

PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Heliconia standley* Macbride EN CUBA

F. M. Sosa-Rodríguez¹; R. S. Ortiz¹;
R. P. Hernández¹; P. M. Armas^{2¶};
D. S. Guillen³

¹CETAS Universidad de Cienfuegos. Carretera a Rodas, Cuatro Caminos,
km.2 ½. Cienfuegos. Cuba. C. P. 59430. CUBA.

Correo-e: rhernandezp@ucf.edu.cu, santaclara57@yahoo.es

²Estación Experimental de la Caña de Azúcar.
ETICA. Ranchuelo V. C., Cuba.

³Campus Oriente, Universidad Autónoma del Estado de Morelos,
Ave. Nicolás Bravo s/n, Parque Industrial Cuautla,
Xalostoc, Ayala, Morelos, C. P. 62740. MÉXICO.

RESUMEN

Se aplicó un protocolo que permitió la micropropagación de la especie ornamental *Heliconia standleyi* Macbride. Se estudiaron variantes de desinfección, medios de cultivo y manejo de explantes durante las diferentes etapas del proceso y finalmente su aclimatación. Durante la fase de establecimiento *in vitro* de la especie, se logró una desinfección óptima con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2 %, durante 20 min en medio líquido, y los mejores resultados durante la multiplicación se lograron con el medio suplementado con 6-BAP (2.0 mg·litro⁻¹), AIA (0.65 y 1.3 mg·litro⁻¹) y cuando las vitroplantas tenían un tamaño mayor de 1.0 cm en medio semisólido, mismas que alcanzan un coeficiente de multiplicación de 4.6 explantes por ápice. Éstos llegan a enraizar adecuadamente con la adición de ácido indolacético (1.3 mg·litro⁻¹) al medio y se aclimatan satisfactoriamente a los 45 días siempre que las vitroplantas tengan entre 3 - 5 cm de altura.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: micropropagación, aclimatización.

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Heliconia standley* Macbride EN CUBA

ABSTRACT

A protocol was applied that allowed the micropropagation of the ornamental species of *Heliconia standleyi* Macbride. Different variants of disinfections of plants, culture medium and explants handling were studied during the different stages of the process and finally their acclimatization. The cultivar can be propagated in liquid medium using a disinfections with sodium hypochlorite (NaOCl) 2 % during 20 min, cultured medium supplemented with 6-BAP (2.0 mg·litro⁻¹), AIA (0.65 y 1.3 mg·litro⁻¹) and explants had a size bigger than 1.0 cm in semi liquid medium. The multiplication coefficient after subculture was 4.6 explants/meristems. Optimum results in the roots production for addition in medium of AIA 1.3 mg·litro⁻¹ were obtained. The acclimatization was satisfactory in greenhouse always the size of plants were between 3 - 5 cm and until 45 days in controlled conditions.

ADDITIONAL KEY WORDS: micropropagation, acclimatization.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la diversidad de flores que se producen y se comercializan, las especies de *Heliconia* ocupan un lugar importante pues sus brácteas son muy llamativas por sus brillantes colores y las inusitadas formas de diferentes especies y selecciones, lo que hacen a estas plantas

populares con el florista.

En Cuba, el volumen y la calidad de la producción se ha venido mejorando desde el año 1967; dentro de la diversidad de flores que se producen y se comercializan en el país, la *Heliconia* ocupa un lugar importante.

La propagación de *Heliconia* sp. en Cuba se realiza mediante métodos tradicionales, de plantación de rizomas. Por otro lado, la propagación agámica aunque garantiza al cultivador la homogeneidad de las plantas producidas y por lo tanto un crecimiento, floración y calidad uniforme; no provee los volúmenes necesarios de plantas para la plantación de las áreas dedicadas a este cultivo. 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 y Vilella, 1994; Olivera *et al.*, 2000). Entre las ventajas de estas técnicas, se tienen la factibilidad de obtener altos volúmenes de plantas en un periodo relativamente corto, alta homogeneidad del fenotipo en las variedades y plantación (Krikorian, 1991). Se elimina la mayoría de los patógenos que afectan al cultivo en las condiciones naturales (Madriz *et al.*, 1989) y existe rejuvenecimiento del material vegetal, lo que incrementa la calidad de las flores (Maciel, 1999).

El objetivo fundamental del trabajo fue establecer una metodología para la propagación *in vitro* de ápices meristemáticos de *H. standleyi*, así como para su aclimatación bajo las condiciones de la provincia de Cienfuegos, en Cuba. .

