Heliconia vaginalis	Pleno sol hasta 40%
Heliconia longiflora	Pleno sol hasta 50%
Heliconia aemygdiana ssp. Aemygdiana	Pleno sol hasta 60%
Heliconia lalispatha cv. Red-Yellow Gyro	Pleno sol hasta 50%
Heliconia latispatha cv. Orange Gyro	Pleno sol hasta 50%
Heliconia spathocircinata	Pleno sol hasta 40%
Heliconia mariae	Pleno sol hasta 50%
Heliconia rostrata	Pleno sol hasta 50%
Heliconia mutisiana Cuatr.	Pleno sol hasta 50%
Heliconia dielsiana	Pleno sol hasta 50%
Heliconia longa	Pleno sol hasta 50%
Heliconia standleyi	Pleno sol hasta 50%
Heliconia nigripaefixa	Pleno sol hasta 30%
Heliconia vellerigra	Pleno sol hasta 50%
Heliconia pendyla cv. Bridght Red	Pleno sol 20-40%
Heliconia platystachys	Pleno sol hasta 40%
Heliconia marginata	Pleno sol hasta 30%
Heliconia griggsiana cv. Angry moon.	Pleno sol hasta 40%
Heliconia curtispatha	Pleno sol hasta 30%
Heliconia trichocarpa	Sombreado 30-70%
Heliconia latispatha	Sombreado 40-70%
Heliconia schumanniana var. Basirubra.	Pleno sol hasta 60%
Heliconia stiletioides.	Sombreado 40-70%

Como base de ello, se espera que para el establecimiento de Heliconias se debe tener en cuenta el factor de reemplazabilidad, que no es otra cosa sino el de aportar aumento o disminución de un parámetro climatológico en un lugar donde existe un déficit o superávit de dicho parámetro; por ejemplo; usando umbráculos o simular un bosque en aquella zona cuyo régimen es de tipo unimodal pero con una temperatura seca muy larga o de tipo bimodal. También el factor lluvia deficitario seria reemplazado por el uso de riesgo y el encharcamiento seria reemplazado por el drenaje. En el caso de in-

roducción de especies de otras zonas de latitudes diferentes a las del país se debía aplicar el factor de reemplazabilidad latitud por altitud **(Tropical Silk Plants, 2004)**.

La heliconia debe crecer en sitios abrigados pero con iluminación, buena humedad, buen drenaje y ayuda de fertilizantes. Estas plantas necesitan cuidado, especialmente porque pueden presentar problemas por deficiencias en elementos nutritivos menores. Los requerimientos generales de suelo, riego y fertilización se tratan a continuación: Las raíces viven y fusionan dentro del suelo, estos difieren en propiedades químicas y físicas, profundidad, edad y origen, pero tienen una serie de características comunes ya que están compuestos por partículas de diferentes clases y tamaños, poseen sustancias solubles en agua, contienen aire y humedad y con el hábitat de una serie de microorganismos.

Las partículas minerales en los suelos varían desde microscópicas como las arcillas, hasta partículas burdas como arena y grava. Las características de las partículas son importantes para determinar el volumen del espacio de aire en el suelo, la cantidad de agua retenida y la cantidad de soluto disponible.

Las partículas de piedras son fuente de algunos elementos nutritivos indispensables para el desarrollo de las plantas como calcio, magnesio, hierro, fósforo, zinc y otros (microelementos). **(Maciel, 1999)**.

Las partículas de arcilla contienen iones nutritivos como calcio, magnesio y potasio que son fácilmente absorbidos por los pelos radiculares. Los suelos arcillosos se anegan muy fácilmente y no contienen una buena reserva de humedad. Casi todos los suelos donde las Heliconias crecen en forma natural (nativos) son amarillos, muy arcillosos y bastante húmedos, pero se han observado creciendo en suelos arenosos e inclusive sobre piedras tipo arcillas pizarrosas. **(Tropical Silk Plants, 2004)**.

Los pH analizados para 20 especies oscilan entre 3.5 y 7, las concentraciones de fósforo para esos suelos están entre 0.49 y 2.99 ppm. **(Gage y Strong, 1981)**.

El aire disponible en el suelo es importante para la respiración de las raíces y está relacionado directamente con los procesos de absorción de agua y elementos nutritivos. Una aireación inapropiada del suelo se puede manifestar en poco crecimiento de raíces y causar además trastornos fisiológicos e inclusive la muerte de la planta. El oxígeno

en el suelo es importante además para la actividad de algunas bacterias, hongos y lombrices que mediante su actividad proporcionan nutrientes a la planta.

Hay que tener en cuenta además la disponibilidad de dióxido de carbono ya que éste ayuda a la absorción de los iones a partir de las partículas de arcilla por las raíces, un exceso de dióxido de carbono puede inhibir el desarrollo de raíces.

En condiciones naturales, las heliconias se encuentran en todo tipo de suelos especialmente en suelos arcillosos y ocasionalmente poco drenados, con una característica generalizada de pH ácido a neutro (3.5 a 7), nunca en los suelos básicos. Cuando van a ser cultivados necesitan suelos ácidos (pH 5.0 a 6.0) y bien drenados, ya que el exceso de humedad permite la aparición de bacterias que atacan los rizomas causando su pudrición. Se recomienda una mezcla de suelos, arena y compost en proporciones de 1:1:2. La arena tiene como función darle la posibilidad de drenaje al suelo de modo que puede ser reemplazada por arenón, cascarilla de arroz y roca volcánica bien molida. Si se va a utilizar cascarilla de arroz debe añadirse en gran cantidad ya que se va descomponiendo y el suelo comienza a descompactarse. La arena puede ser esterilizada al horno por 30 minutos o lavándola con hipoclorito, luego se enjuaga bien y se deja secar al sol durante dos días. **(Edgar Jardinería, 2000)**. La poca aireación del suelo es una causa grave de ruptura de raíces y desordenes nutricionales en la mayoría de las especies, por lo que es necesario mantener suelos sueltos. Especies como **H. psittacorum** y la variedad “Golden torch” no crecen en suelos alcalinos o con poco drenaje. **(Maciel, 1999)**.

La preparación del compost puede hacerse colocando una capa de residuos vegetales y animales en el sitio seleccionado; colocar sobre esta una capa de cal y encima una de tierra para evitar el mal olor; encima colocar una capa de residuos, otra de cal y otra de tierra, hasta conformar una pila con la altura deseada. Se cubre con un plástico para evitar la humedad excesiva. Antes de utilizarlo debe comprobarse que la temperatura no sea muy elevada.

En caso de tener que adicionar fertilizante al suelo en que se va a sembrar, este debe ser en proporción de 10:1 (diez partes de suelo por uno de fertilizantes). Si las Heliconias se cultivan en macetas, es necesario tener en cuenta el tamaño de la planta, las más pequeñas pueden sembrarse en macetas de 15-25 litros, las más grandes en pots

de 50 litros con drenaje rápido, aunque hay especies que viven muy bien en suelos con poco drenaje. Si se van a cultivar en camas es aconsejable una mezcla de 50:50 arena-abono. Si se piensa en un sembrado a nivel comercial las Heliconias deben ser sembradas en camas limitadas por una barrera sólida, con una profundidad de 30cm. por 90cm. de ancho para las especies pequeñas (tipo **H.psittacorum**) y de 50 cm. por 120cm para las especies de mayor tamaño. **(Criley, 1998)**.

De otro lado, es importante saber que las Heliconias por presentar un rizoma, característico propio de las monocotiledóneas o liliópsidas, este órgano vegetativo requiere de unos suelos con buena porosidad, una estructura granular, texturas de tipo franco arenoso, franco arcilloso o franco arenoso arcillosos y buen contenido de materia orgánica, además acompañados de una buena capa de humus para que dicho rizoma pueda tener un buen desarrollo y pueda acumular nutrientes los que resultan en una buena confección de la planta; así los suelos que ellas prefieren o están adaptadas a los de tipo ácido (pH 4-6-8) características de las zonas muy húmedas, es decir, las Heliconias no soportan suelos pesados, completamente arcillados y con pH superior a 7, no toleran suelos salinos. Al aplicar el factor de reemplazabilidad, las enmiendas o abonos tenderán a lograr básicamente el mejoramiento de las propiedades físicas de los suelos **(Edgar Jardinería, 2000)**, comportándose de forma similar en Cuba. **(Términos Taínos-B, 2001)**.

El stress por falta de agua se nota por el enrollamiento longitudinal de las hojas. La mejor forma de riego es la aspersión con cabezas instaladas a nivel de suelo, ya que el agua penetra uniformemente a través del follaje más denso y este permite mantener la humedad en el suelo. **(Auerbach y Strong, 1991)**.

En áreas muy secas la humedad del suelo puede conservarse usando mantas de materia orgánica esparcidas por la superficie del área cultivada. Estos mantos son útiles porque reducen el crecimiento de plantas indeseables y añaden elementos nutritivos a los suelos sobre los que se esparcen.

El exceso de humedad puede reducir el número de inflorescencias producidas por la planta. **Edgar Jardinería (2000)** recomiendan que en sitios con buen drenaje las Heliconias deben ser regadas cada dos o tres días, pero las áreas densamente plantadas ne-

cesitan agua diariamente. En macetas deben regarse con más frecuencia, especialmente cuando tienen muchas raíces.

Siempre que se vayan a realizar estudios para el establecimiento de especies de Heliconias, primordialmente se tendrá en cuenta el hábitat natural de ellas, involucrándose la parte fitogeográfica con el fin de aplicar bien el factor de reemplazabilidad y lograr el éxito que se desee alcanzar al respecto. **(Auerbach y Strong, 1991).**

La temperatura no debe ser menor de 17°C ni mayor de 30°C, considerándose como óptima 22°C. Por debajo de los 16 grados se produce latencia de meristemos, paralización de la emisión foliar, detención del crecimiento, deterioro de la flor y si son temperaturas menores de 10 grados, la muerte. **(Términos Taínos-B, 2001).**

Manejo agronómico de las Heliconias

Crecimiento del rizoma

El crecimiento y distribución del rizoma en el espacio del sitio, hace variar la distancia y dirección entre los nuevos brotes y vástagos, que serían en forma erecta u oblicua dividiéndose en cuatro grupos:

- ✓ *Esparcido*: los pseudotallos brotan muy separados debido a que el rizoma crece de 20 a 40 cm paralelo a la superficie del suelo, normalmente se da para especies que crecen en lugares muy húmedos como la **Heliconia episcopalis**.
- ✓ *Semiesparcido*: Crecen un poco separados pero en menor proporción que el esparcido y algunas veces los brotes son en zig – zag o formando una línea. Es muy característico de especies que crecen a libre exposición como **Heliconia latispatha**.
- ✓ *Agrupado*: Los pseudotallos crecen unos cerca de otros, al cabo de un tiempo van formando un círculo a nivel del suelo (**Heliconia griggsiana**)
- ✓ *Muy agrupado*: Es un rizoma compacto y los pseudotallos se desarrollan en forma muy agrupado, normalmente es de especies que se adaptan a suelos muy pendientes (**Heliconia mutisiana**), **(Fred and Kress, 1999).**

Cuidado de los Rizomas

Los rizomas de cada especie son diferentes, varían en colores, masa, formas y tamaños pero en promedio se puede hablar de masa de 450 gramos.

Al sembrarlos directamente a la tierra en épocas lluviosas o en bolsas plásticas en épocas de verano, de ser posible se coloca en la parte superior del rizoma una copa desechable o algo que lo protege para disminuir el riesgo de pudriciones.

En sus primeros meses las heliconias son muy susceptibles a la luz directa del sol por lo que se colocan en un sitio en semisombra, si después se van a sacar a pleno sol, se debe realizar este proceso lentamente para evitar lesiones por el golpe del sol.

Se mantiene húmedo el sustrato y libre de malezas por lo menos los primeros cinco meses, después de este período la planta va creando un miniecosistema húmedo a nivel de la raíz que la protege en las épocas secas. **(Maciel, 1999).**

Hábitos de crecimiento del pseudotallo

Según la forma en que se disponen las hojas en el pseudotallo y la longitud del pecíolo, se clasifican en tres tipos de crecimiento vegetativo en las Heliconias.

- ✓ *Musoide*: Hojas con pecíolos muy largos y su posición es vertical u oblicua (plátanos)
- ✓ *Cannoide*: Pecíolos cortos y posición oblicua (achiras)
- ✓ *Zingiberoide*: Sin pecíolos o muy cortos y en posición perpendicular al pseudotallo (Ginger).

Bracteas

Son hojas modificadas en forma del bote que cubren en su interior un cincino de flores que surgen del mismo punto de la inflorescencia, cada cincino de estos está conformado por unas pocas o muchas flores y estas son hermafroditas, siendo las partes más vistosas de la Heliconia de colores primarios o mezcla de colores. Las inflorescencias son erectas o péndulas y las bracteas pueden estar en forma plana o elípticas.

Las flores en sí son insignificantes; las partes que todos creen que son las flores, como se ha referido ya, son bracteas coloridas que envuelven a las flores. Son los vibrantes colores y las inusitadas formas de las diferentes especies lo que las hacen populares con el florista. La longevidad de las flores es de por lo menos siete días, y aumenta a 14 al aumentar el tamaño de la flor.

Cuando están creciendo vigorosamente, las plantas de *Heliconia* son precoces, produciendo hasta 400 tallos capaces de florecer, por metro cuadrado cada año. Los tallos florecientes se producen durante un largo período del año. **(Schwartz, and Blumenthal, 2001).**

Las flores se cosechan cuando están casi abiertas y es necesario empacarlas en envolturas que retengan la humedad y que soporten los tallos para evitar que se dañen en tránsito. Las flores de *Heliconia* pueden sufrir daño por temperaturas de poscosecha demasiado bajas, las cuales serían normales para otros tipos de flores de corte y de follaje. **(Criley, 1998).**

Propagación

Para propagar las *Heliconias* se deben tener en cuenta algunos detalles tales como: seleccionar diferentes variedades de *Heliconias* para su explotación, ubicarlas en diferentes pisos térmicos o altitudes para poder sostener mercados, las plantas se ralean y propagan por división de sus brotes rizomatosos de la base o por semillas a pesar de que se ha usado la micropropagación en ciertos cultivares para su multiplicación más rápida.

Las *Heliconias* son plantas hermafroditas, por lo tanto si se desea en terminado momento obtener semilla botánica es indispensable la presencia de los polinizadores. En los trópicos americanos los colibríes son los polinizadores exclusivos de las *Heliconias* rojas, amarillas, rosas y naranjas, los murciélagos que se alimentan de néctar son los polinizadores de las *Heliconias* verdes. **(Schwartz, and Blumenthal, 2001).**

Para los aprendices en esta materia se recomienda comenzar propagando en macetas, lo que le dará más posibilidades de un principio exitoso. Cuando haya producido varios brotes será el momento de dividir las plantas o ponerlas en un tiesto más grande. **(Criley, 1998).**

Para dividir los rizomas pueden hacerse en tantas partes como rizomas tenga, si se propaga por semillas se utiliza un recipiente poco profundo con suelo humedecido y se colocan las semillas a un cuarto de pulgada en el suelo, manteniendo la humedad constante, así como en un área soleada con temperaturas tibias. Cuando las semillas germi-

nen lo que tarda de uno a doce meses, se llevan a un área menos soleada, hasta que estén en condiciones de ser transplantadas.

