



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *in vitro* Y  
ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS OBTENIDAS POR  
ORGANOGENÉNESIS DIRECTA EN *Heliconia spp***

**ELEODORO HERNÁNDEZ MENESES**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2013**

La presente tesis titulada “**Embriogénesis somática *in vitro* y aclimatación de plántulas obtenidas por organogénesis directa en *Heliconia spp*”**, realizada por el alumno: **Eleodoro Hernández Meneses**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD -  
FISIOLOGÍA VEGETAL**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERA**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. MA. CRISTINA GPE. LÓPEZ PERALTA**

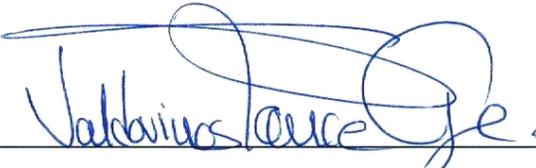
**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. ANDRÉS ADOLFO ESTRADA LUNA**

**ASESORA**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. LUCERO DEL MAR RUIZ POSADAS**

**ASESORA**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. GUADALUPE VALDOVINOS PONCE**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JOAQUÍN MURGUÍA GONZÁLEZ**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2013.

## RESUMEN

### EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *in vitro* Y ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS OBTENIDAS POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA EN *Heliconia* spp

Eleodoro Hernández Meneses, D. C.

Colegio de Postgraduados, 2013

Las heliconias son ornamentales tropicales muy vistosas y apreciadas por los colores brillantes y las formas exóticas de sus inflorescencias. Su cultivo en México es reciente en Chiapas, Puebla, Tabasco y Veracruz. Se requieren sistemas de propagación eficientes con altas tasas de multiplicación de plantas que coadyuven a impulsar el cultivo. En *Heliconia* no existen protocolos de propagación a partir de embriogénesis somática. La aclimatación a invernadero de plantas de heliconia producidas *in vitro* es esencial para el éxito de la micropropagación. La finalidad de esta investigación fue: I) Desarrollar un protocolo de propagación de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y la variedad Golden Torch vía embriogénesis somática y II) Estudiar los factores fisiológicos que controlan la aclimatación de plántulas a condiciones de invernadero. La embriogénesis somática se estableció en *H. collinsiana* usando explantes de secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro*. *H. nickeriensis* y la variedad Golden Torch no mostraron capacidad morfogénica para la embriogénesis somática. La inducción de callos se obtuvo con las sales minerales totales del medio de cultivo MS (1962) adicionado con 81.4  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado durante 12 semanas en oscuridad. Los callos proliferaron en el mismo medio de cultivo adicionado con 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D en fotoperiodo de 16 h (45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 16 semanas. La maduración de los embriones somáticos se obtuvo con 2.2  $\mu\text{M}$  de BA y el alargamiento de las plantas se logró en el mismo medio de cultivo con la mitad de concentración de sales, durante ocho semanas en cada etapa. El análisis histológico permitió observar los primeros embriones en callos conformados por tejido parenquimatoso altamente irrigado por tejido vascular y tenían estructura circular constituida por células pequeñas, con núcleos prominentes y citoplasma denso. La aclimatación en invernadero de plántulas de las tres especies fue factible a los 75 días después del trasplante usando turba y perlita (1:1) y riegos con 50% de solución nutritiva Steiner. En plántulas *in vitro* no se dio el cierre estomático inducido por ABA comparado con plantas aclimatadas.

Palabras clave: Callos, 2, 4-D, picloram, embriones, estomas.

## ABSTRACT

### ***In vitro* SOMATIC EMBRYOGENESIS AND ACCLIMATIZATION OF SEEDLINGS OBTAINED BY DIRECT ORGANOGENESIS IN *Heliconia* spp**

**Eleodoro Hernández Meneses, D. C.**

**Colegio de Postgraduados, 2013**

The heliconias are ornamental and tropical plant that are very showy and appreciated by the bright colors and exotic forms of their inflorescences. Its cultivation in Mexico is recent in Chiapas, Puebla, Tabasco and Veracruz. They require efficient propagation systems with high plant multiplication rates that help to boost crop. In the genus *Heliconia* there are not available propagation protocols from somatic embryogenesis. The greenhouse acclimatization of heliconia plantlets produced *in vitro* is an essential step for a successful micropropagation. The objectives of this research were: I) To develop a protocol for propagation of *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* and 'Golden Torch' variety by somatic embryogenesis and II) To study the physiological factors controlling plantlets acclimatization to greenhouse conditions. Somatic embryogenesis was achieved in *H. collinsiana* using cross sections explants of basal pseudostem *in vitro* plantlets. *H. nickeriensis* and variety Golden Torch showed no morphogenic capacity for somatic embryogenesis. Callus induction was obtained with the total minerals MS medium (1962) supplemented with 81.4  $\mu\text{M}$  of 2, 4-D, 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 0.5 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal during 12 weeks under dark condition. Calluses proliferated on the same medium supplemented with 4.5 and 9.0  $\mu\text{M}$  of 2, 4-D at 16 h photoperiod (45 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) for 16 weeks. Maturation of somatic embryos was obtained with 2.2  $\mu\text{M}$  BA and plant elongation was completed with the same culture medium at half of the concentration of salts, for eight weeks at each stage. Histological analysis allowed to observe early embryos in callus with tissue parenchymal shaped highly vascularized by circular structure and they had consisting of small cells with prominent nuclei and dense cytoplasm. Greenhouse acclimatization of the three species, obtained by direct organogenesis, took place at 75 day after transplantation in peat and perlite (1:1) and watered with a 50% Steiner nutrient solution. *In vitro* plantlets did not respond to the ABA-induced stomata closure compared to acclimated plants.

Keywords: Callus, 2, 4-D, picloram, embryos, stomata.

## DEDICATORIA

### **A Sandra Eloísa Rangel Estrada.**

La gran mujer que siempre ha estado al pie del cañón en las buenas y en las malas, mi segunda institución becaria. Tu apoyo fue vital para este logro corazón.

### **A mis padres: Juana Meneses Hernández y Valentín Hernández Ascencio.**

Su incondicional apoyo y esmero se los debo a su sabia conducción.

### **A mis hermanos Gabriela, Efraín, Fátima y Evangelina.**

Todos mantienen el sentido de familia aún en la distancia.

### **A mis sobrinos Saúl Yamir, Alex Alonso, Karem Alejandra, Adriel y Alma Yelina.**

Las personitas que me levantaron el ánimo todo este tiempo.

### **A mi tío Víctor Manuel y Familia.**

Por ser ejemplo de lucha y persistencia a la vida.

### **A todos mis amigos y a toda mi familia.**

## AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que mediante el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** me otorgó la beca económica para cursar mis estudios e investigación.

Al **Colegio de Postgraduados** por darme la oportunidad de obtener el grado doctoral.

Al **Consejo Mexiquense Ciencia y Tecnología** por la beca de tesis de posgrado otorgada para la escritura del presente documento.

Agradezco enormemente a la **Dra. Ma. Cristina Gpe. López Peralta** el apoyo y dedicación otorgados en mi formación académica.

A la **Finca Las Abejas**, Tacotalpa, Tabasco por facilitarme el material vegetativo empleado en la investigación.

Al **Dr. Andrés A. Estrada Luna** por sus conocimientos y acertadas aportaciones.

A la **Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce** por su conducción en el estudio histológico.

A la **Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas** por su coordinación en los estudios estomáticos.

Al **Dr. Joaquín Murguía González** por sus contribuciones valiosas a la investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Agrícola: **Juan Zaragoza, Janeth Téllez, Laura I. Tovar, Carlos G. J., Vianey C. y Alejandra H.** por su preciada ayuda y amistad.

A la **Biol. Greta Hanako R.** por su invaluable apoyo en el procesamiento de las muestras de microscopía electrónica.

Especial reconocimiento al **M. C. Jorge Valdez** por su ilimitado apoyo y consejos en la obtención y edición de fotografías.

A la familia **Bobadilla Adame** por su confianza, amistad e incondicional apoyo otorgado durante todo este tiempo. Mil gracias.

A todas aquellas personas que contribuyeron, directa o indirectamente, en el buen término de esta investigación.

**CONTENIDO**

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE</b> .....	<b>xvi</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
1. Planteamiento del problema.....	1
2. Objetivos .....	3
2.1 Generales .....	3
2.2 Específicos.....	3
3. Hipótesis .....	4
4. Revisión de literatura .....	5
4.1 Importancia económica de las heliconias .....	5
4.2 Embriogénesis somática .....	8
4.2.1 Embriogénesis somática <i>in vivo</i> : Apomixis .....	9
4.2.2 Embriogénesis somática <i>in vitro</i> .....	11
4.2.2.1 Factores que afectan la embriogénesis somática .....	12
4.2.2.2 Bases fisiológicas de la embriogénesis somática.....	16
4.2.3 Aplicaciones de la embriogénesis somática <i>in vitro</i> .....	19
4.2.3.1 Investigación del inicio de la embriogénesis cigótica.....	20
4.2.3.2 Propagación masiva.....	20
4.2.3.3 Transformación genética .....	21
4.2.3.4 Semilla sintética.....	21
4.2.4 Embriogénesis cigótica y somática en monocotiledóneas.....	22
4.3 Aclimatación de plántulas .....	26
5. Literatura citada .....	28
<b>CAPÍTULO I. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>Heliconia</i> spp Y ANÁLISIS HISTOLÓGICO</b> .....	<b>33</b>
1.1 Introducción .....	33
1.2 Materiales y métodos .....	35
1.2.1 Material vegetal.....	35
1.2.2 Inducción de callo y embriones somáticos .....	35

1.2.2.1 Medio de cultivo y condiciones de incubación .....	35
1.2.2.2 Tipos de explantes .....	35
1.2.2.3 Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) y carbón activado en la inducción de callos .....	37
1.2.2.4 Efecto de otras fuentes de auxinas en la inducción e iniciación de callos durante 4, 8 y 12 semanas después de la siembra .....	38
1.2.2.5 Evaluación de la calidad de luz en la inducción de callos .....	40
1.2.2.6 Efecto de la concentración de sales minerales (%) y sacarosa (g L <sup>-1</sup> ) del medio de cultivo MS (1962) en la inducción de callo.....	41
1.2.3 Proliferación de callos, inducción de etapas embriogénicas y maduración de embriones somáticos.....	42
1.2.4 Maduración de embriones somáticos y regeneración de plántulas .....	42
1.2.5 Alargamiento de plántulas.....	43
1.2.6 Análisis histológico de la masa de callo embriogénico .....	44
1.2.7 Observación de callos y embriones somáticos en microscopio estereoscópico y electrónico de barrido .....	45
1.3 Resultados y discusión .....	47
1.3.1 Inducción de callo embriogénico .....	47
1.3.1.1 Efecto del tipo de explante en la inducción de callos .....	47
1.3.1.2 Efecto de otras fuentes de auxinas en la inducción e iniciación de callos durante 4, 8 y 12 semanas después de la siembra .....	53
1.3.1.3 Evaluación de la calidad de luz en la inducción de callos .....	59
1.3.1.4 Efecto de la concentración de sales minerales (%) y sacarosa (g L <sup>-1</sup> ) del medio de cultivo MS (1962) en la inducción de callo.....	62
1.3.2 Proliferación de callos, inducción de etapas embriogénicas y maduración de embriones somáticos.....	65
1.3.3 Análisis histológico y observación en MEB del callo embriogénico y embriones somáticos.....	70
1.3.4 Maduración de embriones somáticos y regeneración de plántulas .....	73
1.3.5 Alargamiento de plántulas.....	76
1.4 Conclusiones.....	81
1.5 Literatura citada.....	83
<b>CAPÍTULO II. ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>Heliconia</i> spp OBTENIDAS POR ORGANOGENESIS DIRECTA A CONDICIONES DE INVERNADERO .....</b>	<b>90</b>
2.1 Introducción .....	90
2.2 Materiales y métodos .....	92

2.2.1 Material vegetal y obtención de plántulas <i>in vitro</i> .....	92
2.2.2 Aclimatación de plántulas.....	92
2.2.2.1 Transferencia, acondicionamiento y establecimiento <i>ex vitro</i> de plántulas .....	92
2.2.2.2 Variables evaluadas y análisis estadístico .....	94
2.2.3 Análisis histológico de hojas.....	94
2.2.4 Fisiología estomática de plántulas <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> .....	95
2.3 Resultados y discusión .....	96
2.3.1 Supervivencia de plántulas.....	96
2.3.2 Número de hojas.....	100
2.3.3 Diámetro de la base del pseudotallo.....	103
2.3.4 Altura de planta.....	105
2.3.5 Fisiología estomática de plántulas <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> .....	110
2.4 Conclusiones.....	115
2.5 Literatura citada.....	116
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>118</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>119</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies y variedades de heliconias cultivadas como flor de corte en México. ....	7
Cuadro 2. Tipos de explantes ( <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ), concentraciones de carbón activado y ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) en la inducción de callo en <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> L.f. x <i>H. spathocircinata</i> var. 'Golden Torch'. ....	38
Cuadro 3. Tipos de auxinas y concentraciones evaluadas en la inducción de callo embriogénico en explantes de secciones transversales basales de pseudotallo en tres especies de heliconias cultivados en medio MS (1962) adicionado con carbón activado (0.5 g L <sup>-1</sup> ). ....	39
Cuadro 4. Relación de diferentes condiciones ambientales de incubación en la inducción de callos a partir de explantes de secciones transversales basales de pseudotallos de <i>H. collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) durante cuatro, ocho y 12 semanas. ....	40
Cuadro 5. Concentraciones de sales minerales del medio de cultivo MS (1962) (%) y sacarosa (g L <sup>-1</sup> ) evaluadas en la inducción de callo embriogénico en secciones transversales basales de pseudotallos de plántulas <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> cultivadas en medio MS (1962) adicionado con 2,4-D (81.4 µM) y carbón activado (0.5 g L <sup>-1</sup> ). ....	41
Cuadro 6. Concentraciones de ácido abscísico (ABA) y benciladenina (BA) evaluadas en la maduración de embriones somáticos de <i>H. collinsiana</i> . ....	43
Cuadro 7. Efecto del tipo de explante en la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados durante 12 semanas en oscuridad en varias concentraciones de 2,4-D y carbón activado (C.A.). ....	47
Cuadro 8. Efecto del ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) y carbón activado (C.A.) en la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en diversos explantes de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados durante 12 semanas en oscuridad. ....	48
Cuadro 9. Inducción de callos (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio MS (1962) adicionado con varias fuentes y dosis de auxinas y carbón activado (0.5 g L <sup>-1</sup> ) a las cuatro, ocho y 12 semanas en oscuridad. ....	54
Cuadro 10. Efecto del tipo y concentración de ácido abscísico (ABA) y bencil adenina (BA) en el incremento de callos embriogénicos y número de embriones (globulares, escutelares y coleoptilares) en <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) durante ocho semanas. ....	73
Cuadro 11. Efecto del porcentaje total de sales del medio de cultivo MS (1962) en la tasa de regeneración y altura de plantas de <i>Heliconia collinsiana</i> obtenidas por embriogénesis somática a las ocho semanas de cultivo. ....	77
Cuadro 12. Porcentajes de supervivencia de plantas de <i>Heliconia collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos y concentraciones de solución nutritiva de Steiner (1961) a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt). ....	96