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal utilizado

Como material de partida se utilizaron rizomas de plantas donantes de la variedad *H. standleyi* Macbride de la Biofábrica de Villa Clara, en Cuba. 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 estuvo en condiciones controladas (invernadero). Se hicieron aspersiones con una frecuencia semanal de fungicidas (zineb 75 %, PH, oxiclورو de cobre 50 % PH, maneb 80 %) en dosis de 5 g·litro⁻¹ durante 30 días antes de la implantación. Para la fase I de establecimiento, se inició el experimento con ápices de plantas previamente establecidas en macetas y seleccionadas por su vigor y sanidad.

Para los estudios de la fase II (multiplicación) y la fase III (enraizamiento) en condiciones *in vitro*, el material vegetal utilizado se encontraba en el tercer subcultivo. Todos los frascos usados en los experimentos, después de ser lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 %, fueron esterilizados químicamente disolviendo junto al medio de cultivo aún caliente, Vitrofur (G-1) 10 µg·litro⁻¹, el cual se agitó para lograr homogeneidad, dejándose en reposo 24 horas antes de ser usado (Alvarado, 2003).

Para la comparación entre tratamientos se efectuó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple

de medias por el Método de Duncan. Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el paquete estadístico SPSS (2006) ver.11.0.

Fase I: Establecimiento *in vitro*

Los rizomas fueron mondados con auxilio de una cuchilla, hasta llegar a tres centímetros de longitud. Los mismos fueron lavados con agua abundante y cepillo y luego se pasaron a un recipiente con detergente al 1 % durante cinco minutos, enjuagándolos finalmente con agua (Villegas, 1990).

Los explantes fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), probando tres concentraciones (1, 2 y 3 %) en tres intervalos de tiempo (10, 20 y 30 min). Posteriormente, los residuos del hipoclorito fueron eliminados con tres enjuagues en agua estéril (Agramonte *et al.*, 1993). Los meristemas fueron diseccionados con ayuda de un estereoscopio, aproximadamente entre 0.5 - 0.8 mm, formados por 1 - 3 primordios foliares (Hernández *et al.*, 1997), fueron implantados en medio de cultivo líquido con soporte de papel. El medio contenía sales MS (Murashige y Skoog, 1962), con 20 g de sacarosa y 0.5 mg·litro⁻¹ de tiamina y suplementado con 2.0 mg·litro⁻¹ de 6-BAP.

Las evaluaciones fueron realizadas semanalmente, hasta 40 días teniendo en cuenta los frascos contaminados y regeneración, así como la brotación, según Isaza (2004).

Fase II: Multiplicación

Reguladores de crecimiento 6-BAP con AIA en la multiplicación de *H. standleyi*

Los reguladores de crecimiento fueron añadidos al medio de cultivo en diferentes concentraciones, solos o combinados según Malamug *et al.* (1991) y Auerbach y Strong (1991), formándose 12 tratamientos al combinarse diferentes concentraciones, como sigue: bencilaminopurina (6-BAP) (0, 1, 2 y 3 mg·litro⁻¹) y ácido indolacético (AIA) (0, 0.65 y 1.3 mg·litro⁻¹).

Se incluyeron tres tratamientos de manejo de explantes *in vitro*, los que fueron evaluados cada 21 días: I) explantes mayores de 1.0 cm; II) explantes mayores de 1.0 cm con corte del 50 % del follaje, y III) explantes mayores de 1.0 cm con corte del 75 % del follaje. Además, se midió el efecto de la densidad de plantas en el medio, cuando se tenían seis, siete, ocho, nueve y diez explantes por frasco en 30 ml de medio (Orellana, 1994).

Fase III: Enraizamiento

Se evaluaron dos tamaños de explantes (1 - 2.9 cm y > de 3.0 cm) que procedían de la fase de multiplicación,

los cuales fueron sembrados en dos tipos de medio de enraizamiento, líquido y semisólido (4 g·litro⁻¹ de agar), compuesto por sales MS + 1.0 mg·litro⁻¹ (tiamina) + 100 mg·litro⁻¹ de mioinositol + 1.3 mg·litro⁻¹ de AIA y 4 % de sacarosa, recomendado previamente por Isaza (2004) para *Heliconia* sp (Marulanda e Isaza, 2004).

Las evaluaciones se hicieron cada 21 días y se midieron tres variables: altura, número de raíces y supervivencia.