Al utilizar rizomas de áreas de cultivos espontáneos o de viveros, deben lavarse bien con agua y jabón, sumergidos o fumigados con un pesticida y posteriormente se hace lo mismo con un fungicida sistémico. Esto reducirá los riesgos de presencia de bacterias y hongos, los que afectarían la brotación de los rizomas; los mismos se entierran a unos centímetros y entre cuatro a ocho semanas en dependencia de la época del año brotarán.

(Vargas, 2002).

2.4 Estado actual de la floricultura en el mundo

La floricultura a nivel mundial es un negocio de grandes proporciones. El avance de las comunicaciones y el desarrollo de los tráficos han impulsado fuertemente esta actividad en el último decenio.

Según **Mercados verdes (2003)** la importancia económica que alcanza la floricultura en el mundo es verdaderamente incalculable, pues la producción de flores se ha convertido en un negocio rentable dentro del sector agropecuario, dicha actividad cumple un papel muy importante en la solución de necesidades básicas de cualquier país, como es la generación de empleos.

Países como Colombia, Israel, Tailandia, Kenia, Ecuador y Nueva Zelanda, que en la década del 80 no figuraban en el concierto de las naciones productoras de flores, se han convertido hoy en día en grandes exportadores.

Los grandes consumidores son los países más desarrollados del planeta: Estados Unidos, Japón, Alemania, Francia, Suiza, Italia y Noruega. La expansión del consumo de flores está íntimamente ligada al mejoramiento de las condiciones económico, social y cultural de los pueblos. La tendencia del mercado, según expertos de todas las naciones, está en franca expansión, poniéndose como ejemplo que en el próximo quinquenio, Finlandia quintuplicaría su consumo per cápita, Alemania y Holanda lo duplicarían, al igual que Estados Unidos.

En Europa el centro neurálgico de la comercialización son los países bajos.

Holanda se caracteriza por ser un país productor, importador y exportador; en muchos casos es el canal de importaciones de terceros países para futuras exportaciones.

Principales países consumidores y exportadores

El consumo mundial por países a nivel precios consumidor se distribuye de la siguiente manera:

Principales países consumidores

País	millones U\$\$
Estados Unidos	6.024
Japón.....	5.734
Alemania.....	3.239
Francia	1.512
Gran Bretaña.....	1.083
España.....	560
Holanda.....	555

Las exportaciones se realizan en todas direcciones, no se distinguen grandes de pequeños mercados. Es posible en la actualidad que el consumidor adquiere flores provenientes de Holanda o Francia en Perú o Estados Unidos.

Principales países exportadores

País	millones U\$\$
Holanda.....	2.153
Colombia	395
Israel	146
Italia.....	111
Tailandia	67
Kenia.....	61
España.....	52
Zimbabwe	28
Francia	28
Ecuador.....	25
Nueva Zelanda.....	18
Singapur.....	18

El mercado floral de la Unión Europea está caracterizado por las diferencias entre los mercados individuales de los países miembros. Por un lado la demanda depende del tamaño de la población de cada país y por otro por el consumo per cápita en cada uno. Desde un punto de vista general es mayor el consumo en los países del norte respecto de los mediterráneos, siendo Alemania el mayor consumidor europeo. El incremento en las ventas de flores en Europa ha sido constante en los últimos años. El consumo actual es del orden de los 14 000 millones de U\$\$ anuales. El pronóstico para el año 2008 de la Flower de Holanda muestra un incremento del consumo de flores en todos los países.

En Suiza, un país no miembro de la Unión Europea, se registra el mayor consumo per cápita de toda Europa: en el 2000 fue de 110 U\$\$ / habitante por año. El segundo gran consumidor es Noruega, otro país no miembro de la Unión Europea, con un consumo per cápita de 69 U\$\$.

Entre los países del mercado común el consumo varía mucho. En 1999 el consumo promedio fue de 64 U\$\$ / habitante, con mínimos para Portugal de 13 U\$\$, de más de 51 U\$\$ para Finlandia, Austria, Bélgica y Alemania. Mientras que en Holanda, Dinamarca, Suecia, Italia y Francia el consumo estuvo entre 25 y 50 U\$.

Como el crecimiento demográfico de los países mencionados no cambia significativamente en un corto plazo, el consumo total de cada país tiene el mismo perfil que el consumo per cápita. Se muestran a continuación las tablas del consumo total y consumo per cápita para los siguientes países europeos en el período 1995 – 2000 y su pronóstico para los próximos años. **(Noticias Finagro, 2000).**

Consumo total de flores cortadas en millones de ECU (1 Ecu = 1.27 U\$):

Países	Años						
	1990	1991	1992	1993	1994	1995	2000
Alemania	2.547	2.757	2.949	3.067	3.025	3.210	3.236
Italia	2.156	2.359	2.476	2.104	1.910	1.638	1.736
Francia	1.366	1.462	1.423	1.529	1.609	1.535	1.884
UK	928	908	897	937	965	934	1.093
Suiza			526	547	586	611	680
Holanda	492	471	511	557	590	595	631
España	386	448	479	452	449	44	569
Bélgica	270	303	313	329	346	404	497
Austria				386	375	363	405
Suecia	268				305	310	362
Finlandia					211	248	289
Noruega	220	224		215	223	241	294
Dinamarca		157		162	177	199	243
Grecia	145	143		136	137	138	206
Portugal				82	86	101	158
Irlanda						44	52

Fuente: Flower Council de Holanda

Consumo per cápita de flores en millones de ECU (1 Ecu = 1.27 U\$):

Países	Años						
	1990	1991	1992	1993	1994	1995	2000
Suiza		76	79	84	87	102	
Noruega	52	50	51	48	51	54	69
Finlandia					41	50	58
Austria				49	48	46	53
Bélgica	25	29	30	33	34	40	50
Alemania	32	35	37	38	37	40	41
Holanda	33	32	33	36	39	39	42
Dinamarca		31	32	31	34	38	47
Suecia	32			34	35	42	
Italia	34	41	43	37	33	29	30
Francia	25	26	26	27	28	27	34
UK	16	16	15	16	17	16	19
Grecia	14	14	14	13	13	13	20
Irlanda						11	10
España	10	12	12	12	12	11	15
Portugal				8	8	10	15

Fuente: Flower Council de Holanda

Las subastas holandesas pueden ser usadas como un indicador de las principales especies de flores cortadas vendidas en la unión Europea.

Principales mercados europeos

Los principales mercados europeos son: Alemania, Gran Bretaña, Francia, Holanda e Italia. Juntos manejan el 90% del total de importaciones de la Unión Europea.

Alemania ocupa una posición central en Europa Occidental con fuertes ligazones con los países del este. El mercado alemán resulta muy atractivo para la mayoría de las exportaciones. Con una importación total de flores y follaje de 1.058 millones de U\$\$ en 1999 y un consumo de 4.604 millones de U\$\$ durante 2000, la reunificada Alemania representa el mayor mercado y principal importador de flores y follaje de Europa.

No obstante la recesión económica las ventas han continuado creciendo aunque a menor velocidad. La integración con Alemania del Este ha agregado 16 millones de consumidores al mercado.

El consumo de flores creció de 3.175 millones de U\$\$ en 1995 a 4.064 millones de U\$\$ en 2000. El consumo per cápita está en el orden de los 51 U\$\$ anuales.

Francia es el mayor país de Europa occidental, está ubicada en el corazón del continente. Su rol como canal de comunicación con Gran Bretaña la convertirá en un proveedor central en los próximos años.

Con importaciones de flores de alrededor de 292 millones de U\$\$ y un nivel de consumo de 3.500 millones de U\$\$, Francia es el tercer principal mercado de flores de Europa. El mercado francés está orientado hacia altas calidades.

Holanda es un pequeño país de Europa; la tercera parte de su territorio está debajo del mar. Estas tierras han sido ganadas al mar mediante un extensivo programa de recuperación.

Su posición estratégica respecto de Bélgica, Luxemburgo y Dinamarca aseguran un próspero rol para Holanda en los próximos años.

El mercado holandés de flores debe ser visto en el contexto de su actuación dominante en el mundo de la comercialización. Su posición de líder la ha ganado por sus funciones de productor y concentrador de gran parte de la oferta y la demanda mundial a través de sus subastas, las cuales son manejadas con excelente eficacia en las operaciones de importación y exportación, como así también en su infraestructura.

Por otra parte, la floricultura holandesa se caracteriza por su calidad y cantidad. La investigación, la educación y la expansión son las causas de su constante crecimiento.

Italia. El mercado italiano de flores se caracteriza por un considerable mercado consumidor en gran parte satisfecho por productores nacionales.

Italia es el segundo mercado consumidor europeo luego de Alemania. En 1994 el consumo per cápita fue el mayor de toda la Unión Europea; a partir de allí ha ido disminuyendo. En 1999 el consumo total fue de 2.080 millones de U\$\$ y el consumo per cápita fue de 37 U\$\$.

Los mayores centros de consumo están ubicados en el Norte de las grandes ciudades del Centro y Sur. **(Noticias Finagro, 2000).**

Otros mercados europeos

Austria. A partir de mediados de la década del 90 el mercado austriaco de flores ha mostrado un constante crecimiento de aproximadamente 10% anual. En 1999 el consumo de flores fue de 461 millones de U\$\$ y el consumo per cápita de 58U\$\$.

Dado que la producción nacional es insignificante, Austria está considerada como un excelente mercado. El principal proveedor es Holanda y las flores más consumidas son: rosas, claveles, tulipanes, crisantemos, gerberas, gladiolos y lilium.

España. En 1999 España importó alrededor de 33 millones de U\$\$, un 5% menos que en 1998. Las principales flores importadas fueron: crisantemos, lilium, tulipanes, orquídeas y rosas.

Sus principales proveedores son Holanda y Colombia. Los centros de consumo más importantes: Madrid y Barcelona.

Dinamarca. El mercado de flores danés está muy bien desarrollado. El consumo del año 1999 fue de 23 millones de U\$\$, mostrando un incremento del 12% respecto al 1998. El consumo per cápita fue de 48 U\$\$ en 1998. Las flores son consideradas un regalo ideal tanto para festejos personales para ocasiones oficiales. En 1996, los tulipanes fueron el principal producto comprado por los consumidores daneses captando un 19% del total del mercado. Las rosas obtuvieron un 14% de las preferencias, seguidas por los crisantemos con un 5%.

Finlandia. A partir del ingreso a la Unión Europea en 1999, Finlandia experimentó un fuerte incremento en las flores cortadas. Como consecuencia el precio disminuyó entre 5% y 20%. El consumo total del año 1999 fue de 315 millones de U\$\$ y el consumo

per cápita de 64 U\$\$, el mayor de todos los países miembros de la Unión Europea. Las flores más populares fueron: rosas, tulipanes, claveles y crisantemos. Las importaciones fueron de 4.8 millones de U\$\$ en 1998: el principal proveedor fue Holanda (48%), seguido de Italia (14%), Colombia (12%), Israel (6%) y otros.

Noruega. En 1999 el consumo de flores cortadas fue de 306 millones de U\$\$ y el consumo per cápita de 69 U\$. Cabe señalar que Noruega no forma parte de la Unión Europea. Durante el primer trimestre del año los tulipanes son la especie floral más vendida; el resto del año el mercado es dominado por las rosas. En 1998, Noruega produjo 100 millones de tallo de diferentes especies florales, sobre un área total de 45 has, la mayoría bajo vidrio. Los principales productos cultivados son rosas, crisantemos, fresas, gypsophila y claveles. Noruega restringe la importación de productos florales a fin de proteger a sus productores; sin embargo se autoriza la importación de aquellos cuya producción local no satisface la demanda.

Suiza. Es otro país no miembro de la Unión Europea; sin embargo al estar situada en el corazón de Europa el mercado floral es muy importante. El consumo total ha ido aumentando a través del tiempo: en 1999 fue de 776 millones de U\$ y el consumo per cápita de 110 U\$, el mayor de Europa. Los principales productos consumidos en Suiza son : rosas, claveles y tulipanes. La superficie cultivada en 1998 fue de 336 ha., el 71% a cielo abierto. La exportación de flores frescas desde Suiza fue de 38 000 U\$ en el mismo año, en tanto que las importaciones en el año 1999 alcanzaron la suma de 193 millones de U\$, un 14% superior al año anterior. Sus principales proveedores son: Holanda (55%), Italia (16%), Francia (5%), Israel (3%) y Zimbabwe (2%). Cabe señalar que la oferta de Zimbabwe se duplicó entre los años 1996 y 1998. Condiciones de mercado: calidad, tratamiento poscosecha, envases. **(Noticias Finagro, 2000).**

Según **Mercados verdes (2003)** la calidad de los productos florales demandados por los consumidores europeos es extremadamente alta. Los estándares de calidad de la Unión Europea están definidos en la norma de 316/68 en la que se fijan los requerimientos mínimos para las flores cortadas. Sin embargo, los estándares más importantes y las normas que deben respetar los proveedores extranjeros están dados por las subastas holandesas, las cuales son más detalladas y específicas que cualquier otro mercado europeo.

Las subastas holandesas especifican las condiciones y estándares de calidad básicos para la inspección de toda la mercadería manejada por ellos.

El principal criterio respecto a la calidad, oferta y acondicionamiento. La Federación de Subastas Holandesas de Flores (VBN) utiliza unas planillas impresas tipo para el control de calidad, embalaje y procedencia de cada producto.

Las flores, que luego serán rematadas en la subasta, son examinadas por los inspectores de la misma y clasificadas en cuatro grupos: A1, A2, B1 y B2. El grupo B2, de menor calidad, no es aceptado para la subasta desde 1992 y todos los productos de esta clasificación son destruidos. Conjuntamente con las subastas holandesas, otros importadores de flores de la Unión Europea también tienen sus estándares de calidad “no escritos” para la importación de flores.

El cuidado y manejo desde la cosecha en el vivero y el despacho hacia el país importador es siempre el punto más delicado en la relación entre el importador y el productor. **(Tropical Silk Plants, 2004).**

Tratamiento poscosecha

Un apropiado cuidado poscosecha puede extender la vida de las flores exportadas. Las flores cortadas necesitan suficientes reservas de hidratos para desarrollarse completamente. Las flores cosechadas en el momento justo de maduración tienen suficientes reservas de hidrato de carbono, pero las flores inmaduras tienen escasez de reservas y de hormonas para llegar a su normal desarrollo. Por otro lado las flores cortadas demasiado maduras pueden ser muy sensibles al transporte y al etileno. La mayoría son cortadas en pimpollo y abren luego del almacenamiento, transporte o distribución.

Durante el transporte las flores experimentan efectos de falta de agua, oscuridad y ataques de hongos y bacterias patógenas.