Cuadro 13. Número de hojas de plantas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).....101

Cuadro 14. Diámetro de la base del pseudotallo de plantas (cm) de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).....104

Cuadro 15. Altura de planta (cm) de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt). ....106

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies de heliconias cultivadas como flores de corte empleadas como material biológico experimentan en la presente investigación. (A) <i>H. collinsiana</i> , (B) <i>H. nickeriensis</i> , (C) <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> cv. 'Golden Torch'.	8
Figura 2. Rutas que conducen al desarrollo del embrión en plantas superiores (Fehér, 2005).	17
Figura 3. Modelo hipotético de eventos que suceden en la embriogénesis somática (Fehér, 2005).	19
Figura 4. Embriogénesis en <i>Sagittaria sagittaeifolia</i> . (A–J) Células derivadas de célula terminal y basal separadas por línea oscura. (K) Embrión maduro en semilla. El ápice de brote y cotiledón se forman a partir de las derivadas de la célula terminal original. Fuente: Gifford y Foster, 1989.	23
Figura 5. Embriones jóvenes de <i>Ottelia alismoides</i> . (A) Origen común del primordio de cotiledón y ápice de brote desde una región terminal del pro-embrión (marcada por la línea negrita superior). (B) Última etapa que muestra el desplazamiento lateral del ápice del brote producto del crecimiento del cotiledón. Fuente: Gifford y Foster, 1989.	24
Figura 6. Esquema de la embriogénesis temprana en maíz. (a) Vista frontal del proembrión. (b) Vista frontal de la transición del embrión. (c) Vista frontal del embrión en etapa coleoptilar. (d) Sección esquemática del embrión en estado coleoptilar. (e) Vista frontal del embrión con el primer primordio de hoja empezando a crecer hacia arriba desde el lado inferior del meristemo apical de brote. (f) Sección esquemática del tipo de embrión en (e) que indica la transición de un estado a otro. Fuente: Raghavan, 2006.	25
Figura 7. Sección transversal basal de yema lateral en <i>Heliconia nickeriensis</i> obtenida de rizomas extraídos de plantas cultivadas en campo. (A) Yema lateral y (B) Explante basal.	36
Figura 8. Explantes obtenidos de plántulas de heliconias cultivadas <i>in vitro</i> durante en la inducción de callo. (A y B) Sección transversal basal de pseudotallo; (C) Segmento de hoja; (D) Brote; (E) Segmentos de pecíolo; (F) Ápices de raíz.	37
Figura 9. Diagrama de la metodología para la propagación <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' vía embriogénesis somática.	46
Figura 10. Porcentaje de inducción de callos en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> cultivadas en 2,4-D y 0.5 g L <sup>-1</sup> de carbón activado después de 12 semanas en condiciones de oscuridad.	48
Figura 11. Respuestas de explantes de <i>Heliconia collinsiana</i> en la inducción de callos <i>in vitro</i> cultivados en 2,4-D y carbón activado (0.5 g L <sup>-1</sup> ) después de 12 semanas en oscuridad. (A) Ápices de raíz, (B) Sección transversal basal de pseudotallo, (C) Segmento de hoja, (D) Segmento de pecíolo. Inducción de callo en los bordes del explante de secciones transversales basales de pseudotallo con (E) 54.3 y (F) 81.4 µM de 2, 4-D.	49
Figura 12. Cortes histológicos de secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Heliconia collinsiana</i> usadas como explantes en la inducción de callos. zc = zona de crecimiento con células meristemáticas; h = hoja envainada.	51

Figura 13. Inducción de callos en secciones transversales basales del pseudotallo de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio MS (1962) adicionado con 2,4-D y picloram a las cuatro, ocho y 12 semanas en oscuridad.....	55
Figura 14. Inducción de callos <i>in vitro</i> en explantes de secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) adicionado con carbón activado (0.5 g L <sup>-1</sup> ). (A) Callos inducidos con 81.4 µM de 2,4-D después de 4, (B) 8 y (C) 12 semanas de cultivo en oscuridad. (D) Callos inducidos con 135.7 µM de picloram cultivados en oscuridad después de 4, (E) 8 y (F) 12 semanas. ....	56
Figura 15. Crecimiento de callos generados en secciones transversales basales del pseudotallo de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) sin fitohormonas en fotoperiodo de 16 h (45 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) durante ocho semanas. (A) Callos procedentes de 135.7 µM de picloram mantenidos en oscuridad por 12 semanas. (B, C) Callos procedentes de 81.4 µM de 2,4-D mantenidos en oscuridad por 12 semanas.....	56
Figura 16. Efecto de las condiciones de luz en la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio MS (1962) adicionado con 2, 4-D y picloram a las cuatro, ocho y 12 semanas. ....	60
Figura 17. Inducción de callos en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en (A-C) luz blanca (45 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) y (D-F) luz azul (25 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ). (A) Callos generados a las 4 semanas con 81.4 µM de 2, 4-D. (B) Callos inducidos a las 8 y (C) 12 semanas con 135.7 µM de picloram. (D) Callos inducidos a las 4 semanas con 135.7 µM de picloram. (E) Callos formados a las 4 y (F) y 12 semanas de cultivo con 81.4 µM de 2, 4-D. ....	61
Figura 18. Efecto de las concentraciones de sales minerales del medio de cultivo MS (1962) (%) y sacarosa (g L <sup>-1</sup> ) en la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> con 2, 4-D (81.4 µM) durante 12 semanas en oscuridad. ....	63
Figura 19. Efecto de la combinación de sales minerales (%) y sacarosa (g L <sup>-1</sup> ) en la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio MS (1962) adicionado con 2, 4-D (81.4 µM) a las 12 semanas en oscuridad. ....	63
Figura 20. Proliferación de callos (g) de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) en fotoperiodo de 16 h (45 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ).....	66
Figura 21. Callos embriogénicos (%) y embriones globulares (%) y escutelares (%) formados en la etapa de proliferación en <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) adicionado con 2, 4-D (0, 4.5 y 9.0 µM) en fotoperiodo de 16 h (45 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) a las 16 semanas. ....	67
Figura 22. Proliferación de callos embriogénicos y germinación de embriones somáticos de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) en fotoperiodo de 16 h (45 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ). (A) Callos cultivados en medio sin fitohormonas a las cuatro semanas. (B) Callos cultivados con 4.5 y (C) 9.0 µM de 2, 4-D a las ocho semanas. (D) Masas proembriogénicas cultivadas con 9.0 µM de 2, 4-D a las 12 semanas. (E) Embriones en estado globular en masas proembriogénicas. (F-G) Embriones globulares y escutelares	

en 4.5 $\mu\text{M}$ a las 16 semanas. (H-L) Transición de embriones globulares a escutelar y coleoptilar. eg=embrión globular; ee=embrión escutelar; ec=embrión coleoptilar; s=suspensor.....	68
Figura 23. Aspectos morfo histológicos de la embriogénesis somática de <i>Heliconia collinsiana</i> . (A) Callo embriogénico con (B) tejido vascular y presencia de fenoles. (C-D) Callo embriogénico con divisiones celulares constantes. (E) Masas proembriogénicas con la (F) formación de proembriones de estructura circular marcarlo en la foto y (G-H) embriones globulares. (I) Primordios de hoja y meristemo de brote. (J) Embrión en etapa coleoptilar donde se aprecia la (K) protodermis y (L) procambium. (M-O) Embrión con las primeras hojas y meristemo apical de brote. pr=protodermis; pc=procambium; h=hoja; mab=meristemo apical de brote.....	72
Figura 24. Etapa de maduración de embriones somáticos de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados durante ocho semanas en medio MS (1962). (A) Callos embriogénicos cultivados en medio sin fitohormonas con secciones ennegrecidas. (B) Embriones somáticos globulares en proceso de desarrollo a escutelares y coleoptilares en 2.2 $\mu\text{M}$ de BA. (C, D) Regeneración de plántulas a partir de embriones coleoptilares en medio suplementado con 2.2 $\mu\text{M}$ de BA. eg=embrión globular; ee=embrión escutelar; ec=embrión coleoptilar; pl=plántula.....	74
Figura 25. Tasa de regeneración de plántulas (%) y total de plantas regeneradas (Núm.) en cultivos de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo en medio MS (1962) sin hormonas (SH) y suplementado ácido abscísico (ABA) y benciladenina (BA).....	75
Figura 26. Alargamiento de plantas de <i>Heliconia collinsiana</i> obtenidas mediante embriogénesis somática. (A, B) Apariencia de las plantas de diferente tamaño a las cuatro semanas de cultivo. (C, D) Plantas de mayor tamaño que iniciaron su enraizamiento a las ocho semanas de cultivo.....	78
Figura 27. Protocolo para la propagación <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> vía embriogénesis somática.....	80
Figura 28. Protocolo de regeneración <i>in vitro</i> de <i>H. collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y <i>H. psittacorum</i> x <i>H. spathocircinata</i> var. 'Golden Torch' vía organogénesis directa (Hernández, 2008).....	93
Figura 29. Trasplante <i>ex vitro</i> de plántulas de tres especies de <i>Heliconia</i> , regeneradas por organogénesis directa <i>in vitro</i> para su establecimiento a sustrato y aclimatación.....	94
Figura 30. Tiras de epidermis de superficie abaxial empleadas en la descripción de la morfología (A) y fisiología estomática (B) de <i>Heliconia collinsiana</i> .....	95
Figura 31. Efecto del sustrato y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) en la supervivencia (%) de plantas de <i>Heliconia collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).....	97
Figura 32. Aclimatación de plantas de heliconias obtenidas vía organogénesis directa en diferentes sustratos. (A) Plántula enraizada de <i>H. nickeriensis</i> previo al trasplante. (B) Plántulas de variedad Golden Torch recién trasplantadas en perlita, turba y turba/perlita. (C) Plantas aclimatadas de <i>H. collinsiana</i> en mezcla turba/perlita en diferentes periodos de trasplante. Nota: La imagen de la planta de 35 ddt se tomó al tercer día de retirada la cubierta protectora.....	99

Figura 33. Efecto del sustrato y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) en el número de hojas de plantas de <i>Heliconia collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante.....	102
Figura 34. Amarillamiento y necrosis de hojas basales en plantas aclimatadas de heliconia plantadas en mezcla de turba y perlita a los 75 días después del trasplante. (A) <i>Heliconia nickeriensis</i> , (B) <i>H. collinsiana</i> .....	103
Figura 35. Efecto del sustrato y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) en el diámetro de pseudotallo en la base de plantas (cm) de <i>Heliconia collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante.....	105
Figura 36. Efecto del sustrato y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) en la altura de plantas (cm) de <i>Heliconia collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante.....	107
Figura 37. Relación entre altura y diámetro de base de pseudotallo en plantas de heliconia aclimatadas a condiciones de invernadero en mezcla de turba y perlita a los 75 días después del trasplante.....	108
Figura 38. Respuesta en plantas de <i>Heliconia collinsiana</i> aclimatadas a condiciones de invernadero en mezcla de turba y perlita a los 75 días después del trasplante. (A) Solución Steiner (1961) a 50% y (B) 100%.....	109
Figura 39. Plantas de heliconia aclimatadas en mezcla de turba y perlita después de cinco meses del trasplante y listas para su plantación en el campo. (A) <i>Heliconia collinsiana</i> , (B) <i>H. nickeriensis</i> y (C) var. 'Golden Torch'.....	109
Figura 40. Longitud y apertura ( $\mu\text{m}$ ) de estomas en plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio de enraizamiento <i>in vitro</i> y plantas aclimatadas por 75 días en mezcla de turba y perlita y fertilizadas con 50% de solución nutritiva Steiner (1961).....	110
Figura 41. Frecuencia estomática observada en plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio de enraizamiento <i>in vitro</i> y plantas aclimatadas por 75 días en mezcla de turba y perlita y fertilizadas con 50% de solución nutritiva Steiner (1961).....	110
Figura 42. Apertura estomática de tiras de epidermis de hojas de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio de enraizamiento <i>in vitro</i> y plantas aclimatadas por 75 días expuestas a diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA).....	112
Figura 43. Respuesta observada en tiras de epidermis de hojas de (A) plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio de enraizamiento <i>in vitro</i> y (B) plantas aclimatadas por 75 días expuestas a 0.01 mM de ácido abscísico. ea=estoma abierto; ec=estoma cerrado.....	112

## ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

1. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en diferentes explantes de <i>Heliconia collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' cultivados en varias concentraciones de 2,4-D y carbón activado después de 12 semanas en oscuridad.....	119
2. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en medio MS (1962) suplementado con varias fuentes y dosis de auxinas y carbón activado (0.5 g L <sup>-1</sup> ) durante 4, 8 y 12 semanas en oscuridad.....	119
3. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en diferentes condiciones de luz durante 4, 8 y 12 semanas.....	119
4. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de callos <i>in vitro</i> (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivadas en diferentes concentraciones de sales minerales y sacarosa durante 12 semanas en oscuridad.....	120
5. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la proliferación de callos embriogénicos (g) de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) suplementado con dos concentraciones de 2, 4-D y carbón activado (0.5 g L <sup>-1</sup> ) durante 4, 8, 12 y 16 semanas en fotoperiodo 16 h.....	120
6. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza del número de embriones globulares y escutelares obtenidos en la etapa de proliferación de callos embriogénicos de <i>Heliconia collinsiana</i> cultivados en medio MS (1962) suplementado con 2, 4-D y carbón activado (0.5 g L <sup>-1</sup> ) durante 16 semanas en fotoperiodo 16 h.....	120
7. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza del peso de callo fresco (g) y número de embriones (globulares, escutelares, coleoptilares) obtenidos en la etapa de maduración y regeneración de plántulas de la embriogénesis somática de <i>Heliconia collinsiana</i> a las ocho semanas en fotoperiodo 16 h.....	121
8. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de regeneración (%) y altura de plantas (cm) de <i>Heliconia collinsiana</i> obtenidas por embriogénesis somática en varios porcentajes de sales minerales totales del medio MS (1962) a las ocho semanas.....	121
9. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza de la supervivencia (%) de plántulas de <i>Heliconia collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt). Los valores se transformaron con Y + 0.5.....	121
10. Cuadros medios y su significancia del análisis de varianza del número de hojas de plántulas en <i>Heliconia collinsiana</i> , <i>H. nickeriensis</i> y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).....	122

11. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza del diámetro (cm) del pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt). ..... 122
12. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la altura (cm) de plántulas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt). ..... 122

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. Planteamiento del problema

En México se producen alrededor de 65 tipos de plantas ornamentales siendo las gladiolas, crisantemos y palma camedor (follaje) las especies que acumulan el 50 % de la superficie cultivada con 7,678.5 ha. Es importante resaltar que de estas tres, las dos primeras se cultivan para la producción de flores para corte y la palma camedor se cultiva como ornamental de follaje. El valor de la producción de la floricultura en México en el año de 2011 alcanzó los 5,685.37 millones de pesos, de los cuales cerca de 56% (3,193.7 millones) correspondieron solamente a rosa, crisantemo, gladiola y noche buena (SIAP, 2011).