Fase IV: Aclimatación

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

La fase de aclimatización fue desarrollada según lo expuesto por Villalobos y García (1982) y Pérez *et al.* (1998) para la aclimatización en umbráculos con cubierta de malla plástica que disminuye la intensidad de la luz en un 30 %. En ésta se analizó la adaptación de las plantas trasplantadas en contenedores de poli espuma, evaluándose la influencia sobre factores morfológicos y su adaptación *ex vitro*. Se conformaron tres grupos según los tamaños de las vitroplantas que se extraían de los frascos: I) mayores de 5 cm, II) plantas de 3 - 5 cm y III) plantas menores de 3 cm. Las evaluaciones fueron efectuadas a los 30, 45 y 60 días de trasplantadas. Las variables analizadas fueron: a) supervivencia de las vitroplantas, b) altura de la planta, c) número de hojas y d) salida del cepellón. Para esta última se aplicó la escala propuesta por Jiménez (2000), como se muestra:

- 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

RESULTADOS

Fase I: Establecimiento

Desinfección superficial del material inicial

En el Cuadro 1 se muestra la efectividad de la desinfección con NaOCl. Con una concentración elevada del desinfectante o del tiempo, disminuye la contaminación. Es obvio que se producen afectaciones al tejido a partir de 2 % y 30 min. En cuanto a la brotación, el tratamiento 5 (2 % y 20 min) mostró diferencia significativa con el resto ya que logra mejor brotación, sin diferencias en cuanto a la pérdida de plantas contaminadas, en correspondencia con lo expuesto por Agramonte *et al.* (1998) y Alvarado (2003).

En cuanto al estado físico del medio utilizado en esta fase no se obtienen diferencias estadísticas entre el porcentaje de regeneración de ápices, longitud del tallo, ni contaminación, similar a lo expuesto por Grapin *et al.* (1998).

Fase II: Multiplicación

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

Al comparar las diferentes hormonas en fase de multiplicación, (Cuadro 2) se lograron los mejores resultados con un coeficiente de 4.5 y 4.6, cuando se combinó 2 mg·litro⁻¹ de 6-BAP y 0.65 y 1.3 mg·litro⁻¹ de AIA respectivamente, lo que justifica un correcto balance citoquinina – auxina necesario para obtener la mejor calidad de plantas durante los subcultivos en un medio semisólido, dado por un mejor intercambio *in vitro* (Cuadro 3).

El manejo de los explantes también influyó en el comportamiento *in vitro* (Cuadro 4); cuando se extraen los

CUADRO 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.

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
ES ±			1.53	0.61	2.57

Letras distintas dentro de cada columna difieren según Duncan para $P < 0.05$.

CUADRO 2. Influencia de las combinaciones de reguladores del crecimiento en la fase de multiplicación.

Trat.	6BAP mg-litro ⁻¹	AIA mg-litro ⁻¹	Altura (cm)	Núm. de hojas	Núm. de brotes	Coefficiente Multiplicación
1	0	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	0.0	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	0.0	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	0.0	3.3 bc	3.5 bc	3.8 c	3.5 bc
11	3	0.65	3.6 b	3.6 b	4.0 bc	3.7 b
12	3	1.3	3.8 b	3.4 bc	3.6 c	3.0 c
ES ±		0.21	0.15	0.18	1.1	

Letras distintas dentro de cada columna difieren según Duncan para $P < 0.05$.

CUADRO 3. Efecto del estado físico del medio durante la multiplicación de la *H. standleyi*.

Tratamientos	Altura Planta (cm)	Núm. de hojas	Núm. de brotes	Coefficiente Multiplicación
Estado líquido	3.8 b	3.2 b	3.5 b	3.0 b
Estado semisólido	5.0 a	4.3 a	4.7 a	4.5 a
ES ±	0.11	0.14	0.13	0.12

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente según LSD para $P < 0.05$.

CUADRO 4. Comportamiento del manejo de los explantes en la fase de multiplicación.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Núm. de hojas	Núm. de brotes	Coefficiente Multiplicación
I-(Explantes > 1.0 cm)	3.8 a	4.3 a	3.6 a	3.4 a
II-(Explantes > 1.0 cm y 50 % follaje)	3.1 b	3.5 b	2.5 b	2.1 b
III-(Explantes > 1.0 cm y 75 % follaje)	2.0 c	3.0 c	2.3 b	2.0 b
ES ±	0.2	0.1	0.1	0.1

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente según Duncan para $P < 0.05$.