El control de la temperatura es la medida más importante en el cuidado poscosecha, es el factor que provoca mayores pérdidas en la calidad de la flor cortada. **(COEXPORT, 2001).**

Generalmente las altas temperaturas aceleran las reacciones bioquímicas y en consecuencia la vida en vaso de las flores cortadas se reduce. Bajas temperaturas lentifican el desarrollo y el consumo de las reservas de hidratos de carbono. Además decrece la

producción de etileno y la sensibilidad y las cantidades de microorganismos patógenos. Una correcta temperatura debe ser mantenida durante toda la cadena de distribución. De no ser así todos los refuerzos y gastos para proveer las condiciones adecuadas en un determinado punto de la cadena pueden ser totalmente inútiles si en otro punto ocurre una pequeña falta de atención para mantener estos valores.

La temperatura óptima para la mayoría de las flores es cerca al punto de congelación, entre los 0° C y 5° C.

Los niveles de hidrato de carbono en las flores cortadas son mínimos y son consumidos a través de la respiración. Debido a altas temperaturas y posibles embolias en el sistema vascular no se recomiendan las cosechas al fin del día. Luego de la cosecha, la mayoría de las flores deben ser sumergidas en una solución de sacarosa; ello mejora su vida en vaso aunque favorece el desarrollo de ciertos microorganismos. La refrigeración es la solución más práctica. Otra posibilidad es controlar la atmósfera reduciendo el contenido de oxígeno, para disminuir la respiración y el consumo de hidratos de carbono.

Las flores con varas frondosas tienen una gran superficie y en consecuencia pierden agua rápidamente. Para prevenir ellos deben ser almacenados a 95% de humedad relativa.

En algunos casos es posible la rehidratación luego del almacenamiento seco. Cabe señalar que el almacenamiento en aguas duras, alcalinas, reducen la vida en vaso.

La limpieza es también una condición muy importante. Inmediatamente después de la cosecha las flores deben ser colocadas en recipientes limpios. Alguna condición desfavorable durante el envasado y/o transporte puede ocasionar el ataque de bacterias y la desvalorización consecuente de las flores. **(COEXPORT, 2001).**

Envases

El envase es usado para proteger a las flores cortadas de las exigencias del transporte como para crear un microclima favorable. Es otro factor determinante de la calidad del producto.

Diferentes materiales de embalaje pueden ser usados dependiendo del tipo de flores y de la función de protección e influencia sobre el microclima requerido. El envase pue-

de estar dividido internamente en paquetes envueltos en papel o material plástico y externamente adecuadas para ser estibadas en pallets.

La clase de embalaje a ser usado depende fundamentalmente del tamaño de la flor, de las exigencias del importador y de las condiciones del transporte.

El envase de las flores cortadas deben satisfacer un número de condiciones, principalmente relacionadas con el manejo y la protección de la calidad y la presentación.

El volumen a ser transportado debe ser tan eficiente como sea posible y es deseable un alto nivel de uniformidad. Para optimizar el transporte se recomienda el uso de cajas, cuya medida dependerá del tamaño de los pallets usados en la Unión Europea o en la compañía aérea. **(COEXPORT, 2001).**

Canales de distribución

Según **Noticias Finagro (2000)** cultivadores y comerciantes exportan flores cortadas y follaje a la Unión Europea, envían su mercadería tanto a importadores como a las subastas. Al respecto cabe señalar que las subastas holandesas juegan un rol muy importante en la comercialización de las flores destinadas tanto al mercado interno como a otros mercados europeos.

Los productos manejados por los importadores pueden ser vendidos directamente o enviados a una subasta. Los exportadores re-exportan los productos hacia otros países miembros de la Unión Europea, allí las flores encuentran su camino a través de los comerciantes locales como por exportadores.

Mientras las subastas son más importantes para exportadores de grandes cantidades de flores producidas, tal como los grandes exportadores de rosas de Kenia, los importadores directos son considerados más útiles para pequeñas y mediadas compañías exportadoras, tales como los exportadores ecuatorianos de rosas y heliconias.

Las subastas son mercados generalmente creados por los productores de la Unión Europea para comercializar sus productos. Existen 15 subastas de flores en Europa, nueve de las cuales están en Holanda. De las 15 subastas Europeas, cinco son también importadoras de flores para completar su volumen de comercialización. Cabe mencionar que las subastas holandesas en particular, funcionan como un pivote alrededor del cual se resuelven las transacciones internacionales de flores. A través de la concentración

de la oferta y la demanda, ellas actúan como mecanismo de definición del precio de comercialización y tiene desarrollado el mayor centro para la distribución de la producción nacional y extranjera hacia los mercados de europeos.

Las subastas holandesas en la actualidad manejan alrededor del 85% de lo producido en Holanda y un 60% de las flores importadas, lo que significó alrededor de 3.300 millones de U\$\$ en 1995. Las subastas holandesas dominan el comercio mundial y determinan los precios, en particular en Europa donde manejan el 34% del mercado total de flores cortadas.

Además de las subastas en Holanda, otros países tienen sus propias subastas como UGA Straelen en Alemania. Sin embargo la importancia de estas subastas sobre el comercio internacional es muy pequeña comparada con las subastas holandesas.

Las subastas holandesas son cooperativas nacidas a partir de productos nacionales y abiertas hacia otros productos de la Unión Europea en carácter de miembros, pero todavía para productores extra-Mercado Común Europeo. Su propósito principal es manejar la producción de los cultivadores asociados. Alrededor del 95% de todos los cultivos holandeses de flores cortadas y un 70% de las producciones en macetas pasan a través de las subastas.

Existen siete cooperativas que manejan las nueve subastas holandesas (dos cooperativas operan dos subastas cada una). La coordinadora central de la organización es la Federación de Subastas de Flores Holandesas (VBN). **(Noticias Finagro, 2000).**

Importadores

Generalmente se recomienda a los nuevos exportadores comenzar sus negocios a través de un importador. Además de asesorarlos sobre el mejor método de venta del producto, el importador actúa como una valiosa conexión con el mercado del lugar, proveyendo al exportador extranjero la información referente a los requisitos de calidad, envasado, presentación e impuestos.

Ellos también pueden ayudar al exportador extranjero a encontrar asesoramiento técnico sobre los cultivos, transporte, manejo y cuidado tanto de la producción como el

producto. Cabe mencionar que muchos importadores funcionan también como exportadores o distribuidores locales.

El principal obstáculo para las exportaciones hacia los mercados europeos es encontrar el camino más corto, dado que cada eslabón de la cadena de comercialización aumenta los gastos. En algunos casos las comisiones pueden ser altas pero si el precio de venta es alto el reflujo neto es importante cuando las flores importadas son vendidas a través de las subastas holandesas el precio aumenta entre 21% y 28% por costos de manejo. Cuando las flores son enviadas directamente a otros países europeos los precios no son aumentados por estos costos. **(Mercados Verdes, 2003).**

Las potencialidades de las heliconias en Latinoamérica han sido poco reconocidas, sin embargo mercados de Estados Unidos, Asia y Alemania presentan una demanda creciente de este tipo de flores. El escaso conocimiento técnico y científico acerca del cultivo de estas especies junto al lento desarrollo de las mismas en el campo, hacen que se dificulten su producción a gran escala. **(Atehortúa et al. 2002).**

2.5 La floricultura en Cuba

En Cuba, actualmente se observa un incremento del consumo de flores y plantas ornamentales; pero aún es bajo este índice. Nuestra población ha ido adquiriendo mayor conocimiento y cultura en este sentido.

El desarrollo de la floricultura garantiza gran aporte de divisas para la economía nacional; por lo tanto es de importancia económica para el país. **(Fuentes, 2003).**

Empezar a desarrollar trabajos relacionados con ornamentales para impedir la fuga de divisas y el abastecimiento de nuestras propias necesidades es algo que nos urge.

Actualmente la floricultura se caracteriza por pequeños productores y dos biofábricas de flores.

Las condiciones de producción y distribución exigen un sustancial incremento en cantidad y calidad, para poder cubrir la demanda que existe. El mercado incrementa día a día sus posibilidades, ya que las perspectivas del consumo presentan una sólida tendencia en la elevación del mismo. **(Machado, 2002).**

Por otro lado es conocido por todos que existen fechas señaladas en las que el consumo se eleva notablemente. Sin embargo; nuestro clima permite producir flores durante

todo el año, y con costos bajos de producción. Posibilidad poco explotada, por lo que se pierde la oportunidad de ofertar a nuestros clientes especies de calidad de sello tropical.

En Cuba no hay datos estadísticos sobre la comercialización de flores Heliconias. **(Tropical Gardening, 1999).**

2.6 Multiplicación “*in vitro*”

La palabra microprogramación fue empleada por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación “*in vitro*”. La micropropagación es cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente.

Este procedimiento implica que cada una de las plántulas que se produzcan pueda crecer y ser fenotípicas y genotípicamente idéntica a la planta original de que se deriva.

Con la micropropagación se obtiene de una planta un gran número de plántulas anualmente frente a las menos de 100 que permiten obtener los métodos clásicos de propagación vegetativa. Se cultiva primero en tubos de ensayos y luego en frascos o cajas de polieturano, fragmentos de capítulos muy jóvenes o meristemos. Se obtiene plantas a los tres o cuatro meses. El estado sanitario es excelente ya que están exentas de phytophthora. **(Vidalic, 1992).**

Según la experiencia, en la propagación comercial pueden identificarse cinco etapas definidas con su objetivo específico:

- Fase 0: Preparativa. En esta etapa se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pretratamiento en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos “*in vitro*”.
- Fase I: Establecimiento o iniciación de los cultivos. El objetivo de esta fase es establecer cultivos axénicos y viables con los cuales iniciar el proceso de propagación.

- Fase II: Multiplicación. Es considerada la etapa más importante del proceso donde debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas.
- Fase III: Enraizamiento. Su objetivo es preparar las plántulas para su re-establecimiento en condiciones de suelo.
- Fase IV: Aclimatización. Es la fase final del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción, casas de vidrio o invernaderos. **(Jiménez, 1995).**

Fase 0. Preparativa

Inicialmente esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la fase I, sin embargo en la actualidad existe un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de microprogramación eficiente y repetible, por lo que cada vez se le va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético. **(Isaza, 2004).**

Selección de las plantas donadoras

La iniciación de un proceso de micropropagación solo tiene sentido cuando se emplea un adecuado material de partida. La constitución genética de la planta donadora o planta madre es el primer factor relacionado con la frecuencia de variantes somaclonales resultantes del proceso de propagación. **(Evans y Bravo, 1985).**

Por el propio desarrollo de los sistemas de propagación “*in vitro*”, especialmente en ornamentales, es común que la selección se realice sobre plantas micropropagadas, las cuales son cultivadas en condiciones controladas (invernaderos) o áreas aisladas (bancos de semillas) lo cual evita una serie de riesgos, facilita la reimplantación “*in vitro*” y además mejora el proceso de selección.

El estado fisiológico de la planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas en diferentes edades fi-

siológicas. Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestren un desarrollo vigoroso y sano. **(Jiménez, 1998).**

Pre- tratamiento a las plantas donantes

La selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones higiénicas reduce notablemente los contaminantes, principalmente fangosos. **(Isaza, 2004).**

Incuestionablemente la mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* provienen de la planta madre. Si se logra establecer un explante axénico, la contaminación posterior será debido a fallos en las técnicas o procedimientos. **(Devia, 1995).** Es por esta razón que siempre es más recomendable diagnosticar y tratar las plantas donantes, donde es mucho más fácil detectar los contaminantes en el tejido maduro ya que se pueden ver los síntomas o existen altas poblaciones del agente. Mientras que en el tejido “*in vitro*” prácticamente no se observan síntomas y las poblaciones son muy bajas, sobre todo en los primeros subcultivos.

Crecimiento de las plantas en ambientes controlados e higiénicos:

Una práctica común para uniformar el estado fisiológico de los explantes es cultivar las plantas donadoras en ambientes controlados de luz, temperatura y humedad relativa, con niveles óptimos para el desarrollo de la especie en cuestión. Sin embargo en la mayoría de los casos solo es necesario una instalación con una cubierta plástica, condiciones higiénicas y sistema de riego. Se prefiere en estos casos cualquier sistema de riego que sea por infiltración o directamente al sustrato para evitar el lavado de productos y condiciones de alta humedad en el área foliar que favorezca el crecimiento de hongos.

En plátanos y bananos se reporta que al emplear brotes procedentes de secciones de cormo pregerminados en un sustrato estéril, después de ser desinfectados químicamente, se favoreció la supervivencia “*in vitro*” de los ápices, además se redujo a la mitad el tiempo requerido para su establecimiento y disminuyó notablemente el número de ápices contaminados. **(Orellana, 1994).**

Fase I. Establecimiento o Iniciación de los cultivos

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivo axénicos y fisiológicamente vigoroso con los cuales iniciar el proceso de multiplicación.

El explante

El estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante, así como su tamaño, son de gran influencia en el éxito del cultivo “*in vitro*”. **(Hernández, 1997).**

Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida de que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta “*in vitro*”. El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y mas fácil la regeneración, medidas que con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y mas rápido el crecimiento y la regeneración de la planta. **(Villalobos, 1982).**

Desinfección del explante

La contaminación en los cultivos “*in vitro*” es uno de los principales problemas a resolver en la industria de la micropropagación. Los contaminantes pueden originarse de dos fuentes distintas, primeramente aquellos que vienen en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y en segundo lugar los que aparecen como resultado de fallas en los procedimientos de laboratorios. Desde el punto de vista del establecimiento de cultivos axénicos solo la primera causa será abordada (para una mayor ampliación sobre el tema remitirse a **(Cassells, 1991).**

El tamaño del explante es otro factor que influye ya que mientras mas pequeño es el explante menor el riesgo de contaminación. Este principio ha sido utilizado para la obtención de plantas libres de enfermedades, según **Hernández (1997).**

Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. Generalmente se cortan los explantes de un tamaño algo supe-

rior y son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones estériles son reducidos a su tamaño final. **(Hu y Wang, 1983).**

Los desinfectantes mas comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peroxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl₂). Los tres primeros se emplean en concentraciones de uno a tres por ciento en tiempo de 10 a 20 minutos; el alcohol se usa generalmente al 70% y se emplea en combinación con otros desinfectantes. El bicloruro de mercurio es el de mayor toxicidad y se emplea en dosis bajas y corto tiempo (0.1% durante uno a tres minutos). El uso de antibióticos en el medio de cultivo durante esta fase también es frecuente, aunque no siempre surte el efecto deseado.

Medios de cultivo y hormonas de crecimiento

Para el cultivo de meristemos y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio basal propuesto por **Murashige y Skoog (1962)** con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el mas frecuentemente utilizado, reportándose su utilización en la mayoría de las especies propagadas “*in vitro*” . **(Kantha, 1981).**

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante.

Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adicción exógena de citoquinina en los medios de establecimientos es generalizada. **Hu y Wan (1983)** reportan que en el 85% de los medios de establecimiento se utilizan citoquininas, las mas empleadas han sido la 6 benzilaminopurina (6 BPA) (68%), la kinetina (23%) y el 2 ip y zeatina (9%)

Aunque existen especies que pueden ser establecidas sin citoquininas, al parecer porque hay suficiente cantidad endógena de este regulador del crecimiento en los explantes.

Algo contrario sucede con las auxinas, ya que en las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemos que son empleados como material inicial para el cultivo “*in vi-*

tro”, son áreas de síntesis de auxinas por lo que la concentración endógena de las mismas es alta en ellos. **(Vázquez y Torres, 1981; Hu y Wang, 1983)**. Normalmente cuando se emplean ápices no se adicionan auxinas al medio aunque estas pueden estimular el crecimiento, pero en los meristemos de 0.4mm. o menos y en yemas en reposo es frecuente que no exista suficiente auxina endógena, siendo necesaria su adición exógena en estos casos. **(Hu y Wang, 1983)**. El ANA ha sido empleado en el 51% de los medios, AIB en el 27%, AIA en el 22% y 2,4-D en el 6% de los casos.

Las giberelinas han sido adicionadas solo en el 17% de los casos, al parecer en la mayoría de los explantes se sintetiza suficiente cantidad de estas hormonas.

Fase II Multiplicación

El objetivo de esta fase es la producción del mayor número de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos) a partir de explantes (meristemos apicales o axilares, yemas axilares o adventicias), ya establecidos “*in vitro*”. Esta es la fase más importante de la micropropagación ya que en ella se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie o variedad definiéndose tanto el número de plantas o propágulos a obtener por su calidad genética. **(Orellana, 1998a)**. Existen tres métodos fundamentales: propagación por yemas axilares, adventicias y a través de la embriogénesis somática.

Gilbert et al. (1991) y **Fralkiner (1998)** plantean la necesidad de que en esta fase altas garantías de asepsias, tanto ambiental como material “*in vitro*”, en especial en esta última, pues generalmente cualquier biofábrica dispone de un número considerable de explantes en esta fase, ya que constituye la base material para la propagación subsiguiente. Por lo anteriormente planteado, la eficiencia tecnológica de esta fase es decisiva para alcanzar los resultados finales de la producción en las biofábricas, siendo la generadora de las cantidades de plantas que se establezcan.

Esta eficiencia está condicionada por el comportamiento de dos variables esenciales: el coeficiente de multiplicación o ahijamiento y las pérdidas del proceso por la presencia de contaminantes y/o mortalidad de los explantes; este último altamente condicionado por la fuerza de trabajo.

Zimmerman et al. (1991) y **Pérez et al. (1998)** coinciden en afirmar que con un 10% de aumento del coeficiente de multiplicación se reducen los costos totales de un 3.0 a 5.0%. El coeficiente de multiplicación por su parte depende de la calidad del medio de cultivo y de la manipulación de los operadores de cabinas de flujo laminar con el material “*in vitro*”, ya sea eliminando las hojas envejecidas, limpiando bien el cormo o dándole un pequeño corte al mismo en la parte inferior. **(Machado, 2002).**

Para llevar a cabo la multiplicación se induce la proliferación de brotes, de los cuales son separados en condiciones estériles y cultivos nuevamente en medio fresco para inducir nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseadas. **(Wang y Charles, 1991).**

El método de propagación a emplear: yemas axilares o yemas adventicias, dependerá de la frecuencia de variantes y de la especie en cuestión.

Medios de cultivo

La ploriferación de brotes axilares se logra con la adicción de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas.

El uso de citoquininas es generalizado en los medios de propagación, variando concentración en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes. La 6 benzilaminopurina (6 - BAP) es en general la citoquinina más efectiva en la inducción de yemas axilares, seguida en orden decreciente por la kinetina, el 2-ip y la zeatina, reportándose su utilización en el 74.6, 19.4, 3 y 3% respectivamente de los medios de cultivo empleados en la propagación. **(Hu y Wang, 1993).**

No obstante el papel determinante de la citoquinina en esta fase en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes. **(Wang y Hu, 1998).** Uno de los posibles efectos de las auxilas en a fase II es anular el efecto depresivo de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos.

El balance auxinas-citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de ploriferación con lo cual aumenta la efectividad del método. Sin embargo es necesario tener

cuidado en el manejo de los reguladores del crecimiento en esta fase, ya que con el empleo continuado de altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo se puede inducir la formación de yemas adventicias según **Evans y Bravo (1985)** lo cual representa un inconveniente dentro del proceso de propagación.

No obstante, la formación de yemas adventicias puede ser observada en ocasiones en los medios normales de propagación y está muy relacionada con el manejo de los explantes y el número de subcultivos.

En el establecimiento “*in vitro*” de heliconias con fines de producción masiva se han realizado estudios sobre la dosis de 6-BAP y AIB en algunas especies. **(Isaza, 2004)**.

Fase III. Enraizamiento

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radical que les permite ser trasplantadas a un sustrato en condiciones de vivero o invernadero.

Esta fase es la mas voluminosa de todo el proceso, en ella cada brote, esqueje o yema debe ser cultivada y manipulada “*in vitro*” para que además de crecer y desarrollar unseudotallo o tallos con las primeras hojas forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al transportarse sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una planta “*in vitro*” aclimatizada, lista para llevarse a campo. **(Orellana, 1998b)**. Debe manejarse adecuadamente varios factores para lograr la mayor eficiencia biológica, económica y productiva, durante el proceso “*in vitro*” entre ellos: medios de cultivos simples y de ser posible en estado líquido, uso de componentes del medio con sustancias químicas de calidad, técnica, luz solar como fuente de iluminación, frascos de cultivos con dimensión adecuada para la especie que se produzca, disminución de los riesgos de contaminación, entre otros. **(Orellana, 1998b)**.

Por ser la fase donde se concentra la mayor cantidad de explantes en la producción masiva de plantas, tiene una influencia directa en los costos de producción de ahí que su eficiencia se encuentra en la disminución de las pérdidas del material “*in vitro*” del proceso productivo.

Reguladores del crecimiento

Normalmente para la inducción del enraizamiento no es necesaria la adición de citoquininas al medio de cultivo, debido al efecto residual de las citoquininas adicionadas durante la propagación, la cual ejerce un efecto inhibitorio en la formación de raíces según **Sauvaire y Galzy (1981)**. A veces este efecto es tan grande que es necesario transferir los brotes durante dos subcultivos de enraizamiento. El rol de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocido según **Vásquez y Torres (1981)** recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de enraizamiento, excepto en aquellos donde su empleo no es necesario, limitándose a la utilización de medios simples sin hormonas. Las auxinas mas usadas en esta fase son el ANA, AIB, AIA y 2-4 D en el 53, 29, 11, y 3.6% de los medios de cultivo respectivamente. (**Hu y Wang, 1983**). Otro procedimiento empleado es la sumersión durante varios minutos de los brotes en una solución con alta concentración de auxinas y transferirlos a un medio libre de hormonas.

Concentración de las sales minerales

El manejo de la concentración de las sales minerales es recomendado ampliamente para estimular el enraizamiento, según **Murashige (1982)**, lográndose la formación abundante de raíces al disminuir las sales a la mitad, un tercio o un cuarto de la concentración de los medios. (**Hu y Wang, 1983**). Sin embargo el procedimiento más empleado es la reducción de las sales a la mitad de su concentración según **Conger y Carabia (1978)** y **Maretzki y Hiraki (1980)**; ya que una disminución mayor pudiera afectar el desarrollo general de la planta. (**Wang, 1981**).

El empleo de la totalidad de las sales MS es recomendado por **Ballester y González (1983)** para lograr el enraizamiento de plantas “*in vitro*” de caña de azúcar, mientras que **Conger y Carabia (1978)** y **Maretzki y Hiraki (1980)** proponen el empleo de la mitad de la concentración de las sales inorgánicas para la inducción de un abundante enraizamiento.

Concentración de sacarosa

También se recomienda elevar la concentración de sacarosas en el medio de cultivo para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. Señalándose que en caña de azúcar se observa un abundante enraizamiento en medios que contengan entre 5 y 9% de sacarosa. **(Maretzki y Hiraki, 1980; Ballester y González, 1983).**

No obstante, las plantas procedentes de los medios con las mayores concentraciones de sacarosas presentan además una mayor supervivencia al ser trasplantadas al suelo, tal vez debido a una mejor adaptación para soportar el stress hídrico motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unido a una mejor constitución morfológica de la vitroplanta. **(Jiménez, 1995).**

Estado físico del medio de cultivo

Aunque en la mayoría de los medios de enraizamiento se emplea el agar como soporte, al no ser este un material completamente inerte, se ha reportado un crecimiento pobre de las raíces en varias especies sensitivas. **(Lane, 1979).** Explicándose este fenómeno por la poca difusión de sustancias tóxicas liberadas por el tejido en crecimiento, la aireación y la disponibilidad de nutrientes.

Los medios líquidos ofrecen ventajas en esta fase, pues disminuye los costos por concepto de medio de cultivo al eliminarse el agar. Permiten la difusión de los residuos tóxicos de las plantas, fundamentalmente los fenoles que abundan durante la iniciación del crecimiento de las raíces y el desarrollo general de la planta es mas rápido acortándose el período de trasplantes. **(Hu y Wang, 1983).**

La reducción del tiempo de cultivo permite una utilización mas eficiente de las cámaras de crecimiento al ser menor estadía de las plantas, consiguiéndose reciclar un mayor número de plantas en una misma unidad de tiempo y así incrementar la capacidad productiva, ya que el número de explantes que puede ser manejadas en la fase de enraizamiento es el que define la producción de una biofábrica.

Fase IV- Aclimatación:

Esta fase es trascendental para la propagación comercial, ya que influye directamente en la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proyecto. En esta fase se garantiza un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales.

(Agramonte, Pérez, y Jiménez, 1998).

Las técnicas más eficaces en la aclimatización son las que van mas encaminadas a lograr gradualmente menos humedad relativa, más luz, crecimiento autotrófico y un medio séptico. La eficiencia de la aclimatización es trascendental para la propagación comercial, pues de los resultados de esta, dependerá en gran medida, la eficiencia total del proceso, la calidad y la tecnología. Su eficiencia está dada por el grado de supervivencia de las plantas durante el tiempo de aclimatización.

En el proceso normal de micropropagación los brotes y plantas son cultivados en medios de cultivos con azúcares, vitaminas y otras sustancias orgánicas, lo que determina el desarrollo heterótrofo o mixótrofo de los mismos (nula o baja capacidad fotosintética). Sin embargo, durante la fase de adaptación estas plantas están forzadas a ser completamente autótrofas y sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales, agua, CO₂, y luz. Este cambio en las plantas así como la morfología de las mismas determina la susceptibilidad durante las etapas iniciales del proceso de aclimatización.

Adicionalmente el ambiente “*in vitro*” (alta humedad, baja intensidad luminosa, temperatura constante, bajo o nulo intercambio gaseoso en el frasco), condiciona cambios en la morfología de las plantas que influyen en la capacidad de supervivencia y crecimiento como son:

1. *Hojas*: anatomía interna mal estructurada, estomas que no cierran normalmente y desarrollo deficiente de la cutícula. Esto hace que las plantas sean más susceptibles al stress por pérdida de agua y por lo tanto pueden desarrollar nuevas hojas adaptadas a las nuevas condiciones.
2. *Tallo*: Menor contenido de tejido de soporte (colénquima y esclerénquima).
3. *Raíces*: raíces poco funcional, ausencia de raíces secundarias. En ocasiones existe una conexión vascular incompleta entre tallo y raíces que impide el transporte efi-

ciente de agua y nutrientes. Como resultado de esto prácticamente las plantas deben desarrollar todo el sistema radical nuevo durante la etapa de aclimatización.

Teniendo en cuenta estas características de las vitroplantas en un inicio debe cultivarse las plantas en condiciones que se acerquen al ambiente “*in vitro*”, es decir alta humedad relativa y baja intensidad luminosa y posteriormente debe reducirse gradualmente la humedad relativa y aumentar la intensidad luminosa para que las plantas se desarrollen en un ambiente parecido al de campo abierto con hojas, tallos y raíces adaptados a estas condiciones y completamente funcionales. **(Isaza, 2004).**

Manejo de las vitroplantas

Las técnicas de aclimatación deben dirigir los cambios hacia una reducción en la humedad relativa, aumento de la intensidad luminosa, crecimiento autótrofo y ambiente séptico característicos del campo.

Sin embargo, por las características anteriormente descritas de las plantas propagadas “*in vitro*” es necesario tener una serie de cuidados durante su manipulación y trasplante a sustrato:

- ❖ Disminución progresiva de la humedad relativa. Para esto es recomendable destapar los frascos varios días antes del trasplante o mantener las plantas por 24 o 48 horas con bandejas con agua destilada.
- ❖ Lavar cuidadosamente las plantas para eliminar restos de agar de los brotes y raíces.
- ❖ Clasificar las plantas por tamaño de ser posible individualizar brotes múltiples.
- ❖ Sumergir las plantas en una solución fungicida (Benomyl).
- ❖ Mantener la humedad relativa alta (80- 90%) durante la primera o segunda semana y reducir la intensidad luminosa.
- ❖ A partir de la segunda semana incrementar progresivamente la luz y espaciar los riegos.
- ❖ Iniciar la fertilización tan pronto se haya establecido el sistema radicular. Esto normalmente ocurre a las dos o tres semanas. **(Isaza, 2004).**

Instalaciones utilizadas para la aclimatización

La mayoría de las veces que se planifica un área de aclimatización de vitroplantas se piensa en instalaciones costosas como invernaderos con control de temperatura, humedad relativa, CO₂, iluminación, entre otras. Sin embargo, con excepción de climas extremadamente fuertes, se pueden producir plantas con instalaciones mucho más sencillas. Para ello debe tenerse en cuenta el tipo de plantas que se va a adaptar, con sus requerimientos ambientales y el clima de la zona. Posteriormente se decidirá que tipo de instalación es la más adecuada para cumplir con estos propósitos; ya sea umbráculos o invernaderos.

En Cuba se utilizan umbráculos más conocidas como casas de cultivos. **(Machado, 2002).**

Sustrato

Este debe cumplir algunas características tales como:

- ❖ Estabilidad física. No debe perder sus cualidades físicas hasta transcurrido un tiempo razonable.
- ❖ Densidad. El sustrato debe ser ligero para facilitar el manejo y transporte de los contenedores.
- ❖ Aireación. Las raíces para desarrollarse necesitan una buena aireación. Cuando se riega, una parte del agua drena dejando un espacio que ocupa el aire. Este espacio debe ser como mínimo un 20% del volumen total y a veces más.
- ❖ Acidez. Para la gran mayoría de las plantas el pH óptimo se sitúa entre 5.5 y 6.5.
- ❖ Sanidad. Debe estar libre de patógenos de cualquier tipo que pueden dañar las plantas.
- ❖ Capacidad de retención de nutrientes. Los nutrientes se aportan generalmente por el agua de riego, el sustrato debe ser capaz de retenerlos. La medida de la capacidad de retención es la capacidad de intercambio iónico, que indica la facilidad con que el sustrato retiene y suelta iones. Un sustrato óptimo debe tener entre 15 y 50 meq/100cm³.
- ❖ Capacidad de retención del agua. El sustrato debe retener la mayor cantidad de agua posible sin poner en peligro la aireación.