Las heliconias son ornamentales tropicales muy vistosas y apreciadas por los colores brillantes y las formas exóticas de sus inflorescencias, lo que las ha convertido en productos agrícolas con potencial comercial. Aunado a esto, la producción de inflorescencias de forma continua en cantidades abundantes y la larga vida en florero que pueden alcanzar son características de gran importancia para los productores y consumidores que han promovido la expansión de su cultivo como flores de corte en muchos países con ambientes tropicales, de entre los cuales Colombia es el principal país productor (Colfloras, 2007).

En México, el cultivo de las heliconias es reciente, se introdujeron en el año de 1990 en el sur del país en los Estados que cuentan con condiciones de clima tropical y subtropical. A pesar de esto, el incremento en la superficie de cultivo y la importancia relativa de estas ornamentales ha ido en un lento pero paulatino crecimiento. Sin embargo, uno de los factores que podría coadyuvar a impulsar su cultivo es el establecimiento de sistemas de propagación eficientes y con elevadas tasas de multiplicación de plantas, ya que el uso de semilla no es tan eficiente por la barrera física que representa para la germinación la presencia de un endospermo rígido y la variabilidad natural observada en la progenie cuando se emplea la reproducción sexual (Colfloras, 2007). Las heliconias también se pueden propagar por métodos asexuales mediante el empleo de la división de rizomas, el cual es el método de propagación tradicional, ya que garantiza la obtención de plantaciones clonales (Simão y Scatena, 2003).

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* han beneficiado en gran medida la producción y mejoramiento de muchas especies vegetales. La micropropagación ha sido, sin lugar a dudas, la más empleada en la industria ornamental para la propagación de genotipos con características sobresalientes o mejorados, plantas amenazadas y en peligro de extinción, conservando la estabilidad genética o la regeneración de plantas libres de virus (George y Debergh, 2008). La propagación de heliconias mediante estas técnicas se ha conseguido a través del cultivo de yemas laterales, yemas florales y secciones de pseudotallo (Nathan *et al.*, 1992; Goh *et al.*, 1995; Hernández, 2008; Marulanda-Ángel *et al.*, 2011).

En las especies estudiadas del género *Heliconia* no se ha implementado ningún protocolo de propagación a partir de la inducción del fenómeno de embriogénesis somática. La importancia de trabajar con esta ruta morfogénica estriba en que posibilita la propagación y producción potencial de un gran número de plantas a partir de un explante. Además, las plantas derivadas mediante la embriogénesis somática son genéticamente más estables que las derivadas a partir de organogénesis porque los embriones somáticos son intolerantes a mutaciones, ya que pondrían en riesgo la finalización exitosa de su ontogenia (Yang y Zhang, 2010).

Por otro lado, cabe mencionar que la aclimatación de plantas producidas *in vitro* a condiciones de invernadero o campo es un paso esencial que determina el éxito de un sistema de micropropagación porque entre ambos entornos existe una diferencia abismal. Para muchas especies se requieren de procedimientos de aclimatación óptimos que garanticen alta supervivencia, crecimiento y establecimiento definitivo en campo (Hazarika, 2006).

La presente investigación se llevó a cabo en dos etapas. I. Desarrollar un protocolo de propagación de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* var. 'Golden Torch' por la vía de embriogénesis somática, que es una de las rutas de regeneración de plantas dentro del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. II. Estudiar las condiciones que controlan el proceso de aclimatación de plántulas a condiciones de invernadero, el cual es la etapa final para completar el proceso de regeneración vía organogénesis directa *in vitro* que se desarrolló en los estudios de maestría. El establecimiento de este proceso contribuirá a la eventual aclimatación de plantas obtenidas a partir de embriones somáticos.

## 2. Objetivos

### 2.1 Generales

- Desarrollar un protocolo de regeneración *in vitro* de *Heliconia collinsiana* Griggs, *H. nickeriensis* Mass & Rooij y variedad 'Golden Torch' vía embriogénesis somática evaluando la influencia de diversos factores (tipo de explante, especie de *Heliconia*, luminosidad, fitohormonas, entre otros).
- Analizar histológicamente y con microscopía electrónica de barrido el proceso de inducción de embriones somáticos en *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* var. 'Golden Torch' para determinar su origen anatómico.
- Aclimatar y trasplantar a condiciones de invernadero plántulas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* var. 'Golden Torch' regeneradas mediante organogénesis directa *in vitro*.

### 2.2 Específicos

- Evaluar la capacidad morfogénica de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' para la inducción de embriogénesis somática.
- Determinar la mejor fuente (*in vivo* e *in vitro*) y tipo de explante en la inducción de embriogénesis somática de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch'.
- Evaluar el efecto de diferentes auxinas (2,4-D, dicamba y picloram), luminosidad (oscuridad y fotoperiodo) y concentraciones de sales minerales y sacarosa en la inducción y proliferación de callo embriogénico de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch'.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de citocininas y ácido abscísico en la maduración de embriones somáticos y regeneración de plántulas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch'.

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sales minerales del medio de cultivo durante la etapa de alargamiento de plantas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch'.
- Analizar histológicamente y con microscopio electrónico de barrido los callos embriogénicos para determinar el origen anatómico de los embriones somáticos generados.
- Establecer las condiciones específicas para el proceso de aclimatación de plántulas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch', obtenidas por organogénesis, y su trasplante a condiciones de invernadero.

### 3. Hipótesis

- El proceso de embriogénesis somática en *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* var. 'Golden Torch' está en función del genotipo, origen y tipo de explante, condiciones de luminosidad, concentraciones y combinaciones hormonales, así como de concentraciones de sales minerales y sacarosa del medio de cultivo.
- Las plántulas de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch', obtenidas por organogénesis directa *in vitro*, se aclimatan a condiciones de invernadero si se proporcionan las condiciones óptimas de humedad, nutrición y luminosidad.

## 4. Revisión de literatura

### 4.1 Importancia económica de las heliconias

De acuerdo con información del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, en México se producen alrededor de 65 tipos de plantas ornamentales de los cuales la gladiola, el crisantemo y la palma camedor representan el 50% (7,678.5 ha) de la superficie dedicada a la floricultura. Las dos primeras especies se comercializan como flores de corte, mientras que la palma camedor se cultiva para su venta como follaje fresco. El valor de la producción de la floricultura en México en 2011 alcanzó los 5,685.37 millones de pesos, de los cuales, cerca del 56% (3,193.7 millones) correspondió a rosa (*Rosa* spp), crisantemo (*Chrysanthemum* spp), gladiola (*Gladiolus* spp) y noche buena (*Euphorbia pulcherrima*) (SIAP, 2011).

Sin embargo, a pesar del gran esfuerzo que realiza el SIAP por reunir las estadísticas de producción de la mayoría de los cultivos ornamentales en México, escapan de sus bases de datos la información referente a especies como anturios, ginger, maracas, orquídeas, musáceas y heliconias, entre muchas otras. En el caso específico de las heliconias, el SIAP las reconoce como especie ornamental pero no dispone de información oficial del cultivo.

Las heliconias, conocidas comúnmente como platanillos, son especies ornamentales de origen tropical que se cultivan y aprovechan como flores de corte y como plantas en maceta. Por lo regular, las especies y variedades de porte pequeño se cultivan como plantas en macetas (*Heliconia strictavar.* 'DwarfJamaican' y variedades de *H. psittacorum*) que decoran parques, edificios y jardines. En cambio, las inflorescencias de especies y variedades de porte alto (2.0 – 5.0 m) se aprovechan como flores de corte y es el motivo por el cual se han dado a conocer dentro del mercado de flores de corte (Kress *et al.*, 1999; Colfloras, 2007).

En México, las heliconias se cultivan en estados que cuentan con las condiciones apropiadas para su cultivo y adecuado crecimiento. De acuerdo con información extraoficial, las empresas y fincas que producen heliconias se ubican en los estados de Chiapas, Puebla, Tabasco y Veracruz; los cuales pueden considerarse como los de mayor interés en la producción de estas ornamentales. Como productores emergentes se consideran Yucatán, Quintana Roo, Morelos, Colima y Nayarit. Las empresas más grandes se ubican en Chiapas, porque fue el estado en

donde se cultivaron las primeras variedades de heliconias que fueron introducidas desde Costa Rica y otros países centroamericanos en el año de 1990.

Resulta complicado estimar la superficie cultivada con heliconias en México porque existen productores que cultivan en parcelas pequeñas que no rebasan 1 ha. Se carece de investigaciones científicas u oficiales (gubernamentales) que indiquen la situación actual o el crecimiento de este cultivo ornamental, a excepción de un estudio que analiza la horticultura ornamental en Veracruz. Los resultados indican que existe un total estatal de 50 ha cultivadas con heliconias en 23 fincas distribuidas en los municipios de Catemaco, Amatlán de los Reyes, Omealca, Córdoba, Fortín, Tezonapa, San Andrés Tuxtla y Santiago Tuxtla (Murguía *et al.*, 2007).

Para el estado de Chiapas, de forma extraoficial, existen aproximadamente 100 ha cultivadas con heliconias asociadas con otras especies tropicales [ginger (*Alpinia purpurata*), maracas (*Zingiber zerumbet*), ave de paraíso (*Strelitzia reginae*), *Costus* spp y musáceas (*Musa* spp)] distribuidas en la región de Soconusco (Tapachula, Tuxtla Chico, Mazatán, Nueva Alemania, entre otros). En Tabasco, la superficie cultivada no rebasa las 30 ha, las cuales se encuentran distribuidas en los municipios de Comalcalco, Centro, Tacotalpa y Teapa. Para los demás estados, la información es somera y se estima que en Yucatán existen plantadas 15 ha, en Quintana Roo 10 ha, en Colima 10 ha y 5 más en Nayarit. El recuento total estima que en todo el país existen alrededor de 220 ha cultivadas con estas ornamentales. Si se toma como referencia las 80 ha establecidas por una empresa en Tapachula, Chiapas en el año 2000, a la fecha el incremento en la superficie cultivada con heliconias representa 175%; que se traduce en un incremento anual sostenido de 14.5 %. Las hectáreas cultivadas incluyen todas las especies y variedades de heliconias.

El trabajo de campo y recorridos por empresas y fincas que producen heliconias ha permitido conformar un registro de las principales especies y variedades que se producen y comercializan en México. Es importante destacar que las variedades que más se producen y que se consideran típicas, son las que predominan en la central de abasto de la ciudad de México y diversas florerías (Cuadro 1).

Dentro de este listado de especies y variedades se encuentran las que son el objeto de estudio de la presente investigación, que se caracterizan por cultivarse como flores de corte.

**Cuadro 1. Especies y variedades de heliconias cultivadas como flor de corte en México.**

Especie	Variedades
<i>Heliconia bihai</i>	Grand Mama, Grand Papa, Pink Peach
<i>H. collinsiana</i>	
<i>H. caribaea</i>	Princess, Gold, Caribe roja, Jacquini
<i>H. caribea x H. bihai</i>	Green Thumb
<i>H. chartacea</i>	Sexy Pink, Sexy Scarlet
<i>H. nickeriensis</i>	
<i>H. orthotricha</i>	She Kong, Edge Of Nite, She, She lisa
<i>H. platystachys</i>	Sexy Orange
<i>H. psittacorum</i>	Lady Di, Red Golden Opal, Sassy, St. Vincent Red
<i>H. psittacorum x H. spathocircinata</i>	Golden Torch
<i>H. rostrata</i>	Rostrata Five Day, Rostrata Tend Day
<i>H. spp.</i>	Butter, Tobago
<i>H. stricta</i>	Bob's Re, Golden Opal, Iris Red, Real Sharonii, Tagami
<i>H. wagneriana</i>	

Fuente: Elaboración propia, 2013.

***H. collinsiana*.** Es una heliconia de inflorescencia colgante cuya floración ocurre en los meses de julio a noviembre. Alcanza una altura de 3.0 a 4.5 m y se adapta muy bien para su cultivo en áreas con 50% de sombreado. La inflorescencia consta de 12 a 18 brácteas de color rojo brillante y cubiertas de cera blanca; el raquis es de color rojizo y su hábito de crecimiento es tipo musoide (Berry y Kress, 1991) (Figura 1A).

***H. nickeriensis*.** Es una heliconia que produce inflorescencias erectas dísticas durante los meses de junio a noviembre. Puede alcanzar un porte de 1.2 a 3.0 m de altura y se adapta bien para su cultivo a pleno sol, aunque puede tolerar lugares hasta con 40% de sombra. La inflorescencia puede tener de cinco a nueve brácteas de color rojo-naranja y el raquis de color amarillo distalmente y rosa hacia la base. Posee sépalos de color dorado, ovario de color amarillo oscuro distalmente y amarillo claro hacia la base y pedicelos de color amarillo claro. Es una especie de crecimiento musoide y pueden presentarse variaciones rojas y amarillas en la tonalidad de las brácteas. Presenta una duración en florero de 10 días y mantiene una producción más o menos constante durante todo el año (Berry y Kress, 1991) (Figura 1B).