CUADRO 5. Comportamiento del manejo de los explantes y el estado físico del medio en la fase de enraizamiento.

Tratamientos	Altura de la planta(cm)	Núm. de hojas	Núm. de raíces	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
ES ±	0.06	0.08	0.12	4.2

Letras distintas dentro de cada columna difieren estadísticamente según Duncan para $P < 0.05$.

explantes de mayor tamaño (1.0 cm), se muestran diferencias significativas respecto a otros tratamientos en todas la variables analizadas.

Fase III: Enraizamiento

En cuanto al estado físico del medio de cultivo y el manejo de los explantes (Cuadro 5) se observó que los

explantes que fueron seleccionados, mayores de 3.0 cm incluidos en los tratamientos 3 y 4, siempre obtuvieron la mayor supervivencia (100 %), con un mejor desarrollo en cuanto a altura, número de hojas y raíces, sin diferencias entre medios líquido o semisólido.

En el Cuadro 5 se aprecia que tanto para el número de raíces como para la altura de la planta fue favorable la

presencia del AIA 1.3 mg·litro⁻¹, independiente de la concentración de sacarosa.

Fase IV: Aclimatización

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

En el Cuadro 6 se exponen los parámetros evaluados en las plantas cuando se llevaron a aclimatar. La diferencia fue altamente significativa en el tratamiento 1 cuando las plantas tenían más de 5 cm de altura, las que sobreviven en un 99.4 %. Seguidas por aquellas que tenían entre 5 - 3 cm y que logran establecerse en un 95.6 %. Sin embargo, siempre que la altura de las plantas *in vitro* fue inferior a 3 cm, las pérdidas de plantas fueron cuantiosas y sólo sobrevive el 76.6 %.

Las plantas en fase de aclimatización tuvieron un incremento aceptable en su altura (11 - 14 cm) a medida que están más tiempo en umbráculo desde 30 - 60 días, pero sin diferencia significativa con las plantas que fueron extraídas hasta con 3 cm de altura. El número de hojas también se incrementó (5 - 7 hojas), sin diferencia con la duración del ciclo en cámaras hasta los 45 días, siempre que las plantas tenían entre 3 - 5 cm de altura.

DISCUSIÓN

La Fase I de Establecimiento fue mejor cuando se usó 2 % de hipoclorito de sodio con 20 min y el reactivo G-1, obtenido por Cuba y generalizado en todas las Biofábricas, lo cual contribuyó al bajo porcentaje de contaminación *in vitro*. Se corrobora lo planteado por Pérez *et al.* (1998), quienes señalan que con una esterilización química de frascos y la desinfección de los explantes con (NaOCl), se logró contaminaciones por debajo del 5 %, se disminuyen los gastos de energía eléctrica, se incrementa el cultivo *in vitro* y se ahorra gelificantes. Similares resultados obtuvieron Isaza (2004) con otras especies de *Heliconias*. En cuanto al uso de medios líquidos, se han mostrado valores significativamente superiores a otros medios, dado porque en éste es más fácil la absorción de los nutrientes, hay una oxigenación constante y mejor intercambio gaseoso (Grapin, 1998), se permite diluir con mayor facilidad los metabolitos tóxicos que afectan el desarrollo de los explantes.

En Fase de Multiplicación de *H. standleyi* se logran buenos resultados cuando se combinan en el medio de cultivo 6-BAP y AIA. En tal caso Machado *et al.* (2002) y Olivera *et al.* (2000) informaron el uso del 6-BAP para incrementar la brotación en *Gerbera* sp. con concentraciones entre 1.0 y 2.0 mg·litro⁻¹. Mientras que con *Heliconia* sp., Isaza (2004) obtuvo resultados similares utilizando 2.0 mg·litro⁻¹ de 6-BAP y 0.01 g·litro⁻¹ de AIB. El manejo influyó en el comportamiento de las plantas al individualizar los explantes mayores de 1.0 cm elevándose el coeficiente de multiplicación. Pérez *et al.* (1998) planteó al respecto que no en todos los laboratorios de cultivo de tejido se tienen igual criterios y apunta que al seccionar los brotes, se logra la formación acelerada de nuevas yemas adventicias con aumento del coeficiente.