- ❖ **Mojabilidad.** Si se seca el sustrato, este debe ser capaz de volverse a mojar con facilidad. A menudo cuando se utiliza turba debe añadirse otros productos que mejoren su mojabilidad.
- ❖ **Fertilidad.** La planta debe encontrar en el sustrato los nutrientes que necesita, aunque estos deben suministrarse externamente. **(Jiménez, 2000).**

Materiales que se utilizan en la preparación del sustrato.

La cantidad de material disponible para la adaptación de las plantas es enorme y depende de las zonas de producción. Dado el alto volumen que se utiliza y el bajo costo de estos productos, deben buscarse fuentes de abasto localizadas en la cercanía de las instalaciones para adaptación. Algunos de estos materiales pueden ser:

- ❖ **Turba:** Tiene muy buenas cualidades, es el material base para cualquier sustrato. Hay que tener presente el origen y el grado de descomposición de la misma, pues con el tiempo la turba va perdiendo sus características físicas, se hacen más oscuras y se apelmazan. Las mejores son las turbas claras (rubias). Se debe tener en cuenta la salinidad y el pH. El cual debe oscilar entre 3.5 y 4.5, nunca por encima de 5.5
- ❖ **Arenas y gravas:** Se utilizan en pequeñas cantidades, en algunas mezclas para dar un poco de peso y mejorar la estructura. La proporción es de una parte de arena por tres o cuatro de turba u otro componente orgánico.
- ❖ **Materiales sintéticos:** Son varios los que se pueden utilizar como la vermiculita, perlita lana de roca (rock wool), zeolita.

Cada uno tiene sus propias características.

La vermiculita es un tipo de arcilla que tras un proceso de alta temperatura se expande dando un producto de alta capacidad de intercambio iónico o sea de retener nutrientes tiene, buena aireación y aporta potasio y magnesio. **(Jiménez, 1998).**

La perlita es una roca volcánica que a alta temperatura se expande dando un producto ligero, estéril, de pH 7 a 7.5 muy útil para airear el sustrato.

La lana de roca, está más expandido en la actualidad, por su ligereza, facilidad de intercambio iónico y de manipulación. La zeolita previamente cargada con sales minera-

les es otra opción, aunque su peso es mayor, lo que indica que debe emplearse en pequeñas proporciones.

- ❖ Residuos de plantas: Los más utilizados son las fibras procedentes de residuo de corteza de árboles (pino), la fibra de coco y aserrín. Entre otras más; sus proporciones varían entre 25 y 50%. A las fibras se le deben suministrar cantidades suplementarias de nitrógeno.
- ❖ Otros productos orgánicos: Se utilizan también con mucha frecuencia los compost a partir de residuos agrícolas y el humus de lombriz. Se emplean en proporciones de 25 a 50% y debemos asegurarnos de que no contengan plagas o enfermedades. **(Jiménez, 2000).**

3. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en la Biofábrica de Flores pertenecientes al Sectorial Provincial de Servicios Comunes de Villa Clara y en la Biofábrica de Flores y Plantas Ornamentales de Cienfuegos, perteneciente al mismo sector, en el período comprendido de enero del 2002 a diciembre del 2003.

Los diferentes experimentos desarrollados en el trabajo se efectuaron en las diferentes fases de la micropropagación como sigue:

Material vegetal utilizado

Como material de partida se utilizaron rizomas de plantas donantes de la variedad **standleyi macbride** de la Biofábrica de Villa Clara. Estos rizomas fueron sembrados en macetas usando como sustrato una mezcla de suelo (60%), estiércol vacuno con dos años de descomposición (30%) y zeolita (10%), el mismo fue desinfectado con vapor durante 30 minutos, todo el ciclo del experimento en condiciones controladas (invernadero) (anexos Figura 2), para evitar el efecto negativo de los microorganismos contaminantes, incrementando de esta forma la eficiencia de la fase de establecimiento, donde fueron sometidas a aspersiones con una frecuencia semanal de una mezcla de fungicidas (Zineb 75% PH, oxícloruro de cobre 50% PH, maneb 80%) con una dosis de aspersión de 5g.l⁻¹ durante un mes antes de la implantación.

Para los estudios de la fase II o multiplicación y la fase III o enraizamiento “*in vitro*” el material vegetativo utilizado se encontraba en el tercer subcultivo.

- Instrumental utilizado en el laboratorio.

Todos los instrumentos utilizados en la manipulación del material vegetativo fueron esterilizados en una estufa a una temperatura de 180°C, durante dos horas antes de cada sección de trabajo, manteniendo la asepsia, de la misma forma se colocaron en soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCL) al 1%, según la metodología propuesta por **Agramonte et al. (1993)**. Todas las operaciones de disección y transferencias fueron realizadas en cabinas de flujo laminar horizontal.

- Medio de cultivo

El medio utilizado como base en los experimentos para cada una de las diferentes etapas tanto en los medios de cultivos líquidos como semisólidos, estuvieron compuestos por las sales inorgánicas del medio propuesto por **Murashige y Skoog (1982)**, al cual se hará mención en lo adelante como sales MS. El pH de los medios fue ajustado a 5.6-5.8 previo a la esterilización y como gelificante se utilizó agar (sigma chemical, Co.) a razón de 4.0 g.l⁻¹

La esterilización se realizó de forma química utilizando como agente desinfectante el vitrofural a razón de 114 mg.l⁻¹, se cocina el medio de cultivo hasta ebullición por tres minutos, se deja que baje la temperatura hasta 70°C y se aplica el vitrofural. (Antibióticos que se obtienen a partir de desechos de caña, en el centro de bioactivos de Santa Clara, cuyo efecto ha sido probado no solo en biotecnología agrícola, también en medicina veterinaria y humana)

- Procedimientos generales

En los experimentos relacionados con el establecimiento se utilizaron tubos de ensayo de 1.5 cm ø x 20 cm con tapa de goma y papel de aluminio, con un puente de papel de filtro, a los que se le añadieron 10ml de medio de cultivo MS en estado líquido, suplementando con 20g.l⁻¹ de sacarosa y 0.5 mg.l⁻¹ de tiamina. En la fase de multiplicación fueron utilizados frascos biotecnológicos propuestos por **Ramírez (2000)** dosificados con 30 ml de medio de cultivo semisólido y 20 ml en los casos que se emplearon medios de cultivo en estado físico líquido. En los medios de cultivos se utilizaron las sales MS al 100%.

Todos los experimentos fueron incubados en cámaras con luz solar y los explantes fueron sometidos a una densidad de flujo fotosintético de 50.0 – 62.5 Mmol m⁻². S⁻¹, una temperatura de 26± 2°C y 11 horas luz por días.

La aclimatización de las vitroplantas se realizó en contenedores de polieturano de 70 alvéolos con una capacidad de 132 cm³ cada uno. El llenado de los orificios fue realizado de forma manual. El riego se efectuó mediante la técnica de riego localizado con microaspersor aéreo con una frecuencia de tres riegos en los primeros 15 días y dos en los restantes, con una duración de tres a cinco minutos. Las plantas

crecieron en condiciones de luminosidad reducida al 70% mediante una malla plástica de sombreo (zarán) y rafia plastificada en la parte superior.

- *Procedimiento estadístico de los datos*

En la totalidad de los experimentos se aplicó un diseño totalmente al azar, para la lectura y la evaluación de las variables, por considerarse homogéneas las condiciones del cultivo dentro de las cámaras y como única fuente de variación los tratamientos.

El procesamiento estadístico de los datos en las diferentes variables y fases experimentales consistió en el análisis de varianza de clasificación simple y unifactorial según los casos de variables continuas, previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.

Para detectar las diferencias significativas entre las medias a un nivel del 5% se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Utilizándose el paquete estadístico SAS versión 8.1 para Windows.

El número de réplicas utilizadas en cada experimento “*in vitro*” fue de quince frascos y para el área de aclimatización fue de veinticinco plantas.

3.1 Fase I: Establecimiento

Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes fueron desinfectados superficialmente, se cortaron de un tamaño superior. Luego en condiciones estériles se sometieron a la acción de los desinfectantes y se redujeron a su tamaño final, siguiendo los pasos siguientes:

1. Cortar los brotes dejándolos con aproximadamente tres cm. de pseudotallo y un cm de rizoma. Lavar bien con abundante agua y cepillo.
2. Mantener durante cinco minutos en detergente al 1%, lavar nuevamente con abundante agua, según **Villegas (1990)** y **Maribona et al. (1999)** datos sin publicar.
3. Sumergir en solución de hipoclorito de sodio (NaOCL).
4. Enjuagar con agua destilada estéril, tres veces y mantener en agua desionizada estéril hasta la siembra.

En los experimentos para los establecimientos de los ápices se emplearon rizomas de las plantas sembradas en macetas, pretratados y desinfectados según se describió anteriormente, se les fue quitando las hojas arrolladas que envuelven al meristemo hasta llegar a la zona de tejido más joven, los explantes así obtenidos incluyen el meristemo apical con uno o dos primordios foliares con un tamaño de 0.5 – 0.8 mm.

3.1.1 El hipoclorito de sodio en la desinfección superficial del material a iniciar

Para determinar la mejor concentración del hipoclorito de sodio (punto tres de los pasos anteriores) y el tiempo de exposición del material, así como su efecto para la desinfección superficial se probaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1%, 2% y 3%) durante tres intervalos de tiempo de exposición del material: 10, 20, 30 min, conformándose nueve tratamientos. (tabla 1).

Se utilizó un medio de cultivo en estado líquido con soporte de papel de filtro basado en las sales MS, con 20 g de sacarosa y 0.5 mg.l⁻¹ de tiamina suplementado con 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP.

Tabla 1

Efecto de la concentración y tiempo de exposición al hipoclorito de sodio sobre la contaminación, necrosis y la brotación de los explantes de Heliconia standleyi macbride en la fase de establecimiento.

Tratamientos	Concentración (NaCl)%	Tiempo de exposición
1	1	10
2	1	20
3	1	30
4	2	10
5	2	20
6	2	30
7	3	10
8	3	20
9	3	30

Se evaluó semanalmente hasta 30 días el porcentaje de explantes contaminados y la calidad de la brotación expresada en porcentaje de explantes verdes, blancos y pardos. (Isaza, 2004). La calidad de la brotación, según coloración de los brotes, quedó definida de la siguiente forma:

- color verde: brotados
- color blanco: despigmentados
- color pardo: necrosados o muertos

3.1.2 Estado físico del medio de cultivo en la fase de establecimiento

Se probó la influencia del estado físico del medio semisólido y líquido con soporte de papel de filtro, en los cultivos “*in vitro*”, en la fase de establecimiento, los cuales constituyeron los dos tratamientos. Se realizaron evaluaciones semanales hasta los 30 días y como criterio de evaluación se tuvieron en cuenta el porcentaje de explantes contaminados, verdes y muertos.

El medio de cultivo utilizado fue el mismo al utilizado en el experimento anterior.

3.2 Fase II: Multiplicación

3.2.1 Efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento 6-BAP con AIA en la multiplicación de *H. standleyi*

Partiendo de la composición de distintos medios de cultivo recomendados para la multiplicación de jengibre, según **Malamug, Inden y Asahira (1991)** y en Ginger, según **Babu, Samsudeen y Ratnambal (1992)**, se probó el efecto de distintos reguladores del crecimiento en la multiplicación y crecimiento de los explantes. Así como otros trabajos similares realizados por otros autores con especies de este género. (**Auerbach y Strong, 1991**).

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de la multiplicación de los explantes en presencia de reguladores del crecimiento, fueron adicionados al medio de cultivo diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido 3-indolacético (AIA) como muestra la tabla 2. Se utilizaron yemas axilares del material vegetal establecido.

Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante 30 días y se evaluó la cantidad de brotes por explantes, el coeficiente de multiplicación, altura de los brotes y el número de hojas. Las mismas fueron realizadas en el tercer subcul-

tivo para buscar la estabilidad de la planta, analizando sus mejores coeficientes de multiplicación.

Tabla 2

Influencia de las combinaciones de reguladores del crecimiento en la fase de multiplicación

Tratamientos	Concentración de las hormonas	
	6-BAP mg.l ⁻¹	AIA mg.l ⁻¹
1	0	0
2	0	0.65
3	0	1.3
4	1	0
5	1	0.65
6	1	1.3
7	2	0
8	2	0.65
9	2	1.3
10	3	0
11	3	0.65
12	3	1.3

3.2.2 Influencia del estado físico del medio de cultivo en la fase de multiplicación.

Se evaluó la influencia de dos estados físicos del medio de cultivo (líquido y semisólido), los cuales constituyeron en el comportamiento de los explantes en la fase de multiplicación “*in vitro*” su efecto sobre el coeficiente de multiplicación y crecimiento de las vitroplantas.

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

Tratamientos:

- a) Medio de cultivo en estado líquido
- b) Medio de cultivo en estado semisólido

En las tres evaluaciones realizadas en intervalos de 21 días se analizaron:

- Altura de la planta (cm)
- Número de hojas
- Número de brotes
- Coeficiente de multiplicación

3.2.3 Influencia del manejo de los explantes en la fase de multiplicación.

Dicho experimento tiene el objetivo de incrementar el índice de multiplicación y crecimiento de los explantes en esta fase de multiplicación.

En los experimentos se aplicó un diseño totalmente al azar, para la lectura y la evaluación de las variables, por considerarse homogéneas las condiciones del cultivo dentro de las cámaras y como única fuente de variación los tratamientos.

Se tomaron 15 frascos biotecnológicos con vitroplantas de tamaño uniforme que habían sido subcultivadas tres veces en medio semisólido. A los 21 días se evaluaron las siguientes variantes de manejo.

I Explantes mayores de 1.0 cm

II Explantes mayores de 1.0 cm y con corte del 50% del follaje

III Explantes mayores de 1.0 cm y con corte del 75% del follaje

3.2.4 Influencia de la densidad de explantes por frasco

Con el objetivo de determinar la densidad de explantes por frasco más adecuada para el óptimo desarrollo de los mismos se probó el comportamiento de seis, siete, ocho, nueve y diez explantes por frasco de 250 cm³ con 30 ml de medio MS, sin reguladores del crecimiento vegetal.

Orellana (1994) plantea que en plátanos y bananos la densidad de explantes por frascos depende de la variedad a utilizar.

El tamaño de la muestra fue de 15 frascos, los tratamientos fueron cinco y solo se evaluó la cantidad de brotes por explantes a los 30 días de implantados.

3.3 Fase III: Enraizamiento

3.3.1 Efecto de los reguladores del crecimiento y sacarosa en la fase de enraizamiento “*in vitro*”

Este experimento se realizó con el objetivo de inducir la formación de raíces y el crecimiento de las plantas “*in vitro*” para cuando pasen a la fase de aclimatación. **Villalobos (1982)** realizó similares evaluaciones en el crisantemo.