**Figura 1.** Especies de heliconias cultivadas como flores de corte empleadas como material biológico experimentan en la presente investigación. (A) *H. collinsiana*, (B) *H. nickeriensis*, (C) *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. 'Golden Torch'.

***H. psittacorum* x *H. spathocircinata* var. 'Golden Torch'.** Se trata de una variedad de porte pequeño (1.5 a 3.0 m) que produce inflorescencias erectas dísticas durante todo el año. Se adapta bien para su cultivo a pleno sol y resiste hasta 40% de sombra. La inflorescencia consta de cuatro a ocho brácteas de color dorado o amarillo, con el raquis dorado. Presenta sépalos de color dorado con la punta débilmente verde. El ovario es también dorado y los pedicelos amarillos con tintes verdes. Su hábito de crecimiento es tipo musoide (Berry y Kress, 1991). Esta variedad es manejable en grandes volúmenes y es de las heliconias más comercializadas. Es susceptible al ataque de barrenador del tallo y las hormigas, que succionan la savia de las brácteas causando manchas en la misma (Figura 1C).

## 4.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un asombroso proceso de desarrollo que le permite a células vegetales somáticas no cigóticas, incluyendo células haploides, formar embriones y, en última instancia, plantas fértiles. Este proceso asexual es posible gracias a la expresión de la totipotencia celular, implica la desdiferenciación de una célula somática y su posterior re-diferenciación (reprogramación) para generar todas las células típicas de una planta adulta (Rose *et al.*, 2010). Aunque la embriogénesis somática principalmente se considera en el contexto del cultivo *in vitro* de células y tejidos, también es una vía natural de la reproducción asexual en algunas especies. En *Kalanchoe*, los embriones somáticos se forman en las hojas suculentas (Garcés *et al.*, 2007) y en la apomixis, un proceso de reproducción clonal donde los embriones se derivan de la pared celular del óvulo, produce semillas genotípicamente idénticas

a los progenitores maternos y se presenta en muchas especies evolutivamente divergentes (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

#### **4.2.1 Embriogénesis somática *in vivo*: Apomixis**

La apomixis se define como la reproducción asexual a través de semillas (Nogler, 1984) y, por lo tanto, conduce a la producción de prole clonal cuyo genotipo es idéntico a la planta madre. La apomixis no sólo es un rasgo útil agronómico con un enorme potencial para el fitomejoramiento, sino también un fenómeno de desarrollo interesante (Koltunow *et al.*, 1995). Los procesos reproductivos apomícticos son diversos y dan lugar a la producción de semillas viables, a pesar de eludir pasos críticos clave para la producción de semilla sexual. En especies sexuales se requiere de la secuencia estrictamente ordenada y definida de eventos para producir semillas viables y las estructuras asociadas al fruto que facilitan la dispersión de semillas. Por el contrario, con la apomixis la formación de semillas y frutos se alcanza a pesar de la omisión de la meiosis y la doble fecundación (Bicknell y Koltunowb, 2004).

La reproducción apomíctica omite eventos críticos observados en la vía sexual. La meiosis se evita antes de la formación del saco embrionario (apomeiosis), el desarrollo del embrión es autónomo (partenogénesis) y la formación del endospermo requiere ciertas adaptaciones de desarrollo. Estas tres características se refieren a menudo como componentes de la apomixis. La sexualidad y la apomixis no son modos mutuamente excluyentes de reproducción. Con pocas excepciones, la mayoría de las especies apomícticas conservan la capacidad de reproducción sexual por lo que se consideran apomícticas facultativas. Dependiendo del modo de apomixis, los eventos de la reproducción sexual pueden ocurrir en el mismo óvulo o en óvulos diferentes de la misma planta apomíctica (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

Los detalles de la reproducción apomíctica varían en términos de los orígenes de las células que inician la apomixis y si su destino inmediato es la formación de un saco embrionario o un embrión. El medio por el cual se evita la meiosis, el grado en que el proceso sexual continúa en paralelo y el requisito de la fertilización y adaptaciones específicas para la formación del endospermo, son todos factores que contribuyen a la diversidad de procesos apomícticos (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

Colectivamente, la apomixis puede iniciar en distintas etapas durante el desarrollo del óvulo. Los eventos a menudo concurrentes de reproducción sexual en el óvulo mismo, o en óvulos adyacentes, se utilizan como puntos de referencia para la sincronización del inicio de la apomixis y su progresión. Los estudios de los procesos descritos apomícticos indican que las células que inician la apomixis pueden surgir de la nucela, el integumento o células epidérmicas en el óvulo. Por lo tanto, en contraste con las plantas sexuales en las que las células que inician los sucesos reproductivos en el óvulo se originan en la capa LII, la zona de competencia reproductiva en óvulos apomícticos se ha ampliado considerablemente para incluir células procedentes de las capas LI y LII (Koltunow y Grossniklaus, 2003; Richards, 2003).

En la apomixis gametofítica se distinguen dos tipos: Diplosporia y aposporia. Las células que inician la apomixis temprana en el desarrollo de óvulos generalmente sufren apomixis gametofítica, que es la formación mitótica de los sacos embrionarios no reducidos. Se subdivide en dos formas en función del origen de la célula que inicia la formación no reducida del saco embrionario. Si la célula progenitora se diferencia en la posición normalmente ocupada por la célula madre de la megaspóra, el modo de formación del saco embrionario se llama diplosporia. En algunas especies diplospóricas se observa citológicamente la entrada de la meiosis pero el proceso la anula y, después de una reorganización cromosómica, la célula sufre mitosis para formar un saco embrionario. La iniciación de la meiosis no se observa en todas las especies clasificadas como diplospóricas (Richards, 2003).

La formación mitótica de un saco embrionario no reducido a partir de una célula en una posición distinta de la que ocupa una célula madre de la megaspóra se llama aposporia. Los sacos embrionarios diplospóricos y apospóricos pueden o no parecerse a los sacos embrionarios reducidos observados en plantas sexuales relacionadas. La embriogénesis se produce de forma autónoma en sacos embrionarios tanto diplospóricos como apospóricos y la formación del endospermo puede ser autónoma o puede, más comúnmente, requerir fertilización (referido como pseudogamia) (Koltunow y Grossniklaus, 2003; Raghavan, 2006).

Además de la diplosporia y aposporia también existe la embrionía adventicia y tipos mixtos de apomixis. Si la célula que inicia la apomixis se convierte directamente en un embrión, este proceso se denomina embrionía adventicia. Esto ocurre tarde en el desarrollo de óvulos a partir de células del integumento o la nucela. Normalmente, la supervivencia del embrión depende de

la fertilización exitosa del saco embrionario adyacente derivado meióticamente y de la capacidad del embrión adventicio para crecer lo suficiente hasta acceder a los nutrientes del endospermo. Más de un embrión se puede iniciar y los embriones cigóticos pueden o no sobrevivir. Si no ocurre la fertilización, el embrión adventicio crece mediante la obtención de los nutrientes que se degradan de las células nucelares y del integumento (Naumova, 1992; Raghavan, 2006).

Es importante mencionar que la diplosporia, aposporia y embrionía adventicia pueden y existen en especies apomícticas de *Beta* (Jassem, 1990) y en rosáceas (Nybom, 1988). En algunas gramíneas apospóricas, cítricos y ciertas especies de *Hieracium*, coexisten la aposporia y embrionía adventicia (Naumova, 1992).

#### **4.2.2 Embriogénesis somática *in vitro***

La embriogénesis somática *in vitro* se define como el proceso por el cual células somáticas haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas típicas embrionarias pero sin que exista fusión de gametos (Fehér, 2005; Ikeda *et al.*, 2006). Para que estas células formen un embrión somático o no cigótico capaz de regenerar una planta completa, tienen que atravesar una serie de cambios morfológicos y bioquímicos (Yang y Zhang, 2010). Así, durante este proceso una estructura bipolar (similar a un embrión cigótico) se desarrolla a partir de una célula no cigótica sin conexión vascular con el tejido original. El proceso de desarrollo de la embriogénesis somática inicia con la formación de masas celulares proembriogénicas, seguida de la formación del embrión somático, el crecimiento y maduración, disecación y regeneración de la planta (Von Arnold *et al.*, 2002; Jiménez, 2005).

En condiciones *in vitro*, la embriogénesis somática puede tomar dos rutas, directa e indirecta, refiriéndose a la presencia o ausencia de una fase de callo, respectivamente. La indirecta es la más usada, pero en la directa es posible que haya una continuidad en cuanto a la cantidad de desdiferenciación y proliferación celular necesaria antes de que se induzcan los embriones somáticos (Rose *et al.*, 2010).

#### **4.2.2.1 Factores que afectan la embriogénesis somática**

El desarrollo *in vitro* de células y tejidos depende de diferentes factores, tales como el genotipo, tipo de planta, edad y etapa de desarrollo del explante, estado fisiológico y fitosanitario de la planta donadora y las condiciones ambientales externas que incluyen la composición del medio de cultivo (fitohormonas) y las condiciones físicas del cultivo (luz, temperatura). Estos factores también aplican a la embriogénesis somática y la interacción de todos ellos conduce a la inducción y expresión de un modo específico de diferenciación celular y desarrollo (Gaj, 2004).

Los embriones somáticos están formados por células embriogénicas que surgen a partir de células somáticas de un explante, callos o células en suspensión. Sólo pocas células somáticas son sensibles a los estímulos de inducción y capaces de sufrir la embriogénesis somática. Estas células, que representan un estado intermedio entre somáticas y embriogénicas, se llaman competentes y son las que muestran sensibilidad a los estímulos físicos y químicos que activan el desarrollo embriogénico, mientras que las células embriogénicas ya están establecidas para la embriogénesis. También existen células embriogénicas que expresan la embriogénesis somática sin la estimulación de factores externos. Para el éxito de un sistema de embriogénesis somática es indispensable la adecuada elección del material vegetal/explantes que sean una fuente de células competentes y la determinación de factores físicos y químicos que activen su ruta de desarrollo embriogénico (Namasivayam, 2007).

**Genotipo.** Sin duda un grave problema para la biotecnología es que sólo algunos cultivares de una misma especie puedan regenerarse por embriogénesis somática. El potencial para la embriogénesis somática en primer lugar lo determina el genotipo. A pesar de que para muchas especies ya se han definido las condiciones óptimas para la inducción de la embriogénesis somática, aún quedan especies que muestran recalcitrancia para formar embriones somáticos. Existen genotipos altamente embriogénicos y recalcitrantes incluso dentro de una misma especie. Sin embargo, en muchos casos la recalcitrancia se ha podido resolver optimizando las condiciones de cultivo o seleccionando mejor el explante. Por lo tanto, los determinantes genéticos sólo pueden servir para definir las condiciones de cuándo y dónde se puede expresar la competencia embriogénica. Así, el potencial embriogénico se define en gran medida por el programa de desarrollo de la planta y por las señales ambientales (Fehér, 2005).

**Explante.** El tipo de explante y su etapa de desarrollo bien definida parecen ser los factores más importantes que determinan la capacidad embriogénica de los cultivos. Los esfuerzos por elegir el mejor explante se han centrado en la búsqueda de tejidos con células competentes capaces de inducir la embriogénesis somática en respuesta a la aplicación de estímulos externos. La embriogénesis somática puede inducirse a partir de varios tipos de explantes: plántulas y sus fragmentos, pecíolos, hojas, raíz, ápices de brotes, semillas, cotiledones y embriones cigóticos. Los embriones cigóticos inmaduros presentan la fuente más común de células embriogénicas y han permitido la inducción de la embriogénesis somática en especies que se habían considerado como recalcitrantes, entre ellas las coníferas y dicotiledóneas, incluyendo muchas especies de *Arabidopsis* (Gaj, 2004).

El nivel endógeno de fitohormonas se considera uno de los factores cruciales que influyen en el potencial embriogénico de los explantes (Gaj, 2001). Al parecer, los explantes y cultivos que responden a la transición embriogénica sufren la acumulación de auxinas endógenas (AIA). Por lo tanto, se sugiere que la síntesis de auxina inducida por las condiciones embriogénicas es una señal crucial que determina el destino embriogénico de una célula en cultivo (Thomas *et al.*, 2002). Tal aumento en la síntesis de AIA *in vitro* también puede observarse en cultivos no embriogénicos pero el momento de síntesis y activación de las células es diferente (Pasternak *et al.*, 2002).

**Fitohormonas.** Las fitohormonas son de los diferentes estímulos externos más considerados ya que inducen una ruta morfogénica de desarrollo. Las auxinas y citocininas usadas en el medio de cultivo, son las más frecuentes debido a que participan activamente en el ciclo celular y desencadenan las divisiones celulares (Francis y Sorrell, 2001). La concentración de fitohormonas es importante para la respuesta óptima porque las dosis demasiado bajas no pueden desencadenar la inducción y las muy altas pueden ser tóxicas, sobre todo cuando se usan fenoxi-auxinas (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético). La composición y concentración relativa de fitohormonas determinan tanto la habilidad del explante para responder, así como el modo de reacción morfogénico. Sólo en pocos sistemas de regeneración no se requiere del uso de fitohormonas para inducir la embriogénesis somática. En una gran cantidad de protocolos, la embriogénesis somática se indujo en presencia de auxinas solas o en combinación con citocininas. Entre las auxinas, el 2, 4-D fue la más usada y en muchos protocolos se aplica sola o en combinación con otras fitohormonas (Jiménez y Thomas, 2005).

La sensibilidad específica de tejidos y células a señales hormonales exógenas puede determinar su potencial embriogénico. Una de las estrategias recientes para el estudio de la determinación hormonal de las respuestas morfogénicas *in vitro* es el empleo de inhibidores del transporte polar de auxinas. Su aplicación en los medios de inducción cambia la vía morfogénica de embriogénica a organogénica porque inhibe la formación de embriones somáticos o da lugar a una amplia gama de alteraciones morfogénicas en el patrón de simetría bilateral de los embriones en desarrollo y la formación de embriones somáticos anormales (Deo *et al.*, 2010).

**Fuente de azúcar y potencial osmótico.** Los azúcares se incluyen en todos los medios de cultivo de tejidos como una fuente esencial de energía y crea las condiciones apropiadas de potencial osmótico para el crecimiento celular *in vitro*. El tipo y concentración de azúcar usado en el medio de cultivo influye en la embriogénesis somática. La sacarosa ha sido la más ampliamente usada para inducir la embriogénesis somática y rara vez se usan otras fuentes de azúcar como maltosa, fructosa o glucosa. Los efectos del azúcar y las condiciones osmóticas influyen sobre la morfogénesis *in vitro* y la expresión génica (Gaj, 2004).