El medio de enraizamiento fue adecuado obteniéndose hasta 100 % de supervivencia con gran desarrollo radicular y buena altura de las plantas. En tal sentido, Laforge *et al.* (1991) han manifestado que un buen manejo de los explantes en la última etapa de enraizamiento produce un efecto favorable en la calidad de las plantas que salen enraizadas, lográndose, además, una mayor homogeneidad de las vitroplantas que van a ser adaptadas *ex vitro* con un mayor número de raíces.

Finalmente, en la aclimatización, las plantas pueden adaptarse bien y lograr buena calidad cuando tienen entre 3-5 cm. Conociendo los gastos que se generan en esta fase se puede ahorrar recursos si las plantas son extraídas con el tamaño adecuado y se aclimatan mejor cuando se mantienen 45 días bajo las condiciones climáticas del territorio. Castro *et al.* (2002), para *Musa*, plantearon que la obtención de brotes mayores de 6 cm implicó plantas de muy buena calidad en fase de aclimatización, lo que condujo a una supervivencia superior al 95.5 %.

Lo anterior concuerda con lo referido por Suárez (1997) en cuanto a la organización de la producción en las biofábricas cubanas en áreas de aclimatización, donde son admisibles valores entre 95-98 % de supervivencia para esta fase. Tales resultados coinciden con los de Pérez *et al.* (1998) que recomiendan que el manejo de las plantas en esta fase debe ser gradual y sin crear traumas, si se quiere obtener plantas de calidad y homogeneidad suficiente para ser llevadas a campo. En este período ocurren la mayor cantidad de pérdidas y, según el cultivo, posterior a los 30

CUADRO 6. Influencia de la altura de las plantas en la fase de aclimatización.

Tratamiento	Supervivencia (%)	Altura planta / en ciclo			Núm. de hojas en ciclo			Salida cepellón en 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 a
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 a
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	2.1 c	2.7 b	3.0 a
ES ±	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 según Duncan para $P < 0.05$.

días se puede lograr sobrevivencias superiores al 90 %. 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*.

CONCLUSIONES

Se evaluó un protocolo que permitió la micropropagación de la especie *Heliconia standleyi* Macbride y su aclimatización en la provincia de Cienfuegos. La mejor desinfección de los explantes se logra con hipoclorito de sodio (NaOCl) y usando preferiblemente concentraciones de 2 % por 20 min. El establecimiento *in vitro* se logró con el medio que contenía sales MS, suplementado con 0.5 mg·litro⁻¹ de tiamina, 2.0 mg·litro⁻¹ de 6-BAP y 20 g de sacarosa. En la fase de multiplicación se logró hasta 4.6 de explantes/ápices, cuando se subcultiva en medio semisólido compuesto por 2.0 mg·litro⁻¹ 6-BAP y 0.65 mg·litro⁻¹ de AIA. El desarrollo de raíces en las vitroplantas es óptimo siempre que se seleccionen explantes hasta 3.0 cm de altura. La supervivencia de las vitroplantas durante la fase de aclimatización fue adecuada cuando las mismas tienen una altura mayor de 3.0 cm, estando listas para enviar a campo después de los 45 días.