Se estudiaron dos auxinas con tres concentraciones cada una combinada con dos concentraciones de sacarosa (3 – 4 %) sobre un medio basal constituido por las sales MS + 1.0 mg.l⁻¹ (tiamina) + 100 mg.l⁻¹ de myoinositol. Las evaluaciones se realizaron a los 28 días.

Tabla 3

Estudio de las auxinas y la concentración de sacarosa durante el enraizamiento “in vitro”

Tratamientos	AIA (mg.l ⁻¹)	AIB (mg.l ⁻¹)	Sacarosa (%)
1	1.3	0	3
2	1.3	0	4
3	2.6	0	3
4	2.6	0	4
5	3.9	0	3
6	3.9	0	4
7	0	1	3
8	0	1	4
9	0	2	3
10	0	2	4
11	0	3	3
12	0	3	4

Las variables evaluadas fueron:

- Altura de la planta
- Número de raíces

3.3.2 Influencia del manejo de los explantes y estado físico del medio de cultivo en la fase de enraizamiento.

El objetivo de dicho experimento es evaluar el manejo de los explantes combinados con el estado físico del medio (Tabla 4) y para ello se transfirieron vitroplantas procedentes del medio de multiplicación con tres subcultivos a medios de enraizamiento, compuesto por las sales MS suplementado con 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de myoinositol, 1.3 mg.l⁻¹ de AIA y 4% de sacarosa. **Martínez (1995)** en la micropropagación de plátanos y bananos efectuó evaluaciones similares.

Las evaluaciones se realizaron a los 21 días y las variables evaluadas fueron:

- Altura de la planta (cm)
- Número de hojas

- Número de raíces
- Supervivencia (%)

Tabla 4

Manejo de los explantes en estado físico del medio de cultivo en la fase de enraizamiento de la heliconia

Tratamientos	Tipo de Explantes	Estado Físico del medio
1	Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados	Semisólido
2	Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados	Líquido
3	Explantes mayores de 3.0 cm individualizados	Semisólido
4	Explantes mayores de 3.0 cm individualizados	Líquido
5	Explantes sin individualizar	Semisólido
6	Explantes sin individualizar	Líquido

3.4 Fase IV: Aclimatación

3.4.1 Comportamiento de las plantas “*in vitro*” en la fase de aclimatización

Para analizar la influencia de la altura de las plantas procedentes de la fase de enraizamiento “*in vitro*”, se desarrolló el siguiente experimento en la fase de aclimatización, después de evaluar el porcentaje de las vitroplantas que se corresponden con la altura en esta etapa, los tratamientos de las vitroplantas se describen a continuación:

- Plantas mayores de 5 cm
- Plantas de 3 – 5 cm
- Plantas menores de 3 cm

Se efectuaron evaluaciones a los 30, 45, 60 días teniendo en cuenta las siguientes variables:

- Altura de la planta
- Número de hojas
- Salida del cepellón
- Supervivencia de las vitroplantas.

La variable salida del cepellón se evaluó de la siguiente forma, se tomaron las muestras correspondientes para cada experimento y se determinó el volumen de sustrato extraído por la planta “*in vitro*” determinando por diferencia en el volumen total de cada alveolo el porcentaje de sustrato que se adhiere firmemente a la planta “*in vitro*”.

Los resultados se procesaron por la escala propuesta por **Jiménez (2000)**, la cual se muestra a continuación:

- Grado 3: sale más del 75% de cepellón
- Grado 2: sale entre el 50 – 75% del cepellón
- Grado 1: sale del 25 – 50% del cepellón
- Grado 0: sale menos del 25% del cepellón

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fase I: Establecimiento

4.1.1 El hipoclorito de sodio en la desinfección superficial del material a iniciar

La tabla 5 recoge los resultados de la evaluación de la contaminación según concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de exposición del material inicial para la implantación.

Se observó una tendencia a la disminución de la contaminación, en la medida que aumentó la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición de los explantes; no mostrando diferencias significativas entre los tratamientos del 5 al 9 y sí ellos con el resto de los tratamientos. Con relación a la necrosis, al aumentar la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición de los explantes, se incrementó el por ciento de explantes necrosados, no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos 1, 2, 4 y 5, mostrando los más bajos índices de explantes necrosados y reflejando diferencias significativas con los tratamientos 3, 6, 7, 8 y 9. En cuanto a la brotación los tratamientos 5 y 6 fueron los que mostraron mayores por cientos de brotación, teniendo diferencias significativas con los demás tratamientos. Sin embargo el mejor tratamiento fue el 5, pues mostró un índice bajo en cuanto al por ciento de contaminación, de explantes necrosados, así como brotados.

Tabla 5

Efecto de la concentración y tiempo de exposición al hipoclorito de sodio sobre la contaminación, necrosis y la brotación de los explantes de *Heliconia standleyi* macbride en la fase de establecimiento.

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

Letras distintas dentro de cada columna diferente estadísticamente para $p < 0.05$

En trabajos realizados en otras especies de heliconias que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio obtuvieron resultados muy similares (2% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos). (**Isaza, 2004**).

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

Como se puede observar los porcentajes de contaminación fueron bajos, lo cual puede estar vinculado al hecho de que los explantes provienen de un banco de donantes. El impacto de la fase 0 no está limitado solamente al aspecto sanitario de los explantes sino también a la supervivencia de los mismos. En los casos en que se afectó la brotación de los explantes puede ser producto del efecto tóxico del compuesto químico sobre los tejidos vegetales debido a la fragilidad del tejido epidérmico del material vegetal procedentes de plantas jóvenes, resultados similares han sido observados por diversos autores como **Rodríguez**

et al. (1999) y Villalobos (1982) en el cultivo del Lirio con concentraciones al 3% de NaOCL y tiempos de 15 a 20 min., coincidiendo en las dosis para el **Eucalipto sp.** (Delgado, 2000).

El hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes que con mayor frecuencia se utilizan para el tratamiento de los explantes en la fase establecimiento. (Enjalric *et al.* 1998).

4.1.2 Estado físico del medio de cultivo en la fase de establecimiento

Generalmente al definir si un medio está o no contaminado es más difícil de ver en el medio líquido que en el medio sólido, excepto cuando el contaminante en el líquido presenta un gran desarrollo.

Como se aprecia en la tabla 6, los ápices implantados en medios de cultivos líquidos con soporte de papel mostraron valores significativamente superiores a los implantados en medios de cultivos semisólidos para la variable longitud del tallo, no existiendo diferencias significativas para las variables, por ciento de contaminación, mortalidad y brotación.

Este comportamiento puede estar dado a que en el medio líquido es más fácil la absorción de los nutrientes, hay una oxigenación constante y mejor intercambio gaseoso. (Grapin, 1998). Los explantes que se encontraban en el medio semisólido mostraron fenolización alrededor de los mismos, lo que puede haber provocado intoxicación del explante y retardo del crecimiento ya que se inhibe la actividad enzimática. El medio líquido permite diluir con mayor facilidad los metabolitos tóxicos que afectan el desarrollo de los explantes. George (1999) plantea que al cultivar brotes de aráceas como **Syngonium podophyllum** y **Scindapsus aureus**, solo en el caso de esta última hubo una respuesta al medio semisólido.

Tabla 6

Influencia del estado físico del medio de cultivo en el establecimiento

Tratamiento	Tipo de medio	% de contaminación	% Mortalidad	% (Brotación)	Longitud del tallo (cm.)
1	Líqu. con Sop.	6.95	2.34	88.2	3.8 a
2	Semisólido	7.12	2.09	89.5	2.9 b
ESx ($\pm$)		0.83	0.22	1.06	0.27
CV (%)		11.25	7.64	12.38	9.41

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$

El porcentaje de mortalidad no tuvo diferencia significativa según el estado físico del medio, aunque como tendencia fue mayor en el medio líquido.

4.2 Fase II: Multiplicación

4.2.1 Efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento 6-BAP con AIA en la multiplicación de *H. standleyi*.

Los resultados de la (tabla 7) evidencian que las combinaciones de 6-BAP y AIA utilizados en el medio de cultivo influyeron sobre la multiplicación de ***H. standleyi***. La mejor combinación se logró cuando se agregó al medio de cultivo 2.0 mg.l^{-1} de 6-BAP + $0.65 - 1.3 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIA alcanzándose los mejores valores para todas las variables analizadas. Al comparar estas variables, los mejores tratamientos fueron el 8 y el 9, ya que estadísticamente no presentaron diferencias entre ellos y si con los demás tratamientos.

Es evidente que el 6-BAP en ausencia de AIA muestra, en sentido general, indicadores inferiores como se aprecia en los tratamientos 1, 4, 7 y 10 para todas las variables, lo que ratifica la necesidad del balance auxina - citoquinina.

Tabla 7

Influencia de las combinaciones de reguladores del crecimiento en la fase de multiplicación

Trat	6BAP mg.l ⁻¹	AIA Mg.l ⁻¹	Altura (cm)	N. de hojas	N. de bro- tes	Coef de multi- plicación
1	0	0	2.1 e	3.2 c	1.3 e	0.9 e
2	0	0.65	2.8 d	3.6 b	2.9 cd	1.8 d
3	0	1.3	3.2 c	3.4 bc	2.6 d	1.7 d
4	1	0	2.8 d	3.3 c	3.9 b	2.3 cd
5	1	0.65	3.3 bc	3.2 c	4.3 b	3.6 b
6	1	1.3	3.2 c	3.3 c	4.0 bc	3.7 b
7	2	0	3.4 bc	3.6 b	4.3 b	3.5 bc
8	2	0.65	4.8 a	4.2 a	5.0 a	4.5 a
9	2	1.3	4.5 ab	4.5 ab	4.9 a	4.6 a
10	3	0	3.3 bc	3.5 bc	3.8 c	3.5 bc
11	3	0.65	3.6 b	3.6 b	4.0 bc	3.7 b
12	3	1.3	3.8 b	3.4 bc	3.6 c	3.0 c
ESx			0.21	0.15	0.18	1.1

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Autores como **Machado (2002)** y **Olivera *et al.* (2000)** plantean el uso del 6-BAP para el incremento de brotes en **Gerbera sp** empleando concentraciones entre 1.0 y 2.0 mg.l⁻¹.

En heliconia se obtuvieron resultados similares al utilizar 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.01 g/l de AIB. (**Isaza, 2004**).

4.2.2 Influencia del estado físico del medio de cultivo en la fase de multiplicación.

Como se puede observar en la tabla 8 las plantas “*in vitro*” que fueron subcultivadas en medios de cultivos semisólidos mostraron valores significativamente superiores respecto a las subcultivadas en medios de cultivos líquidos para todas las variables evaluadas. (figura. 3 y 4.) Anexos

Tabla 8

Efecto del estado físico del medio en la multiplicación de la H. standley

Tratamientos	Altura de la pta (cm)	N. de hojas	N. de brotes	Coeficiente de multiplicación
Estado líquido	3.8 b	3.2 b	3.5 b	3.0 b
Estado semisólido	5.0* a	4.3* a	4.7* a	4.5* a
ESx	0.11	0.14	0.13	0.12

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Según **Grapin et al. (1998)** hay un efecto negativo de los medios de cultivo líquidos en esta fase en condiciones estáticas, similares resultados han sido observados por otros autores como **Orellana (1998b)** en plátanos y bananos, y **Agramonte et al. (1998)** en *Solanum tuberosum* L.

El agar es utilizado para garantizar el adecuado sostén o soporte a los explantes para la absorción de los nutrientes necesarios para el crecimiento de los mismos, además de constituir una fuente de varios tipos de sustancias que pueden provocar el crecimiento de las plantas “*in vitro*”. (**Kaetha et al. 1996**).

Son varios los autores que han estudiado el efecto de las características físicas y químicas del medio de cultivo sólido donde se han observado en diversos cultivos que las plantas adquieren un mayor desarrollo. (**Debergh, 1983**); (**Leshem, 1993**).

Según **Bomman y Vogelmann (1998)** y **Kordan (1999)** para optimizar algunas de las fases de la micropropagación o solucionar problemas que pueden surgir en el transcurso del cultivo es factible emplear el medio semisólido.

4.2.3 Influencia del manejo de los explantes en la fase de multiplicación

El manejo influyó en el comportamiento de las plantas “*in vitro*” en la fase de multiplicación como se observa en la tabla 9, el tratamiento en el cual se individualizaron los explantes mayores de 1.0 cm mostraron los máximos valores en relación con todas las variables evaluadas, superando de forma significativa el resto de los tratamientos.

Tabla 9

Comportamiento del manejo de los explantes en la fase de multiplicación

Tratamientos	Altura de la pta (cm)	N. de hojas	N. de brotes	Coeficiente de multiplicación
1-(Explantes > 1.0 cm)	3.8 a	4.3 a	3.6 a	3.4 a
2-(Explantes > 1.0 cm y con corte 50% foliaje)	3.1 b	3.5 b	2.5 b	2.1 b
3-(Explantes > 1.0 cm y con corte 75% foliaje)	2.0 c	3.0 c	2.3 b	2.0 b
ESx	0.2	0.1	0.1	0.1

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Estos resultados demuestran que no es preciso eliminar follaje a las vitroplantas para estimular la brotación, coincidiendo con estudios realizados por **Martínez (1995)**. Las vitroplantas presentaban como promedio tres hojas y unseudotallo de 0.5 cm. de grosor en un medio semisólido.

4.2.4 Influencia de la densidad de explantes por frascos

En la figura 5 se observa que disminuye el número de brotes en los tratamientos con 9 y 10 explantes; no existiendo diferencias significativas en los tratamientos donde hay 6, 7 y 8 explantes. Estos resultados nos muestran el tratamiento con 8 explantes como el de mejor comportamiento ya que dentro de los tratamientos que dan la mayor cantidad de brotes por explantes es el de mayor densidad de explantes por frascos, obteniéndose un mejor aprovechamiento del medio de cultivo. Aquí se observa como la densidad de explantes presenta una marcada influencia sobre el número de brotes y por ende en el coeficiente de multiplicación, lo que indica que al incrementar la densidad disminuye el número de brotes a partir de la densidad adecuada. **Orellana (1994)** señala que en plátanos y bananos la densidad de explantes por frascos depende de la variedad a utilizar, pero que está entre 6 y 8 explantes por frascos. **Martínez (1995)** obtiene resultados similares en plátanos y bananos al utilizar diferentes densidades lo que demuestra la relación de las cantidades de explantes en el medio de cultivo con la absorción y el comportamiento de la multiplicación.