**Concentración de oxígeno disuelto (OD).** La concentración de OD en la embriogénesis somática afecta básicamente dos aspectos: la biomasa de células indiferenciadas y el desarrollo o diferenciación de embriones somáticos. En este último aspecto, la concentración de OD se ha reportado que en callos embriogénicos de zanahoria menos de 16% no fue tan perjudicial para la producción de embriones somáticos, pero comparado con el 100% de OD, la diferenciación de embriones somáticos cayó de 75 a 10 % (Hoshino y Cuello, 2005).

Feria *et al.* (2003) reportaron que el número total de embriones somáticos inducidos a partir de células embriogénicas de café fue mayor con 80 % de OD (71,072 embriones somáticos L<sup>-1</sup>) que con 50 % (36,941 embriones somáticos L<sup>-1</sup>). Mientras que en células embriogénicas de zanahoria el número total de embriones somáticos que se diferenciaron no se afectó con concentraciones de 4-40 % de OD. En cambio, el desarrollo de embriones somáticos en la etapa de torpedo o corazón se mejoró con 20-40 % de OD, mientras que se inhibió completamente con menos de 7%. Además, encontraron que el incremento de OD de 4 a 7% aumentó el consumo de azúcar por los embriones somáticos (Hoshino y Cuello, 2005).

**Densidad celular.** Los efectos predominantes de la densidad celular en la embriogénesis somática parecen ser indirectos. El ajuste de la densidad celular influye en la embriogénesis somática a través de: (1) Cambio en las concentraciones de los factores condicionantes que las células vegetales y embriones liberan al medio de cultivo, (2) Cambio en la cantidad de nutrientes o gas que las células individuales o embriones pueden consumir y (3) Estrés físico causado por el aumento del contacto físico entre las células y embriones cuando se incrementa la densidad celular. En los estudios de los efectos de la densidad celular en la embriogénesis somática se estableció que el cambio en las concentraciones de los factores condicionantes liberadas al medio de cultivo por las células y embriones fue el aspecto más significativo en la manipulación de la densidad celular (Hoshino y Cuello, 2005).

**Calidad e intensidad de luz.** La luz es una de las señales ambientales más importantes y sus numerosos efectos sobre el desarrollo vegetal son ampliamente conocidos. Aunque en cada protocolo de inducción de embriogénesis somática se describen los requerimientos de luz, aún faltan más estudios sistemáticos que permitan dilucidar sus efectos sobre la respuesta *in vitro* de los explantes. La intensidad, el espectro y duración de la luz suministrada para los cultivos *in vitro* pueden influir en la respuesta morfogénica y su eficiencia (Gaj, 2004).

La luz afecta el crecimiento de embriones somáticos y las características morfológicas. Sin embargo, de los factores ambientales críticos que influyen en la embriogénesis somática, es de los menos estudiados. En la literatura al respecto existen tres inconvenientes que dificultan el análisis de los efectos específicos de la luz sobre la embriogénesis somática: (1) las diferentes definiciones de calidad de luz, (2) los problemáticos ruidos espectrales generados por los sistemas experimentales convencionales de luminosidad que se basan en tubos fluorescentes y filtros de luz y (3) las diferentes intensidades de luz aplicadas a la embriogénesis somática que dificulta la separación de los efectos morfológicos de los fotosintéticos (Hoshino y Cuello, 2005).

**pH.** El pH del medio de cultivo debe ser tal que no afecte al tejido vegetal. Dentro de los límites aceptables el pH determina si las sales permanecen en forma soluble; influye en la absorción de los ingredientes y fitohormonas del medio; tiene efecto sobre las reacciones químicas (especialmente aquellas catalizadas por enzimas) y afecta la eficiencia de gelificación del agar (Thorpe *et al.*, 2008). En la embriogénesis somática se ha sugerido que el efecto del pH sobre la

iniciación del embrión somático puede estar relacionado con la absorción de auxinas en los explantes cultivados y que valores de pH de 7.0 pueden facilitar la absorción más lenta y gradual del 2,4-D en niveles relativamente altos (Santarem *et al.*, 1997). Sin embargo, no en todas las especies el pH tiene un efecto determinante en la embriogénesis somática. En estudios realizados con genotipos de soya, Hofmann *et al.* (2004) no encontraron diferencias significativas sobre la inducción de la embriogénesis somática cuando el pH del medio de cultivo fue de 5.7 y 7.0 en ningún genotipo.

#### **4.2.2.2 Bases fisiológicas de la embriogénesis somática**

En todas las formas de embriogénesis vegetal se deben cumplir ciertos criterios antes de la iniciación (Figura 2). La especie o genotipo debe tener el potencial genético para formar embriones a partir de células somáticas y una o pocas células de la planta/explante tienen que ser competentes para recibir una señal (endógena o exógena) que modifique el destino celular, active la vía del desarrollo embriogénico (compromiso) y conduzca a la formación del embrión, incluso en ausencia de señales adicionales. En la embriogénesis somática *in vitro* estas condiciones (potencial, competencia, inducción, compromiso) tienen que optimizarse experimentalmente. Las condiciones óptimas se establecen sin saber por qué un explante/genotipo determinado tienen potencial embriogénico y cómo y porqué se logra la competencia o el compromiso, o cual es el verdadero disparador del inicio del desarrollo del embrión (Fehér, 2005).

**Potencial embriogénico.** De forma general, el proceso de la embriogénesis somática se puede dividir en dos fases: inducción y expresión. En la inducción, las células somáticas diferenciadas adquieren la competencia embriogénica y proliferan como células embriogénicas. En la fase de expresión, las células embriogénicas muestran su competencia embriogénica y se diferencian para formar embriones somáticos. Las dos fases se sugirieron por ser independientes entre sí e influenciadas por factores diferentes (Jiménez, 2001).

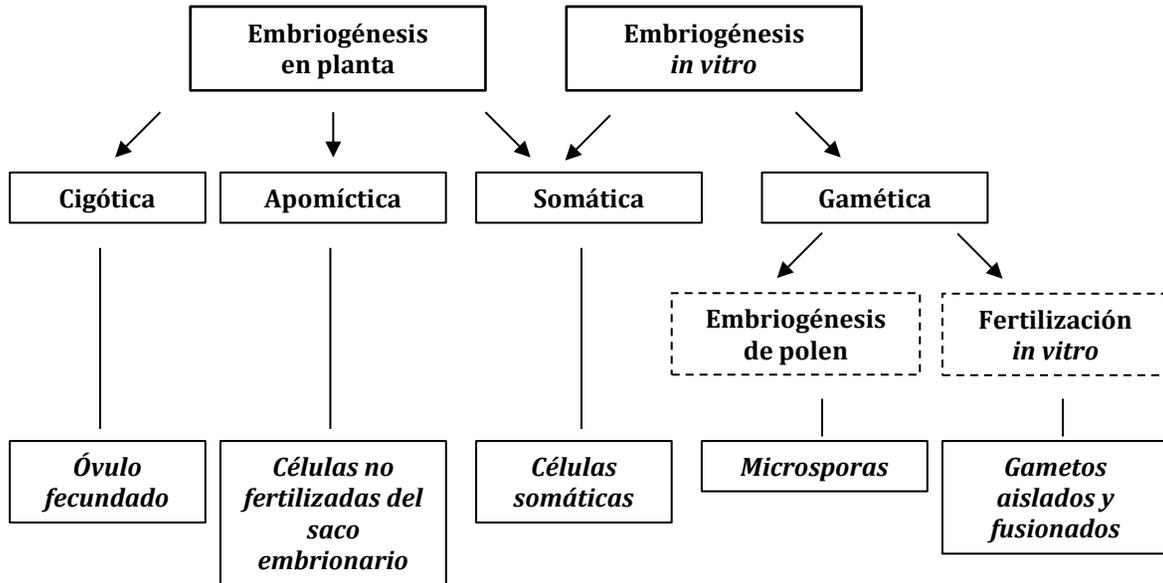


Figura 2. Rutas que conducen al desarrollo del embrión en plantas superiores (Fehér, 2005).

En genotipos altamente embriogénicos de zanahoria o alfalfa los embriones somáticos se pueden desarrollar en cualquier órgano de la plántula, lo que indica una amplia expresión del potencial embriogénico. Sin embargo, en la mayoría de especies la competencia embriogénica se limita a ciertos tejidos. Se ha sugerido que existe un tipo de gradiente en la respuesta embriogénica entre los diversos órganos de la planta. Este potencial es mayor en tejidos de origen embrionario y disminuye hacia el hipocotilo, pecíolo, hojas y raíces. Obviamente, la capacidad embriogénica de las células disminuye continuamente durante la ontogenia de la planta y es dependiente de la especie (Von Arnold *et al.*, 2002; Fehér, 2005).

**Competencia celular.** La competencia embriogénica finalmente se expresa a nivel de célula, pero no es tan sencillo definir dicha competencia. La definición ampliamente aceptada establece que las células competentes embriogénicamente son aquellas capaces de diferenciarse en embriones si reciben inductores de diferenciación. Sin embargo, la competencia embriogénica por sí misma necesita ser inducida en muchos casos (embriogénesis somática indirecta) y las señales que inducen esta competencia y que disparan el desarrollo embriogénico no son fáciles de separar. La competencia celular está asociada con la desdiferenciación de células somáticas que les permite responder a las nuevas señales del desarrollo (Fehér, 2008; Yang y Zhang, 2010).

En un cultivo de callo embriogénico las células con competencia embriogénica pueden reconocerse morfológicamente como pequeñas, redondeadas, con citoplasma denso y vacuolas pequeñas. Son muy similares a las células meristemáticas o cigotos y dicha similitud se enfatiza más por su división asimétrica. También se pueden caracterizar por la posición central del núcleo, prominentes microtúbulos en radiación perinuclear y los filamentos de actina (Samaj *et al.*, 2003).

En un modelo hipotético de los eventos que suceden en la embriogénesis somática se destaca que una multitud de señales paralelas, incluyendo auxinas, inician una amplia respuesta celular que incluyen reorganizaciones en los niveles de estructura, fisiología, cromatina y expresión génica (Figura 3). Como resultado, las células dediferenciadas llegan a ser competentes para la embriogénesis somática. Las células competentes serán embriogénicas si las condiciones celulares y externas permiten la expresión del programa embriogénico que, en la mayoría de los casos, es precedido de divisiones celulares. También la polaridad y formación del patrón provocan el desarrollo del embrión. El papel central de la remodelación de la cromatina se puede hipotetizar en todas las fases de dediferenciación, reprogramación embriogénica y diferenciación del embrión, las cuales se asocian con la activación/desactivación paralela de una gran cantidad de genes (Fehér, 2005).

Estos tipos de células se pueden originar a partir de tejidos embriogénicos/meristemáticos o se pueden formar a partir de células alargadas y vacuoladas bajo condiciones específicas, por ejemplo, después de un tratamiento con 2,4-D. Sin embargo, otras hormonas (ABA, citocininas) o tratamientos de estrés pueden inducir la formación de células con competencia embriogénica (Fehér, 2005).

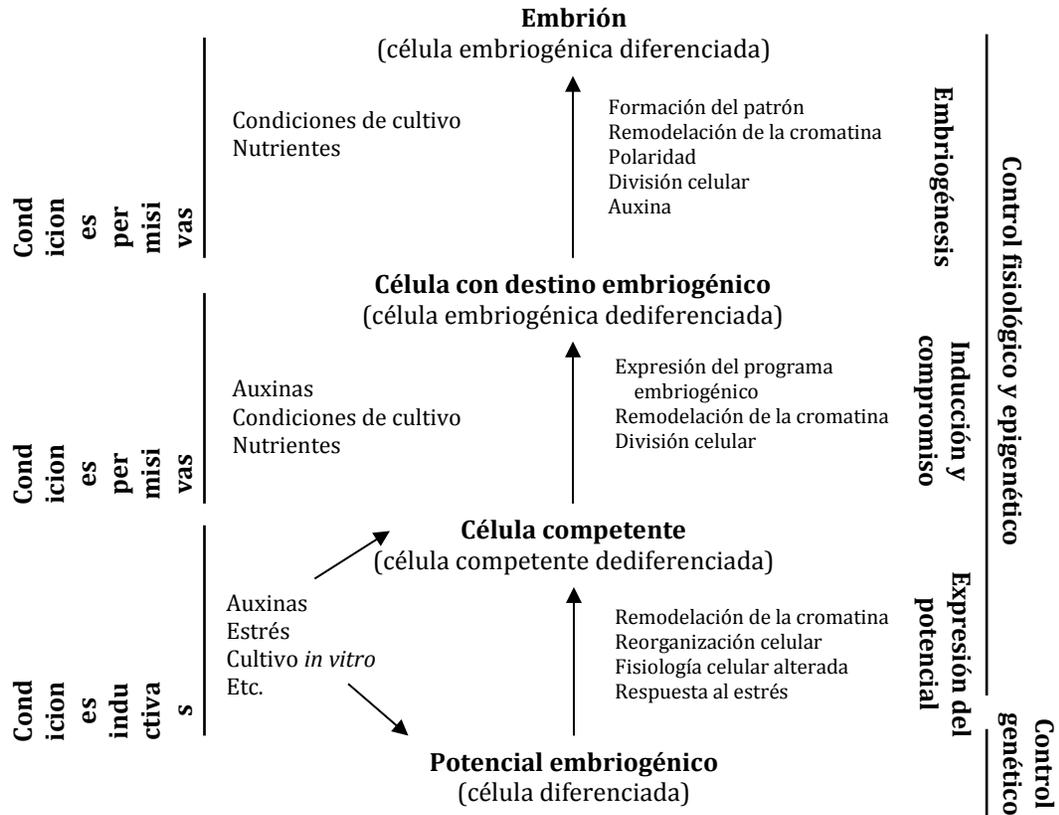


Figura 3. Modelo hipotético de eventos que suceden en la embriogénesis somática (Fehér, 2005).