LITERATURA CITADA

- AGRAMONTE, D.; PÉREZ, M.; PÉREZ, A. 1993. Empleo del hipoclorito de sodio NaOCl en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola 2: 88-89 p.
- 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. In: Libro de resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Ciudad Habana. Cuba. 46-47 p.
- ALVARADO, Y. 2003. Influencia, identificación, incidencia y estrategia para prevención y control de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar. (*Sacharum* sp híbrido). Tesis Doctorado. 98 pp.
- AUERBACH, M. J.; STRONG, D. R. 1991. Nutritional ecology of *Heliconia herbivores*: Experiments with plant fertilization and alternative hosts. Ecological Monographs 51: 63- 84.
- CASTRO, D.; DÍAZ, J.; MONTOYA, N. 2002. Propagación clonal de bananos en Bioreactores de Inmersión Temporal. XV Reunión Acobat. 44-48 p.
- DEBERGH, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant. 59: 270-276.
- DIVO DE S., M.; VILELLA, F. 1994. Primer Congreso Argentino de Biotecnología. Argentina. 10 pp.
- DUNCAN, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. Biometrics 11: 1-42.
- GRAPIN, A.; MICHAUX FERRIERE, N.; ETIENNE, H.; CARRON, M. 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. 23-25 p.
- HERNÁNDEZ, P. R.; IGARZA, C. Y.; GONZÁLEZ, Y.; PERALTA, E. L.; FONTANELLA, R. J.; NOA, C. J.; PICHARDO, T.; ALONSO, E.; GARCÍA, L.; RODRÍGUEZ, M. 1997. Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum* sp híbrido). Rev. Cuaderno Fitopatología. Levante. España Núm. 3. 153-157 p.
- ISAZA, L. 2004. Establecimiento "in vitro" con fines de producción masiva. Año 10 Núm. 26. 193-198 p. <http://www.utp.edu.co/php/revistas/scienciaettechnica>.
- JIMÉNEZ, F. 2000. Aclimatización de plantas "in vitro" y producción de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casas de cultivos. Tesis para optar por el grado académico de Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. 100 pp.
- KAETHA, K.; BELCHER, A. 1996. Elimination of viruses from cultura in presence of antiviral chemical. En: Withers LA, Alderson PG (Eds.) Plant tissue culture and it applicatium. Butterworth, London. 219-238 p.
- KRIKORIAN, A. D. 1991. Propagación clonal "in vitro". In: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. WILLIAMS, M. ROCA; LUIS, MROGINSKI (Eds). 95-96 p.
- LAFORGE F.; LUSSIER, C.; DESJARDINS Y.; GOSSELIN, A. 1991. Effect of light intensity and CO₂ enrichment *in vitro* rooting on subsequent growth of plantlets of strawberry, raspberry and asparagus in acclimatization. Scientia Horticulturae 47 pp.
- LESHEM, B. 1993. Growth 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.
- MACHADO, P.; AGRAMONTE, D.; ALMANZA, N.; DÍAZ, D; GÓMEZ, L. 2002. Micropropagación de *Gerbera jamesonii* H Bolus. Biotecnología vegetal. IBP. Vol. 2, Núm.3: 169-178 p.
- MACIEL, N. 1999. Consideraciones sobre el género *Heliconia* L. Características del crecimiento, desarrollo y floración de *Heliconia biahii* (L.) L. y *H. latisphata* Benth. Bajo diferentes luminosidades. Tesis Mag. Sc. Barquisimetro, Venezuela. Universidad Centro occidental 'Lisandro Alvarado'. 207-208 p.
- MADRIZ, R.; NOGUERA, R.; SMITS, G. 1989. Patogenos foliares en *Heliconia psittacorum* L. Fitopatol. Venezuela. 2: 61.
- MALAMUG, J. F.; INDEN, H.; ASANHIRA, T. 1991. Plant leaf regeneration and propagation from ginger callus. Sci Hortic 48 (1-2): 89-97.
- MARULANDA, M. L.; ISAZA, L. 2004 Establecimiento *in vitro* de Heliconias con fines de producción masiva. Scientia et Technica 10(26): 193-197.
- MURASHIGE, T. Y.; SKOOG, F. 1962. A revised medium from rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. Plant. Physiology.15: 473-479.
- 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 p.
- ORELLANA, P. 1994. Micropropagación "in vitro" de Plátanos y Bananos. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. 120 pp.
- PÉREZ N. P.; ALVARADO C. Y.; GÓMEZ K. R.; JIMÉNEZ G. E.; ORELLANA, P. P. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Vol. 1 Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Cuba. 400 pp.
- PÉREZ, M.; PASTELÓN, C. 2001. Establecimiento aséptico a partir de ápices de ginger (*Alpinia purpurata* L.). In: Memoria Científica Núm. 7. Décimo cuarta reunión científica-tecnológica-forestal y agropecuaria. Int. Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

- Veracruz-México. s/p.
- RODRÍGUEZ, J.; VEGAS, R.; PENICHET, M.; GUERRA I.; NÚÑEZ, R. 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. 47-52 p.
- SPSS. 2006. Paquete estadístico SPSS para Windows, versión 11.0. SPSS Inc.
- SUÁREZ, M. 1997. Producción masiva en biofábricas (Conferencia 7). Material docente del I Curso Internacional de Propagación Masiva de Especies Tropicales. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Cuba. 35-52 p.
- TORRES, J. G. 1999. Micropropagation and acclimatization of *Hedionea multiflorum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48:213-217.
- VILLALOBOS, A.; GARCÍA, V. A. 1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo "in vitro" de meristemas y ápices vegetativos. Agrociencia 48: 107-118.
- VILLEGAS, M. A. 1990. Desinfección del material vegetativo. In: Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejido vegetal. FAO. 21 pp.