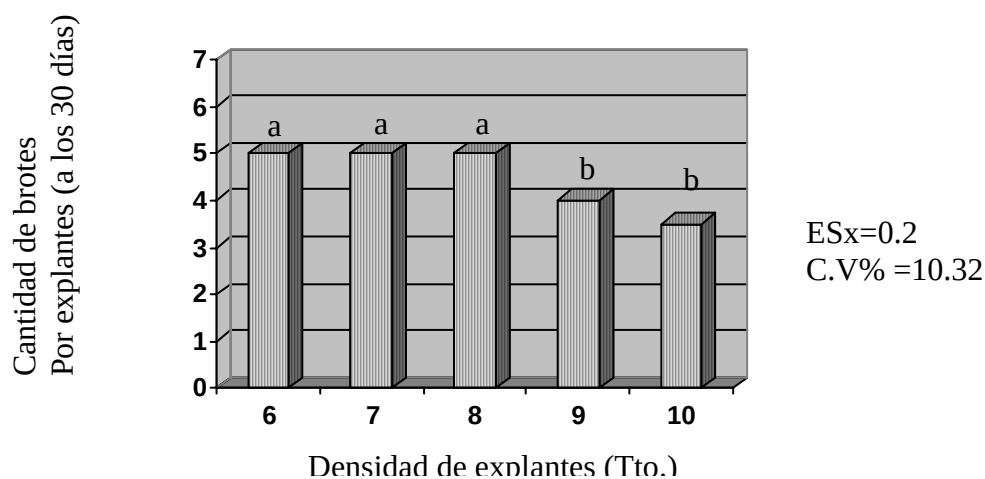


Figura 5. Influencia de la densidad de explantes por frascos en la calidad de los brotes.

4.3 Fase III: Enraizamiento

4.3.1 Efecto de los reguladores del crecimiento y sacarosa en la fase de enraizamiento “*in vitro*”

Los resultados de las figuras 6 y 7, muestran que existen diferencias significativas de los tratamientos en los que se usó AIA, con relación al uso de AIB, en cuanto al número de raíces y la altura de la planta, destacándose en esta última el tratamiento dos, aunque su diferencia no fue significativa con el resto de los procedimientos en que se usó el AIA, coincidiendo con investigaciones de **Villalobos (1982)**, sobre el cultivo del crisantemo para el buen desarrollo de las plantas y crecimiento de las raíces con concentraciones similares de auxinas (AIA).

Coincidiendo con estos resultados **Olivera et al. (2000)** y **Martínez (1995)**, concluyen que el estimulante de crecimiento es influenciado por el AIA, el que es empleado en concentraciones de 1.3 mg.l^{-1} para el enraizamiento “*in vitro*” de plátano y banano empleadas en esta fase. (**Quintana, 1995**). Similares resultados se alcanzaron con el AIB en heliconia según **Isaza (2004)**.

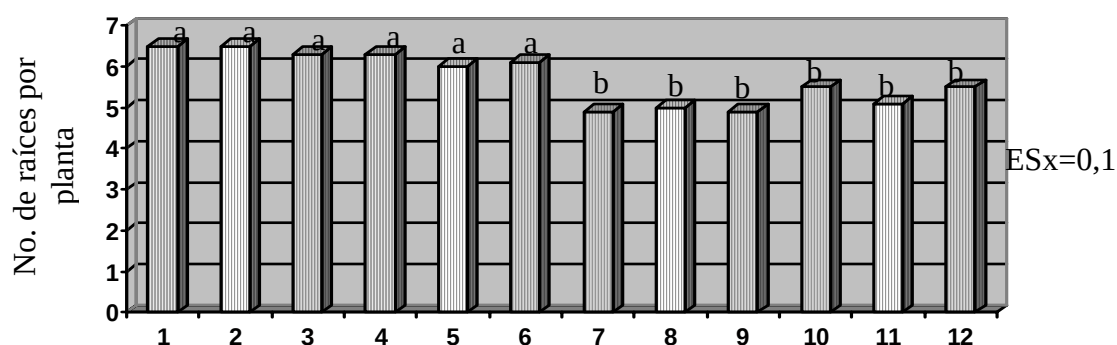


Figura 6 Influencia de los reguladores de crecimiento y la sacarosa en la inducción de raíces

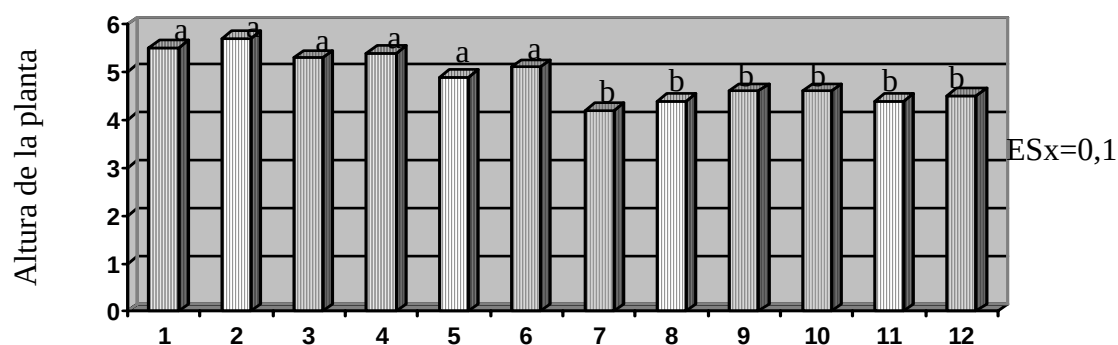


Figura 7 Influencia de los reguladores de crecimiento y la sacarosa en la altura de la planta

En ambas figuras (6 y 7) tanto para el número de raíces como para la altura de la planta los resultados fueron más favorables con la presencia del AIA 1.3 mg.l^{-1} . Con relación al empleo de 3 y 4% de sacarosa no hubo diferencias significativas en ninguno de los casos a pesar de que la sacarosa es una fuente de carbono que ayuda a inducir la formación de raíces.

Tratamientos

T-1 (1.3 mg.l^{-1} AIA, 0.0 mg.l^{-1} AIB, 3% sacarosa)

T-2 (1.3 mg.l^{-1} AIA, 0.0 mg.l^{-1} AIB, 4% sacarosa)

T-3 (2.6 mg.l^{-1} AIA, 0.0 mg.l^{-1} AIB, 3% sacarosa)

T-4 (2.6 mg.l^{-1} AIA, 0.0 mg.l^{-1} AIB, 4% sacarosa)

T-5 (3.9 mg.l^{-1} AIA, 0.0 mg.l^{-1} AIB, 3% sacarosa)

T-6 (3.9 mg.l^{-1} AIA, 0.0 mg.l^{-1} AIB, 4% sacarosa)

T-7 (0.0 mg.l^{-1} AIA, 1.0 mg.l^{-1} AIB, 3% sacarosa)

T-8 (0.0 mg.l^{-1} AIA, 1.0 mg.l^{-1} AIB, 4% sacarosa)

T-9 (0.0 mg.l^{-1} AIA, 2.0 mg.l^{-1} AIB, 3% sacarosa)

T-10 (0.0 mg.l^{-1} AIA, 2.0 mg.l^{-1} AIB, 4% sacarosa)

T-11 (0.0 mg.l^{-1} AIA, 3.0 mg.l^{-1} AIB, 3% sacarosa)

T-12 (0.0 mg.l^{-1} AIA, 3.0 mg.l^{-1} AIB, 4% sacarosa)

4.3.2 Influencia del manejo de los explantes y estado físico del medio de cultivo en la fase de enraizamiento.

El estado físico del medio de cultivo y el manejo de los explantes influyeron en el crecimiento de las plantas en la fase de enraizamiento y en el porcentaje de

supervivencia, siendo sus resultados más bajos los tratamientos en que se utilizaron explantes menores de 3.0 cm (procedimientos 1 y 2) y explantes sin individualizar (procedimientos 5 y 6), tanto en medio de cultivo líquido como semisólido, lo que indica que la calidad del explante es determinante en esta fase.

La influencia del estado físico del medio fue menor que la calidad del explante en esta fase, lo cual se evidencia al comparar los tratamientos tres y cuatro, los que superaron significativamente a los restantes, inclinándose hacia el tratamiento cuatro por ser el más económico, ya que no es indispensable en esta fase emplear el medio semisólido. Por otra parte, no se mostró diferencias entre los tratamientos 1 y 2, ocurriendo lo mismo entre el 5 y 6.

Tabla 10

Comportamiento del manejo de los explantes y el estado físico del medio en la fase de enraizamiento

Tratamientos	Altura de la pta (cm)	N. de hojas	N. de raíces	% de supervivencia
1	4.4 b	3.1 b	4.2 b	95.4 b
2	4.6 b	3.2 b	4.5 b	96.1 b
3	5.3 a	3.6 a	5.4 a	100 a
4	5.6 a	3.8 a	5.7 a	100 a
5	3.8 c	2.9 c	3.5 c	77.3 c
6	4.0 c	2.8 c	3.8 c	79.4 c
ESx	0.06	0.08	0.12	4.2

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$

1. Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados cultivados en medio de cultivo semisólido
2. Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados cultivados en medio de cultivo líquido
3. Explantes mayores de 3.0 cm individualizados cultivados en medio de cultivo semisólido
4. Explantes mayores de 3.0 cm individualizados cultivados en medio de cultivo líquido
5. Explantes sin individualizar cultivados en medio de cultivos semisólidos
6. Explantes sin individualizar en medio de cultivo líquido

Similares resultados fueron obtenidos por **Langford y Wainwright, (1997)** en el cultivo de la rosa, quienes afirman que un buen manejo de los explantes en la última etapa de multiplicación y en la etapa de enraizamiento produce un efecto favorable en la calidad de las plantas que salen enraizadas y durante el período de aclimatización de igual manera **Grout y Millan (1985)** y **Wainwright y Scrace (1998)** en Gerbera señalan que la diferenciación del tamaño de los explantes al ser pasado a medios de cultivos de enraizamiento permite realizar una mejor planificación de la producción ya que se obtienen vitroplantas con una mayor homogeneidad en cuanto al tamaño y número de raíces mejorando la calidad de las plantas establecidas en invernaderos. Resultados equivalentes han sido obtenidos por **Martínez (1995)** en micropropagación de plátanos y bananos. (**Musa spp**).

El tamaño final de los explantes de heliconias es decisivo para un buen desarrollo de las mismas en la aclimatización y posteriormente al pasar a condiciones de campo. (**Vargas, 2002**).

4.4 Fase IV: Aclimatización

4.4.1 Comportamiento de las plantas “*in vitro*” en la fase de aclimatización.

En la tabla 11 se muestra que la aclimatización de las plantas cultivadas “*in vitro*” de Heliconia fue lograda, (Figura 8) Anexos.

Entre los tres tratamientos en cuanto al porcentaje de supervivencia, hubo diferencias significativas; el resultado del segundo tratamiento (plantas entre 3-5 cm) fue de 95.6 considerada de buena y el mayor porcentaje fue para las plantas mayores de 5 cm.

La altura de las plantas fue incrementándose según las medidas tomadas a los 30, 45 y 60 días entre los tratamientos observándose diferencias significativas, aunque entre el 1 y el 2 a los 60 días los resultados fueron similares.

El número de hojas por día fue incrementándose; no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 3 a los 30 días y tampoco entre el 1 y el 2 a los 60 días.

Como se puede apreciar para las variables supervivencia, altura de la planta y número de hojas, los mejores resultados fueron para las plantas mayores de 5 cm.

La variable salida del cepellón se mantuvo de forma estable para el tratamiento 1 a los 30, 45 y 60 días, para el tratamiento 2 a los 45 y 60 días donde no hubo diferencias significativas al igual que en los tratamientos 1, 2 y 3 a los 60 días.

Tabla 11

Influencia de la altura de las plantas en la fase de aclimatización

Tratamiento	Supervivencia (%)	Altura de la planta por día ciclo			N. de hojas por días ciclo			Salida del cepellón por días del ciclo		
		30	45	60	30	45	60	30	45	60
1 (Plantas > 5 cm)	99.4 a	11.6 a	13.8 a	14.4 a	5.2 a	6.4 a	7.8 a	3.0 a	3.0 a	3.0
2 (Plantas 3 – 5 cm)	95.6 b	8.9 b	12.0 b	13.9 ab	3.9 b	5.3 b	7.5 a	2.8 b	3.0 a	3.0
3 (Plantas < 3 cm)	76.6 c	5.5 c	8.4 c	11.8 b	3.0 b	4.8 c	6.7 b	2.10 c	2.75 b	3.0
ESx	3.9	2.7	2.2	2.0	1.9	1.4	1.7	0.10	0.20	0.02

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Según **Pérez et al. (2001)** en el cultivo de ginger (***Alpinia purpurata***) señala que el tamaño de la vitroplanta al ser pasada al área del invernadero es directamente proporcional con el por ciento de supervivencia de las vitroplantas y con el tiempo de estancia en el invernadero.

Estas diferencias fueron observadas en la fase de aclimatización de vitroplantas de ***Solanum tuberosum* L** por **Jiménez (2000)**, así como por **Torres (1999)**, en el cultivo de la Gerbera.

De acuerdo con los resultados es necesario que las plantas menores de 3.0 cm permanezcan un período de tiempo mayor de aclimatización hasta alcanzar la altura necesaria para el trasplante a campo o algún tratamiento en los inicios del ciclo de aclimatización que permita acelerar su crecimiento y preparar las pequeñas plántulas para el trasplante a campo.

El tratamiento dos que corresponde a las plantas de 3 a 5 cm de altura alcanzó resultados similares al tratamiento uno (plantas mayores de 5 cm), a los 45 días del ciclo, o sea 15 días después. El conocimiento de estas diferencias entre los grupos de plantas de acuerdo a la altura alcanzada en la fase de enraizamiento “*in vitro*”, permite establecer diferentes manejos en la estrategia de producción sobre la base del volumen de plantas que corresponde a cada grupo. Dicho compartimiento indica que hay que intensificar el manejo de los explantes desde la fase de multiplicación para así lograr mayores porcentajes de plantas con alturas superiores a los 5 cm, y garantizar una mejor eficiencia en la micropropagación de esta y otras especies de heliconias; coincidiendo estos resultados con investigaciones similares de **Isaza (2004)**.

En los anexos se muestra el diagrama representativo de la propagación de ***Heliconia standleyi macbride***.

5. CONCLUSIONES

1. Se logró el establecimiento “*in vitro*” de la **H. standleyi** con la concentración (NaOCL al 2%) y el tiempo de desinfección (20 min), así como el estado líquido del medio de cultivo para la fase de establecimiento.
2. Al emplear 2.0 mg.l^{-1} 6-BAP y 0.65 mg.l^{-1} AIA, en la fase de multiplicación con medio semisólido, se logró obtener un coeficiente de multiplicación de 4.6 explantes con un crecimiento y desarrollo adecuado.
3. El crecimiento de la planta y la formación de raíces fue incrementada con la adición de ácido indolacético a 1.3 mg.l^{-1} al medio del cultivo en la fase de enraizamiento.
4. Uno de los factores determinantes en la fase de aclimatización para lograr plantas con mayor supervivencia fue el tamaño inicial de los explantes (mayores de 5.0 cm).