#### 4.2.3 Aplicaciones de la embriogénesis somática *in vitro*

La embriogénesis somática es una herramienta muy valiosa para una amplia gama de objetivos, desde estudios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos hasta el desarrollo de tecnologías con alto grado de aplicación práctica (Jiménez, 2001). En primer lugar, constituye una importante herramienta para el estudio del desarrollo vegetal, por la comodidad única del cultivo *in vitro* y los contrastes que se pueden extraer de las diferencias entre la embriogénesis somática y la cigótica. En segundo lugar, los cultivos embriogénicos son un vehículo eficaz para la ingeniería genética, ya que a menudo producen muchos embriones por volumen de masa celular y los genes aislados integrados en una sola célula embriogénica pueden incorporarse al genoma de la planta que finalmente se desarrolla. En tercero, se pueden producir muchos embriones no cigóticos a partir de una sola planta deseable para la propagación clonal (Gray, 2005).

#### **4.2.3.1 Investigación del inicio de la embriogénesis cigótica**

Uno de los principales usos de la embriogénesis somática constituye su empleo como un método para investigar los eventos iniciales de la embriogénesis cigótica. Tal vez la principal razón para el escaso avance en la comprensión de los eventos de desarrollo del embrión es que los embriones cigóticos de las plantas superiores constan de varias células pequeñas que crecen dentro de los tejidos maternos de las flores y frutos inmaduros, y es muy difícil reunir suficientes embriones para realizar análisis bioquímicos, fisiológicos y morfológicos de los eventos biológicos que ocurren en su temprano desarrollo. Los embriones somáticos proporcionan un buen sistema para evitar este tipo de problemas y el conocimiento de muchos de los eventos que ocurren durante la embriogénesis temprana ha sido resultado de los experimentos en ES (Jiménez, 2001).

#### **4.2.3.2 Propagación masiva**

La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas: enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz que se pueden almacenar y encapsular perfectamente para su conservación (Krikorian y Simola, 1999; Von Arnold *et al.*, 2002). La propagación masiva de plantas a través de la multiplicación de propágulos embriogénicos es la aplicación más atractiva comercialmente de la embriogénesis somática, ya que tiene muchas ventajas sobre la organogénesis: (a) permite el cultivo de un gran número de unidades reproductivas con la presencia tanto de raíces y meristemas de brote en el mismo medio; (b) el modo de cultivo es fácil de escalar con poco trabajo a partir de embriones que se pueden cultivar individual y libremente flotando en medio líquido, (c) a diferencia de los brotes, los embriones somáticos con frecuencia se originan a partir de células individuales y los cultivos embriogénicos se pueden sincronizar y purificar de manera que se pueden establecer cultivos de material homogéneo y (d) las plantas derivadas de ES son menos variables que las derivadas de organogénesis porque los embriones somáticos son intolerantes a mutaciones en cualquiera de los numerosos genes que deben ser necesarios para la finalización con éxito de la ontogenia (Jiménez, 2001).

#### **4.2.3.3 Transformación genética**

La transferencia de genes en las células vegetales embriogénicas ya está disputando al fitomejoramiento convencional y se ha convertido en una herramienta indispensable para el mejoramiento de los cultivos. Uno de los requisitos más importantes para la manipulación genética de plantas *in vitro* es la capacidad de cultivar células somáticas en medio de cultivo estéril y regenerar plantas viables a partir de estos cultivos. Por lo tanto, la embriogénesis somática es una vía más eficiente para los estudios que implican la producción de plantas genéticamente transformadas (Jiménez, 2001).

#### **4.2.3.4 Semilla sintética**

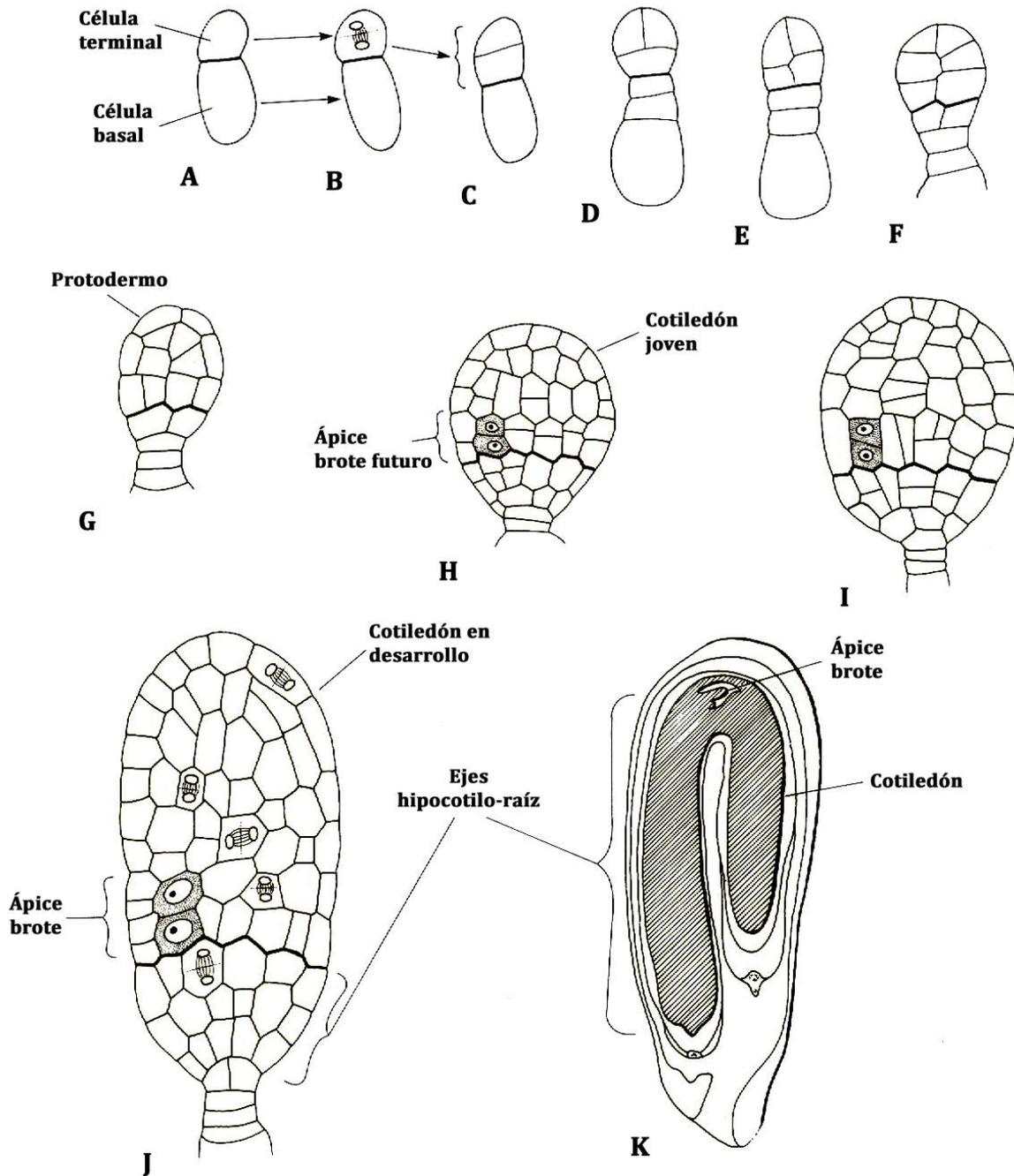
Una de las áreas de la investigación activa se ha enfocado últimamente al desarrollo de la embriogénesis somática como un método de propagación vegetal comercialmente útil: Semilla sintética o artificial. Una semilla sintética se define como un embrión somático que está diseñado para usarse de forma práctica en la producción comercial de plantas. Las aplicaciones de semilla sintética varían en función de la relativa sofisticación de los sistemas de producción existentes para un determinado cultivo y las oportunidades de mejoramiento. Para cultivos agronómicos propagados por semillas serán necesarios los embriones somáticos quiescentes producidos en biorreactores y encapsulados en semillas sintéticas. Ciertos cultivos que son caros de producir por semillas, como la sandía sin semilla, son candidatos para la tecnología de semillas sintéticas, ya que el costo por planta se puede reducir. Los beneficios potenciales del uso de semillas "clonales" en la producción agrícola es un estímulo muy grande para continuar la investigación de los factores que regulan la maduración de embriones somáticos (Gray, 2005).

Otras aplicaciones de la embriogénesis somática es la obtención de plantas con diferentes niveles de ploidía, fuente de protoplastos, producción de metabolitos secundarios, selección *in vitro*, variación somaclonal, marcadores moleculares y el mejoramiento genético (Jiménez, 2001).

#### 4.2.4 Embriogénesis cigótica y somática en monocotiledóneas

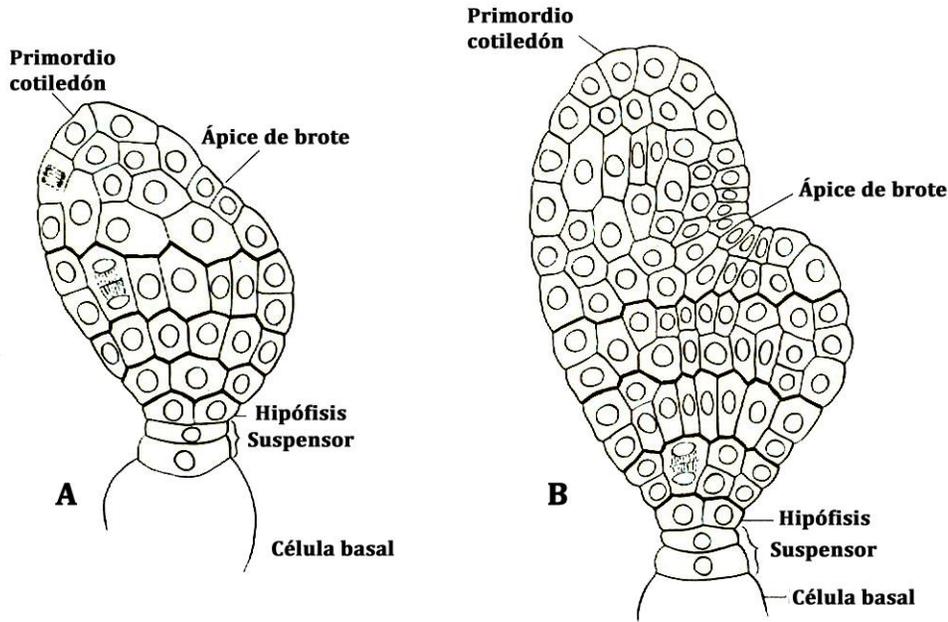
Las diferencias entre la organografía de los embriones maduros de mono y dicotiledóneas son notables y han sido usadas para separar estos dos taxos en las angiospermas. Con muy pocas excepciones (tres cotiledones o un cotiledón) el típico embrión de las dicotiledóneas desarrolla un par de cotiledones laterales entre las bases donde se sitúa el ápice del brote terminal. En contraste, el embrión de las monocotiledóneas produce típicamente un solo cotiledón y el ápice de brote aparece en posición lateral en un embrión bien desarrollado (Raghavan, 1986).

Por mucho tiempo la embriogénesis en *Sagittaria sagittifolia* ha sido considerada como la típica en monocotiledóneas. El único cotiledón y el futuro ápice de brote comparten origen común de las derivadas de la célula terminal. El cigoto se divide transversalmente en la formación de una célula terminal y una célula basal (Figura 4A). Esta división separa los futuros linajes de células que conducen a la formación del cotiledón y ápice de brote a partir de aquellas que producen los ejes del hipocotilo-raíz. El cotiledón crece rápidamente y cubre el futuro ápice de brote, células que inicialmente no se dividen muy a menudo (Figura 4H-J). El procambium se forma inicialmente en la región del hipocotilo y las iniciales futuras de raíz llegan a ser evidentes en el extremo más bajo del hipocotilo (Gifford y Foster, 1989; Kaplan y Cooke, 1997).



**Figura 4.** Embríogenesis en *Sagittaria sagittaeifolia*. (A-J) Células derivadas de célula terminal y basal separadas por línea oscura. (K) Embrión maduro en semilla. El ápice de brote y cotiledón se forman a partir de las derivadas de la célula terminal original. Fuente: Gifford y Foster, 1989.

En *Ottelia alismoide* se confirmó que el ápice de brote es de origen terminal, como en las dicotiledóneas, y su subsecuente desplazamiento a un costado es resultado del crecimiento tempranamente agresivo del cotiledón (Figura 5A-B).



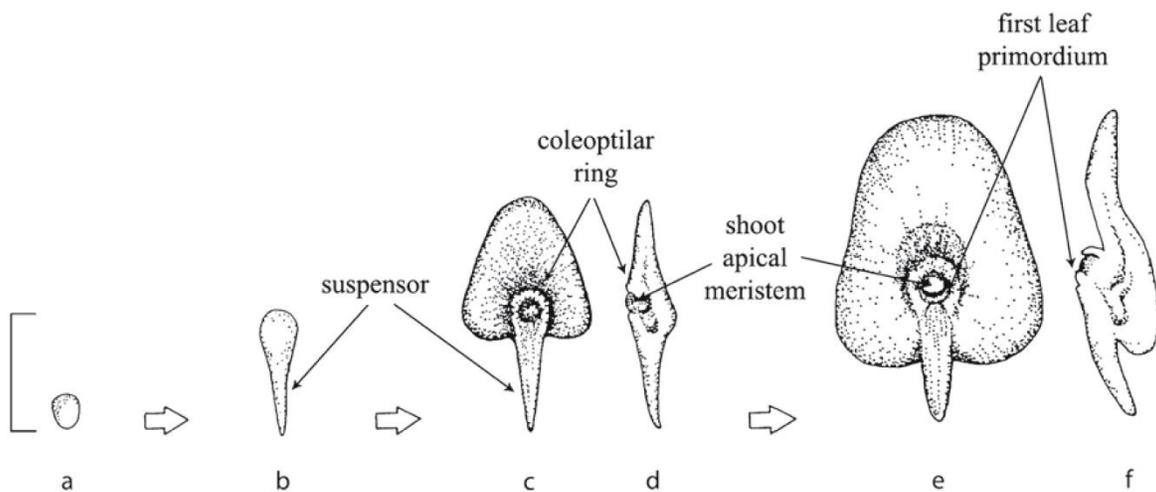
**Figura 5. Embriones jóvenes de *Ottelia alismoides*. (A) Origen común del primordio de cotiledón y ápice de brote desde una región terminal del pro-embrión (marcada por la línea negra superior). (B) Última etapa que muestra el desplazamiento lateral del ápice del brote producto del crecimiento del cotiledón. Fuente: Gifford y Foster, 1989.**

De manera general, el desarrollo de la embriogénesis en mono y dicotiledóneas es muy similar hasta la etapa globular. En dicotiledóneas las células axiales medianas constituyen el futuro ápice de brote y son más o menos iniciales quiescentes en contraste al rápido crecimiento de los dos cotiledones laterales. En monocotiledóneas la mitad o menos de las derivadas de la célula terminal retardan su crecimiento, pero funcionarán eventualmente como el ápice de brote, mientras las células restantes muestran una tasa rápida de división celular y crecimiento en la formación del único cotiledón (Gifford y Foster, 1989).