6. RECOMENDACIONES

1. Utilizar para la micropropagación de la **H. standleyi** la metodología descrita en cada una de las fases en el presente trabajo.
2. Utilizar los resultados alcanzados como base para establecer protocolos de propagación “*in vitro*” en otras variedades de *Heliconia* que sean de interés por su valor ornamental.
3. Evaluar el comportamiento de las plantas micropropagadas en las plantaciones comerciales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D., Pérez, M. y Pérez, A. 1993. Empleo del hipoclorito de sodio NaOCl en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola 2pp 88-89.
- Agramonte, D., Pérez, J.N., Jiménez, F., Pérez, M., Gutiérrez, O., Ramírez, d. 1998. Empleo del G-1 para la esterilización química de los medios de cultivo en la propagación masiva de plantas. En: Libro de resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Ciudad Habana. Cuba pp 46-47.
- Alvarez, C. Y. 1999. Curso Técnico de propagación masiva de plantas. Santa Clara. Cuba pp 66-75.
- Andersson, W. C. 1996. Cost of brócoli plants propagation “*in vitro*” cultura. Hort Science, No 14 USA pp 23-25.
- Aterhortúa, L y Valencia, C.I. 2002. Bioconversión de embriones somáticos de *Heliconia stricta* utilizando los sistemas de inmersión temporal “RITA”. Actualidades biológicas. 24 (76): 23-29.
- Auerbach, M. J., Strong, D. R. 1991. Nutritional ecology of *Heliconia* herbivores: Experiments with plant fertilization and alternative hosts. Ecological Monographs 51: 63- 84.
- Babu, K. N., Samsudeen, K., Ratnambal, M. J. 1992. “*in vitro*” plant, regeneration from leaf-derived callus in ginger. Plant- Cell- Tissue- Organ- Culture. 29,2:71-74.
- Ballester, R. y González, A. 1983. Comprobación de la eficiencia de nuevos medios de cultivo en el enraizamiento de plantines de caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) obtenidos por cultivo de tejidos. Trabajo de Diploma. Universidad Central de las Villas. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Berry, F. and Kress, J. 1998. *Heliconia*. An Identification Guide. Washington and London. Smithsonian Inst. Press. pp 332-334.
- Bomman, Ch. Y Vogelmann, T. C. 1998. Effect of rigidity of gel medium on benziladenine-induced adventitious bud formation and vitrification “*in vitro*” in *Picea abies*. Physiol. Plant 61: pp 502-512.
- Borris, P. 1995. Manual de Floricultura. pp 2-3.

- Cassells, A. C. 1991. Problem in tissue culture: Culture contamination. En : Debergh P, Zimmerman R. H. (Eds). Micropropagación. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 31-45.
- COEXPORT. 2001. Plantas ornamentales y flores. El Salvador. <http://www.agronegocios.gob.sv/t/c/news/docs>.
- Conger, B. and Carabia, J. 1978. Callus induction and planted regeneration in orchardgrass. Crop. Science. 18(1): 157.
- Criley, R. A. 1998. Propagation methods for Heliconias and Gingers. Bull. Heliconia Soc. Int. 3(2): 1-7.
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. Second Edition. USA.
- Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant. 59:270-276.
- Delgado, L. A. 2000. Micropropagación de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales de árboles seleccionados. Tesis presentada en opción al título académico de Magister Scientie en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Martha Abreu” de las Villas. Cuba.
- Devia, W. 1995. Heliconias del Valle del Cauca. Instituto Vallecaucano de Investigaciones Científicas. Cali, Colombia. 129 p.
- Divo de Sesar, M. y Vilella, F. 1994. Primer Congreso Argentino de Biotecnología.
- Edgarjardinerías-Heliconias. Plantas tropicales, 2000. <http://www.grancanariaweb.com/edgar/botánica>.
- Enjalric, F., Carron, P. P. y Lardet, L. 1998. Contamination of primary cultura bin tropical áreas: The case of *Heveabra siliensis*. Acta Hort 225: pp 57-66.
- Evans, D. A. and Bravo, J. E. 1985. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. In: Zimmerman, R. H. et al.(Eds), Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops: 73-92.
- Fralkiner, F. R. 1998. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue. Ind. Soc Plant Tiss. Cult. Newsletter 60: pp 13-23.
- Fred Berry and W. Johs Kress. 1999. Heliconia an identification guide: pp 309-313.

- Fuentes, R. 2003. Taller con pétalos y aroma. El habanero, periódico. <http://www.elhabanero.cubaweb.cu>.
- Gage, D. A., Strong, D. R. 1981. The chemistry of *Heliconia imbricate* and *Heliconia latispatha* and the growth of a hispine beetle herbivore. *Biochemical Systematics and Ecology* 9: 79-82.
- George, E.F. 1999. Plant propagation by tissue culture. The Technology Exegetics Limited. pp. 130 – 192.
- Grapin, A., Michaux Ferriere, N., Etienne H. and M. Carron. 1998. Effects of hypoxia on induction and development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. In: “*in vitro*” culture of tropical plants. Ed by Claude Teisson. CIRAD. Pp 23-25.
- Gilbert, L. y Pierik, R. 1991. Propagación y composición del medio de cultivo. In: Cultivo “*in vitro*” de las Plantas Superiores. 3ª. ed. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid, España pp 45-86.
- Grout, B. y Millan, S. 1985. Photosynthetic developmet of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann. Bot.* 55: pp 129-131.
- Hernández, R. 1997. Obtención de plantas libres de patógenos. Curso Teórico-Práctico de Propagación Masiva de Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Pp 31-43.
- Hu, C. V. and J. P. Wang. 1983. Meristem. Shoot tip and bud culture. In: Handbook of Plant Cell, Ed By Evans, D. A., Ammirato, P. V., Yameda, Y. pp 256-290.
- Hu, C. y Wang, P. 1993. “*in vitro*” cloning of the deciduous timber trees *Sassafras randaiense*. *Zpflanzenphysiol.* pp 214-220.
- Isaza, L. *Establecimiento “in vitro” con fines de producción masiva*. [2004] Año 10 No. 26 pp193-198. <http://www.utp.edu.co/php/revistas/scienciaettecnica>.
- Jiménez, E. 1995. Propagación “*in vitro*” de la caña de azúcar (*Saccharum* spp Híbrido). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo “*in vitro*” (capítulo 1) En: Propagación y mejora de plantas por Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. pp 13-22.

- Jiménez, F. 2000. Aclimatización de plantas “*in vitro*” y producción de minituberculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casas de cultivos. Tesis para optar por el grado científico de Magíster Scientizae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Kaetha, K. y Belcher, A. 1996. Elimination of virases from cultura in presence of antiviral chemical. En withers LA, Alderson PG (Eds) Plant tissue culture and it applicatium. Butterworth, London pp 219-238.
- Kartha, K. 1981. Meristem culture and cryopreservation. In Plant Tissue Culture, Methods and Aplications in agriculture. Ed. By T. A. Thorpe. Academic Press. Pp 321-325.
- Kepler, A.K. 1999. Exotic Tropical of Hawaii. “Meet the plants”. The National Tropical Botanical Garden. <http://www.ntbg.org/plants/plantresaurse>.
- Kress, W. J. 1998. Bat pollination of an old world Heliconia. Biotropica 17: 302-308.
- Krikorian, A. D. 1991. Propagación clonal “*in vitro*”. En Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Willians, M. Roca, Luis, Mroginski (Eds). Pp 95-96.
- Kordan, H. 1999. Inorganic ions present in comercial agar. Physiol. Pflanz. 183: 355-359.
- Lane, W. D. 1979. Physiol. Plant. 45: 260-264.
- Leshem, B. 1993. Grouth of carnation meristem “*in vitro*”. Anatomical Structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium of their formation. Ann. Bot. 52: 413-415.
- Maciel, N. 1999. Consideraciones sobre el genero Heliconia L. Características del crecimiento, desarrollo y floración de Heliconia biahi (L) L. y H. Latisphata Benth. Bajo diferentes luminosidades. Tesis Mag. Sc. Barquisimetro, Venezuela. Universidad Centro occidental Lisandro Alvarado. Pp 207-208.
- Maciel, N. 2003. XLIX. Plantas tropicales americanas nuevas para la floricultura. Reunión anual da ISTH.
- Machado, P. 2002. Micropropagación “*in vitro*” de la Gerbera Jamenssonii H Bo-lus. Tesis presentada en opción al titulo académico de Magister Scientie en Biotec-

nología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.

- Madriz, R., Noguera, R. y Smits, G. 1989. Patogenos foliares en *Heliconia psittacorum* L. Fitopatol. Venez. 2: 61 Resumen.
- Malamug, J. F., Inden, H. Asanhira, T. 1991. Plant leaf regeneration and propagation from ginger callus. Sci Hortic 48 (1-2): 89-97.
- Maretzki, A. y Hiraki, P. 1980. Socrose promotion of roots formation in plantlets regeneration from callus of *Saccharum* sp. Dyton 38 (1): 84-87.
- Maribona, R. H., S. Quintero, Marianela López, Dayami Pérez y Odalis Pérez. 1999. Cultivo axénico de la malanga. (En preparación).
- Martínez, S. J. 1995. Perfeccionamiento de la tecnología para la micropropagación “*in vitro*” de Plátanos y Bananos (*Musa* spp). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- Mercados Verdes. 2003. <http://www.cam.gov.co/planes/mercaverde.htm>.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised médium for rapad growth and biossays with tabaco tissue cultura. Plant Physiology.15: pp 473-479.
- Murashige, T. 1982. Regeneration of plants. California Agriculture 36 (8): 19-20.
- Noticias Finagro. 2000. Finagro apoya cultivo de flor tropical para exportación. <http://www.finagro.com.co/@noticias>.
- Olivera, Z., Gutiérrez, A., Gutiérrez, J. y Rodríguez, M. 2000. Cultivo “*in vitro*” de Gerbera (*Gerbera Jamesonii* H. Bolus) y su aclimatización en invernaderos. BIOAGRO: 12(3): 75-80.
- Orellana, P. 1994. Micropropagación “*in vitro*” de Plátanos y Bananos. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- Orellana, P. 1998-a. Introducción a la Propagación Masiva. (capitulo 7). En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. Pp 125-132.
- Orellana, P. 1998-b. Introducción a la Propagación Masiva (capitulo 9). En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editado por Instituto de

Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara , Cuba. Pp 81-160.

- Pérez, M y Pastelón, C. 2001. Establecimiento aséptico a partir de ápices de ginger (*Alpinia purpurata*). Décimo cuarta reunión científica-tecnológica-forestal y agropecuaria. Veracruz-México.
- Pérez, P. J. N., Jiménez, E. y Agramonte, D. 1998. Propagación masiva en Biofábrica (capítulo 14). En: Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Pierik, M. 1995. Redbio-II. Encuentro Latinoamericano.
- Quintana, M. R. 1995. Cultivo “*in vitro*” en *Vigna luteola* SC-123. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- Ramírez, M. y E. Salazar. 1997. Establecimiento “*in vitro*” de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) Rev. Fac. Agron. (Luz) 14: 497-506.
- Ramírez, M., Leon, S. y Urdaneta, A. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento “*in vitro*” de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrich thalianum* (Berg) Nierdz. Rev. Fac. Agron. 16: 243-255.
- Ramírez, D. 2000. Introducción de Nuevos Frascos en el Proceso Productivo en las Biofábricas. Tesis para optar por el grado científico de Magíster Scientizae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Rodríguez, J., R. Vegas., M. Penichet., I. Guerra y R. Núñez. 1999. Caracterización de extractos de *M. royoc* L. para posible uso como materia prima en la elaboración de suplementos dietéticos. Revista Alimentaria de Tecnología e Higiene de los Alimentos. Cuba. N 302. pp 47-52.
- Sauvaire, D., Galzy, H. 1981. Micropropagation de la canne a sucre par bouturage “*in vitro*”. Action d'une auxine et d'une cytokinine. L' Agronomic Tropicale. (1).
- Schwartz, B. and Blumenthal, J. 2001. Las Heliconias. Cloud Forest. ALIVE. Abril 13, 2001. <http://www.cloudforestalive.org/tow>.

- Styler, D. J. and Chin, C. K. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation pathogen elimination and germoplasma conservation. Horticultural Reviews 5: 221-277.
- Términos Tainos-B. 2001. Heliconia bihai como planta ornamental. http://www.jmarcano.com/mipais/historia/terminos/taino_b.html.
- Torres, J. G. 1999. Micropropagation and acclimatization of Hedioma multiflorum. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48 pp 213-217.
- Tropical Gardening. 1999. Variedades de Heliconias. <http://www.tropicalgardening.com/heliconia>.
- Tropical Silk Plants, 2004. Condiciones agroclimáticas. <http://members.lycos.n/goolffen/index-74>.
- Vargas, W. 2002. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes Centrales. Manizales: Universidad de Caldas, Centro editorial.
- Vázquez, B. E., Torres, G. S. 1981. Fisiología Vegetal. Crecimiento y Desarrollo. Ed. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana. Pp 317-362.
- Vidalic, S. 1992. Tissue cultura applied to ornamental species. Rome pp 134-143.
- Villalobos, A. V. 1982. Tissue cultura applied to ornamental species in: Micropropagación of selected root crop, ornamental apcies. Rome pp 155-164.
- Villalobos, A., García, V. A. 1982. Obtención de plantas de clavel (Dianthus carophyllus L.) libres de virus por cultivo “*in vitro*” de meristemos y apices vegetativos, Agrociencia. 48: 107-118.
- Villegas, M. A. 1990. Desinfección del material vegetativo. En: Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejido vegetal. FAO p 21.
- Wainwright, h y Scrace, J. 1998. Influence of “*in vitro*” preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcultings on “*in vitro*” establishment. Sci. Hort. 38 pp 261-267.
- Wang, P. J. 1981. Clonal Multiplication of Cryptomeria japonica D. Don “*in vitro*”. In: Studies and Essays in Commemoration of the Golden Jubilee of Academia Sinica, Taipei, Taiwan: pp 559-566.

- Wang, P. J. and Hu, C. 1998. Regeneration of virus-free plants through “*in vitro*” culture. In: Advances in Biochemical Engineering. Vol. 18, Plant Cell Cultures II. A. Fietchker (Eds) pp 61-99.
- Wang, P. J. and Charles. 1991. Clonal multiplication of *Cryptomeria japonica* D. Don “*in vitro*”. In: Studies and Essays in Commemoration of the Golden Jubilee of Academia Sinica, Taipei, Taiwan: 559-566.
- Zárraga de Galdeano, J. y Granada. 1990. Micropropagación “*in vitro*” de gerbera (*Gerbera jamesonii*) Boletín informativo de FIRA. 216 (22) pp 14-20.
- Zimmerman, J. L. y Currier, T. 1991. Somatic embryogenesis: A model for early development in Higher plants. The plant cell 5. pp 530-560.

8. ABREVIATURAS

AIA: Ácido 3 – indolacético

AIB: Ácido 3 – indolbutírico

6 – BAP: 6 bencilaminopurina

LCS: Líquido con soporte

MS: murashige y Skoog)1962)

NaOCl: Solución de hipoclorito de sodio

SS: semisólido