El desarrollo de embriones somáticos se asemeja mucho a la de los embriones cigóticos tanto morfológicamente y temporalmente (Zimmerman, 1993). Una vez que se completa la inducción de un estado embriogénico, los mecanismos de formación del patrón que conduce al embrión cigótico son comunes a todas las demás formas de la embriogénesis (Mordhorst *et al.*, 1997). Por lo tanto, los embriones somáticos y cigóticos comparten ontogenias similares, por lo general ambas pasan por las etapas globular, forma de corazón y forma de torpedo en dicotiledóneas, o etapas globular, escutelar (transición), y coleoptilar en monocotiledóneas (Gray *et al.*, 1995). Schiavone y Cooke (1985) describieron una etapa de crecimiento intermedio

entre embriones globulares y en forma de corazón que denominaron embrión oblongo. Aunque los embriones en forma de corazón y en forma de torpedo se han definido tradicionalmente como etapas separadas del desarrollo embrionario, la distinción entre ambas se basa aparentemente en la diferencia de tamaño. Estas diferencias basadas en la forma tienen su origen en el desarrollo particular de cada uno de los dos grupos principales de plantas con flores. Los embriones de monocotiledóneas inician como un solo cotiledón y en consecuencia no proceden a través de una etapa de en forma de corazón (Kaplan y Cooke, 1997).

Debido a la presencia de un simple cotiledón, los embriones de las monocotiledóneas presentan una imagen sorprendentemente diferente de las dicotiledóneas. Existe un consenso general en que el desarrollo del embrión hasta el estadio de octante es casi idéntico en mono y dicotiledóneas, y que en la formación tanto del ápice de brote como del cotiledón comparten un origen común en la célula terminal de un embrión de tres células (Raghavan y Sharma, 1995). Un ejemplo representativo que muestra las etapas de desarrollo del embrión en monocotiledóneas lo constituye el maíz (Raghavan, 2006) (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de la embriogénesis temprana en maíz. (a) Vista frontal del proembrión. (b) Vista frontal de la transición del embrión. (c) Vista frontal del embrión en etapa coleoptilar. (d) Sección esquemática del embrión en estado coleoptilar. (e) Vista frontal del embrión con el primer primordio de hoja empezando a crecer hacia arriba desde el lado inferior del meristemo apical de brote. (f) Sección esquemática del tipo de embrión en (e) que indica la transición de un estado a otro. Fuente: Raghavan, 2006.

### 4.3 Aclimatación de plántulas

La aclimatación de las plántulas producidas *in vitro* a condiciones de invernadero o campo es esencial, porque hay una diferencia abismal entre ambos entornos. Los procedimientos de aclimatación eficientes proporcionan a las plantas las condiciones óptimas para obtener una elevada tasa de supervivencia, crecimiento y su exitoso establecimiento en condiciones de campo. Por las características fisiológicas y anatómicas de las plántulas propagadas *in vitro* necesitan aclimatarse gradualmente al nuevo ambiente en el que van a crecer después de salir del laboratorio y los frascos donde fueron micropropagadas. Las estrategias que resultan satisfactorias se enfocan a la reducción paulatina de humedad relativa, el incremento controlado de un mayor nivel de luz, la activación de las plantas regeneradas *in vitro* para cambiar su crecimiento mixotrófico a autotrófico y ambiente aséptico (Hazarika, 2006).

Debido a que regularmente las plántulas *in vitro* pueden presentar desórdenes morfológicos, anatómicos y fisiológicos la mayoría de las veces éstos se traducen en pérdidas sustanciales que podrían alcanzar, en el peor de los casos, hasta el 100% de las plantas regeneradas cuando son trasplantadas y atraviesan por el periodo de la aclimatación. Por lo general, las hojas de estas plántulas desarrollan poco mesófilo con grandes espacios intercelulares y bajo número de estomas funcionales. El control del microambiente puede reducir trastornos morfológicos y fisiológicos creados por los inadecuados niveles de gases, y por ende facilita el proceso de aclimatación y reducción de los costos del cultivo *in vitro*. El cierre de los frascos que garantice la ventilación reducirá la acumulación de etileno. Las plántulas cultivadas en condiciones *in vitro* convencionales, particularmente con alta humedad relativa, tienen pobre desarrollo de cutícula y mal funcionamiento estomático que se traducen en pérdida excesiva de agua, escasa capacidad fotosintética y anomalías anatómicas. La presencia de azúcares en el medio y la acumulación de etileno en recipientes sellados pueden provocar el desarrollo anormal de estomas, que posteriormente reducirá la tasa de supervivencia de las plantas al transferirlas a condiciones *ex vitro* (Mohamed y Alsadon, 2009).

Los métodos por los cuales se transfieren las plántulas de condiciones *in vitro* al ambiente externo *ex vitro* son sumamente importantes. Si no se lleva a cabo con cuidado, la transferencia puede resultar en pérdidas significativas del material propagado, básicamente por dos razones (George y Debergh, 2008):

- a) Los brotes desarrollados en condiciones *in vitro* normalmente se producen en alta humedad relativa y baja intensidad luminosa. Esto da como resultado que haya menos cera epicuticular de las hojas o la cera tiene una composición química alterada y diferente de la que desarrollan las plantas cultivadas en cámaras de crecimiento o invernaderos. En algunas plantas los estomas de las hojas producidas *in vitro* también pueden ser atípicos e incapaces del cierre completo bajo condiciones de baja humedad relativa. Las plantas micropropagadas por lo tanto, pierden agua rápidamente cuando se trasladan a las condiciones externas.
  
- b) Cuando se suministra sacarosa (o algún otro carbohidrato) y se mantienen en condiciones de poca luz, las plántulas micropropagadas no son totalmente dependientes de su propia fotosíntesis (son mixotróficas). Se necesitará de un estímulo no previsto en el ambiente cerrado *in vitro* para que sean plenamente capaces de producir sus propios requerimientos de carbono y nitrógeno reducido (es decir, antes de que sean capaces de alimentarse por sí mismas - autotrófico).

Los cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que aseguran el funcionamiento normal de las plantas micropropagadas únicamente se presentan después de que las plantas han pasado un período de varios días *ex vitro*. En la práctica, las plántulas se retiran de los frascos y el agar se lava de las raíces cuidadosamente. En esta etapa se recomienda la aplicación de una película antitranspirante en las hojas, pero en la práctica, se utiliza poco. Las plántulas son luego trasplantadas en un sustrato de enraizamiento adecuado (tal como una composta de turba:arena) y se mantiene durante varios días en alta humedad y la intensidad de luz reducida. Una niebla de vapor de agua es muy eficaz para mantener la humedad. Por otra parte, la nebulización intermitente de agua se puede aplicar de forma automática, o manualmente cuando las plantas se colocan en cajas de plástico transparente. Para algunas especies de plantas esta fase se puede omitir y los brotes pasan directamente a alta humedad y al mismo tiempo se adaptan gradualmente al medio ambiente exterior (George y Debergh, 2008).

## 5. Literatura citada

- Berry, F., and W. J. Kress. 1991. *Heliconia: An identification guide*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 335 pp.
- Bicknell, R. A. and Koltunowb, A. M. 2004. Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell* 16: S228–S245.
- Colfloras. 2007. Manual técnico para el cultivo de heliconias. Asociación de Floricultores del Centro Occidente Colombiano. Pereira, Colombia. 37 p.
- Deo, P. C., Tyagi, A. P., Taylor, M., Harding, R. and Becker, D. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28, 27-40.
- Fehér, A. 2005. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? *In: A. Mujib & J. Samaj. (eds). Somatic embryogenesis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 85-101.
- Fehér, A. 2008. The initiation of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis* 52: 53-56.
- Francis, D., and D. A. Sorrell, 2001. The interference between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regul.* 33: 1–12.
- Gaj, M. D. 2001. Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64: 39–46.
- Gaj, M. D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul.* 43: 27–47.
- Garcés, H.M.P., C.E.M. Champagne, B. T. Townsley, S. Park, R. Malhó, M. C. Pedroso, J. J. Harada, and N. R. Sinha. 2007. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *Proc Natl Acad Sci* 104:15578–15583.
- George, E. F. and P. C. Debergh. 2008. Micropropagation: Uses and methods. *In: Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (Eds.). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. Springer, The Netherlands. Pp 29-62.
- Gifford, E. M. and Foster, A. S. 1989. *Morphology and evolution of vascular plants*. W. H. Freeman and Company. New York. 626 p.
- Goh, C. J., M. J. Nathan, and P P. Kumar. 1995. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. *Scientia Horticulturae* 62: 113-120.
- Gray, D. J. 2005. Propagation from nonmeristematic tissues: Nonzygotic embryogenesis. *In: Robert N. Trigiano and D. Dennis J. Gray (eds). Plant development and biotechnology*. CRC PRESS LLC. pp: 187-200.

- Gray, D. J., Compton, M. E., Harrell, R. C. and Cantliffe, D. J. 1995. Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. *In*: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin, Springer-Verlag v. 30, pp. 126-151.
- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108: 105–120.
- Hernández, M. E. 2008. Regeneración *in vitro* de *Heliconia* spp vía organogénesis directa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 96 p.
- Hofmann, N., R. L. Nelson, and S. S. Korban. 2004. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 77: 157–163.
- Hoshino, T., and J. L. Cuello. 2005. Environmental design considerations for somatic embryogenesis *In*: A. Mujib, J. Samaj (eds). *Plant Cell Monogr. Somatic embryogenesis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 25-34.
- Ikeda, M., M. Umehara, and H. Kamada. 2006. Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* 23: 153–161.
- Jassem, B. 1990. Apomixis in the genus *Beta*. *Apomixis Newsl.* 2: 7–23.
- Jiménez, V. M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13: 196-223.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47: 91–110.
- Jiménez, V. M., and C. Thomas. 2005. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. *In*: *Plant Cell Monogr.* (Ed.) A. Mujib, J. Samaj: Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 103-118.
- Kaplan, D. R. and Cooke, T. J. 1997. Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. *The Plant Cell*, 9:1903-1919.
- Koltunow, A. M., and U. Grossniklaus. 2003. Apomixis: A developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 547–574.
- Koltunow, A. M., Bicknell, R. A. and Chaudhury, A. M. 1995. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiol.* 108: 1345-1 352.
- Kress, W. J., J. Betancur, and B. Echeverry. 1999. *Heliconias: Llamaradas de la selva Colombiana*. Cristina Uribe Editores, Bogotá, Colombia. 191 p.
- Krikorian, A., and K. Simola. 1999. Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1983-1973). *Physiol. Plant.* 105: 348-355.
- Marulanda-Ángel, M. L., L. Isaza-Valencia, and L. Londoño-Giraldo. 2011. *In vitro* propagation of *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón from flowering buds. *Acta Agronómica* 60: 132-139.

- Mohamed, M. A., and A. A. Alsadon. 2010. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Sci. Hortic.* 123: 295-300.
- Mordhorst, A. P., Toonen, M. A. J. and De Vries, S. C. 1997. Plant embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16:535-576.
- Murguía, G. J., E. Lee H. y T. Landero, I. 2007. La horticultura ornamental en el estado de Veracruz, México. *Actas de Horticultura* 48: 485-488.
- Namasivayam, P. 2007. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 1-8.
- Nathan, M. J., C. Goh, and P. P. Kumar. 1992. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. *HortScience* 27: 450-452.
- Nathan, M. J., P. P. Kumar, and C. Goh. 1993/1992?. High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum* L.f. *Plant Science* 90: 63-71.
- Naumova, T. 1992. Apomixis in angiosperms: Nucellar and integumentary embryony. Boca Raton, FL: CRC. 160 p.
- Nogler, G. A. 1984. Gametophytic apomixis. *In*: B.M. Johri (ed). *Embryology of angiosperms*. Springer, Berlin, Germany. pp. 475-518.
- Nybom, H. 1988. Apomixis versus sexuality in blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). *Plant Syst. Evol.* 160: 207-18.
- Pasternak T.P., E. Prinsen, F. Ayaydin, P. Miskolczi, G. Potters, H. Asard, H. A. Van Onckelen, D. Dudits, and A. Feher. 2002. The role of auxins, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* 129: 1807-1819.
- Raghavan, V. 1986. *Embryogenesis in angiosperms: A developmental and experimental study*. Cambridge University Press. U.S.A. 303 p.
- Raghavan, V. 2006. *Double fertilization: Embryo and endosperm development in flowering plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 237 p.
- Raghavan, V. and Sharma, K. K. 1995. Zygotic embryogenesis in gymnosperms and angiosperms. *In*: Thorpe, T. A., (ed). *In Vitro Embryogenesis*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. pp. 73-115.
- Richards, A. J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358: 1085-1093.
- Rose, R.J., F.R. Mantiri, S. Kurdyukov, S.K. Chen, X-D. Wang, K.E. Nolan and M.B. Sheahan. 2010. Developmental biology of somatic embryogenesis. *In*: E.C. Pua and M.R. Davey (eds). *Plant developmental biology – Biotechnological Perspectives: Vol. 2*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. pp: 3-26.

- Samaj, J., F. Baluska, A. Pretová, and D. Volkmann. 2003. Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeletal arrays. *Plant Cell Rep* 21:940-945.
- Santarem, E.R., B. Pelissier, and J. J. Finer. 1997. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33: 13-19.
- Schiavone, F. M. and Cooke, T. J. 1985. A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 63: 1573-1578.
- SIAP. 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx/> (consultado el 28 de febrero de 2013).
- Simão D. G. and V. L. Scatena. 2003. Morphological aspects of the propagation in *Heliconia velloziana* L. Emygd. (Zingiberales: Heliconiaceae). *Brazilian archives of Biology and Technology*. 46: 65-72.
- Thomas C., R. Bronner, J. Molinier, E. Prinsen, H. Van Onckelen, and G. Hahne. 2002. Immunocytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflowers embryos. *Planta* 215: 577-583.
- Thorpe, T., C. Stasolla, E. C. Yeung, G. J. Klerk, A. Roberts, and E. F. George. 2008. The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. *In*: Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (eds). *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition Volume 1. The background*. Springer, The Netherlands. pp: 115-173.
- Von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, and L. Filanova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 233-249.
- Yang, X., and Zhang, X. 2010. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *CriticalReviews in PlantSciences*, 29: 36-57.
- Zimmerman, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423.

## CAPÍTULO I

### EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Heliconia* spp Y ANÁLISIS HISTOLÓGICO

# CAPÍTULO I. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Heliconia* spp Y ANÁLISIS HISTOLÓGICO

## 1.1 Introducción

Las heliconias, conocidas comúnmente como platanillos, son especies ornamentales de origen tropical que se cultivan para la producción de flores de corte y como plantas en maceta (Kress *et al.*, 1999; Colfloras, 2007). En México su cultivo ha crecido en algunas entidades estatales que cuentan con las condiciones climatológicas adecuadas y las principales empresas y fincas productoras se asientan en Chiapas, Puebla, Tabasco y Veracruz; y pueden considerarse los principales estados en la producción de estas ornamentales. Uno de los problemas trascendentales que ha frenado el mayor incremento en la superficie cultivada ha sido su propagación. Si bien, en algunas especies ya se han desarrollado protocolos para la propagación *in vitro* mediante organogénesis, directa e indirecta, aún no se han podido propagar mediante embriogénesis somática (Nathan *et al.*, 1993; Goh *et al.*, 1995; Hernández, 2008). Hasta la fecha los intentos para establecer las condiciones de cultivo e inducir el fenómeno han resultado fallidos en estas ornamentales (Ulisses *et al.*, 2007, 2010).

La embriogénesis somática, segunda ruta morfogénica para la propagación *in vitro* de plantas, es un proceso de desarrollo que permite a células no cigóticas, incluyendo células haploides, formar embriones y, en última instancia, plantas fértiles. Constituye una expresión de la totipotencia celular, donde se da la desdiferenciación de una célula no cigótica y la posterior re-diferenciación (reprogramación), que da como resultado la producción de un individuo normal con todas las células típicas de la planta madura (Rose *et al.*, 2010).

Los sistemas de cultivos embriogénicos forman la base para muchos métodos biotecnológicos en el mejoramiento de las plantas, ya que permiten no sólo la propagación clonal, sino también cambios específicos y dirigidos que se pueden introducir en individuos élites deseables mediante la ingeniería genética de células somáticas. Así, células individuales modificadas y embriones se pueden multiplicar de manera eficiente *in vitro* en gran cantidad antes del desarrollo de la planta. Este enfoque de la mejora genética elude las consecuencias no deseadas de la reproducción sexual (recombinación genética masiva y ciclos obligatorios de selección) inherente a la tecnología de cultivo convencional (Gray, 2005).

Con base en estos antecedentes los objetivos de la presente investigación fueron:

1. Desarrollar un protocolo de regeneración de plantas *in vitro* de *H. collinsiana* Griggs, *H. nickeriensis* Mass & Rooij y variedad 'Golden Torch' vía embriogénesis somática.
2. Evaluar la influencia del tipo de explante, especie de *Heliconia*, condiciones de luminosidad, concentración de sales totales y sacarosa del medio de cultivo y fitohormonas sobre el proceso.
3. Caracterizar histológicamente y con microscopía electrónica de barrido el proceso de inducción y la diferenciación de embriones somáticos en *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* var. 'Golden Torch' para determinar su origen anatómico.

## 1.2 Materiales y métodos

La presente investigación se desarrolló en los Laboratorios de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Genética; Histopatología Vegetal del Postgrado en Fitosanidad – Fitopatología; Morfología de Insectos del Postgrado en Fitosanidad – Entomología y Acarología, y Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, México.

### 1.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *H. collinsiana* Griggs, *H. nickeriensis* Mass & Rooij y *H. psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta variedad ‘Golden Torch’ colectadas en campo y plántulas *in vitro*, de las mismas especies, obtenidas mediante organogénesis directa (Hernández, 2008).

### 1.2.2 Inducción de callo y embriones somáticos

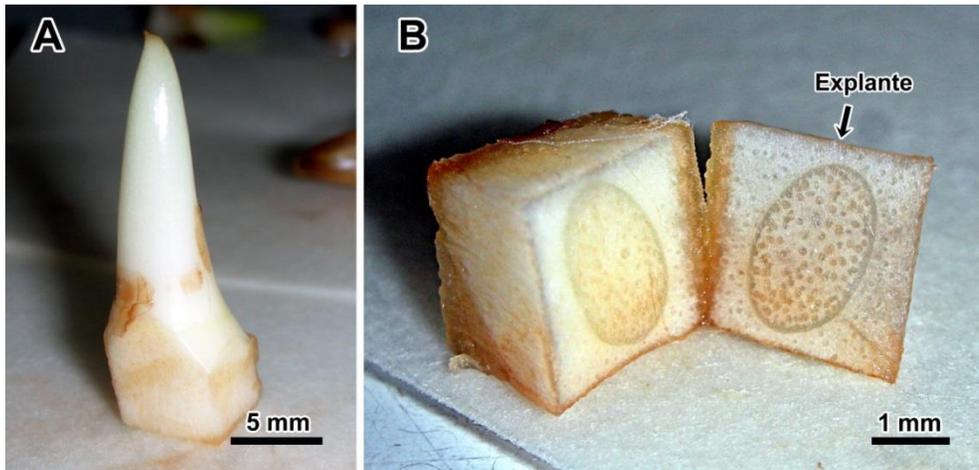
#### 1.2.2.1 Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo empleado estuvo constituido por las sales minerales del medio de Murashige y Skoog (MS, 1962) adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), agar (Sigma®, 9.0 g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (200 mg L<sup>-1</sup>) y tiamina (2 mg L<sup>-1</sup>). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star) antes de agregar el agar. La esterilización se llevó a cabo en autoclave vertical (AESA® 300) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min. Los explantes se sembraron en el medio de cultivo sumergiéndolos, conservando la polaridad, en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron a 26 ±2 °C en condiciones de fotoperiodo de 16 horas e intensidad luminosa de 45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, con excepción de los experimentos que requirieron de condiciones específicas de luz.

#### 1.2.2.2 Tipos de explantes

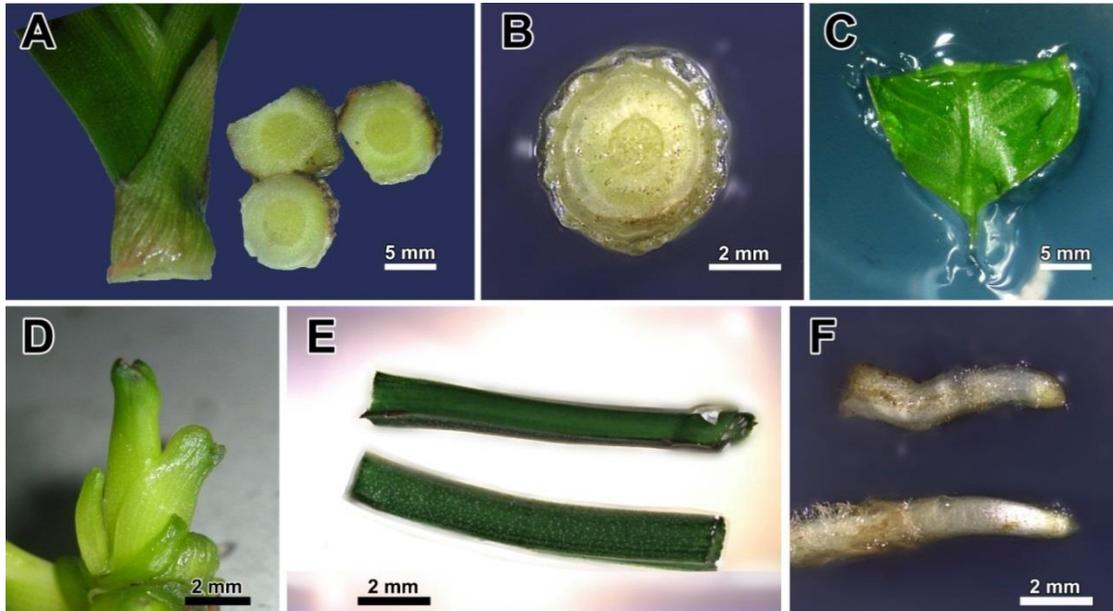
Para las tres especies de heliconias se evaluaron explantes *in vivo* e *in vitro*. De los explantes *in vivo* se usaron secciones transversales basales de yemas laterales de rizomas, procedentes del

campo (Figura 7). Para la esterilización de los explantes, los rizomas con las yemas laterales se lavaron con agua corriente por 20 min y se sumergieron 5 min en detergente. Después de cinco enjuagues con agua destilada, se sumergieron durante 15 min en una mezcla de plata coloidal estable (3%, v/v), hipoclorito de sodio comercial (30%, Cloralex®, v/v) y Tween® (4%, v/v) y al final se enjuagaron ocho veces con agua destilada esterilizada (Hernández, 2008).



**Figura 7. Sección transversal basal de yema lateral en *Heliconia nickeriensis* obtenida de rizomas extraídos de plantas cultivadas en campo. (A) Yema lateral y (B) Explante basal.**

Los explantes de origen *in vitro* se obtuvieron de plántulas de seis meses de edad, en etapa de multiplicación, cultivadas en medio MS (1962) suplementado con BA (2.5 mg L<sup>-1</sup>) y AIA (0.17 mg L<sup>-1</sup>) e incubadas en fotoperiodo de 16 h (45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) a 26 ± 2 °C (Hernández, 2008). Se evaluaron cinco tipos de explantes: secciones transversales basales de pseudotallo [thin cell layer (capas finas de células)], segmentos de hoja, brotes, segmentos de pecíolo y ápices de raíz. Los explantes de secciones transversales se obtuvieron cortando segmentos basales de pseudotallo de 5-8 mm de diámetro y 1-2 mm de grosor. Para los explantes de hojas se cortaron segmentos de 1 cm<sup>2</sup> de la sección central con la nervadura principal mientras que de los pecíolos se usaron secciones longitudinales de 1 cm. De los explantes de raíz se obtuvieron segmentos longitudinales de 1 cm incluyendo el ápice (Figura 8).



**Figura 8.** Explantes obtenidos de plántulas de heliconias cultivadas *in vitro* durante en la inducción de callo. (A y B) Sección transversal basal de pseudotallo; (C) Segmento de hoja; (D) Brote; (E) Segmentos de pecíolo; (F) Ápices de raíz.

### **1.2.2.3 Efecto de concentraciones de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y carbón activado en la inducción de callos**

Debido a que para el género y especies de la ornamental estudiada no existen reportes de embrionénesis somática indirecta, se hizo una profunda revisión bibliográfica sobre especies relacionadas filogénicamente con las heliconias y de hábito de crecimiento similar que incluyó *Alpinia pupurata*, *Colocasia esculenta*, *Musa* spp y *Zantedeschia* spp en las que se han establecido protocolos exitosos para la generación de callos y/o embrionénesis somática usando como auxina inductora al 2,4-D (Kackar *et al.*, 1993; Nathan *et al.*, 1993; Goh *et al.*, 1995; Balbão, 2001; Khalil, 2002; Mahanom *et al.*, 2003; Duquenne *et al.*, 2006; Strosse *et al.*, 2006; García *et al.*, 2007; Ulisses *et al.*, 2007; Deo *et al.*, 2009). Con estos antecedentes, se diseñó un experimento preliminar para obtener una aproximación de la concentración de 2,4-D y condiciones de cultivo que permitieran la inducción de callo en los diferentes explantes mencionados en el apartado 1.2.2.2 (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Tipos de explantes (*in vivo* e *in vitro*), concentraciones de carbón activado y ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) en la inducción de callo en *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* var. 'Golden Torch'.**

Explante <sup>†</sup>	Tratamiento (Núm.)	Carbón activado (g L <sup>-1</sup> )	2, 4-D	
			µM	mg L <sup>-1</sup>
<i>In vivo</i> : (1) Secciones basales de yemas laterales de rizomas	1	0	13.6	3
	2		27.1	6
	3		54.3	12
	4		81.4	18
	5		108.6	24
<i>In vitro</i> : (2) Secciones transversales de la base del pseudotallo (3) Segmentos de hoja (4) Brotes (5) Segmentos de pecíolo (6) Ápices de raíz	6	0.5	135.7	30
	7		13.6	3
	8		27.1	6
	9		54.3	12
	10		81.4	18
	11		108.6	24
	12		135.7	30

<sup>†</sup>Cada explante de las tres especies se evaluó en las combinaciones de carbón activado y 2,4-D.

Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad durante 12 semanas, con un subcultivo en medio fresco a las seis semanas. Al término del período únicamente se contabilizó la tasa de inducción de callo (%), estimada como el porcentaje de explantes que mostraron respuesta. Los datos obtenidos se analizaron como un experimento con arreglo factorial 6 x 2 x 6 = 72 tratamientos en total, el cual tuvo una distribución completamente al azar. Se establecieron 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un explante por frasco. El análisis de varianza de los datos obtenidos se realizó con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### **1.2.2.4 Efecto de otras fuentes de auxinas en la inducción e iniciación de callos durante 4, 8 y 12 semanas después de la siembra**

Después de determinar el mejor tipo de explante para la inducción de callo se probaron otras fuentes de auxina con el propósito de optimizar las respuestas: Dicamba (ácido 3-6-dicloro-o-anísico) y picloram (ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico) en concentraciones equimolares al 2,4-D. También se evaluaron nuevamente las concentraciones de 2,4-D del experimento descrito en el apartado 1.2.2.3 (Cuadro 3). Se sembraron los explantes obtenidos de las

secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' en medio MS (1962) adicionado con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado.

**Cuadro 3. Tipos de auxinas y concentraciones evaluadas en la inducción de callo embriogénico en explantes de secciones transversales basales de pseudotallo en tres especies de heliconias cultivados en medio MS (1962) adicionado con carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>).**

Especie <sup>¶</sup>	Tratamiento (Núm.)	Auxina	µM	mg L <sup>-1</sup>
1) <i>H. collinsiana</i>	1	Dicamba	13.6	3.0
	2		27.1	6.0
	3		54.3	12.0
	4		81.4	18.0
	5		108.6	24.0
	6		135.7	30.0
2) <i>H. nickeriensis</i>	7	2,4-D	13.6	3.0
	8		27.1	6.0
	9		54.3	12.0
3) Var. Golden Torch	10	Picloram	81.4	18.0
	11		108.6	24.0
	12		135.7	30.0
	13		13.6	3.3
	14		27.1	6.6
	15		54.3	13.1
	16		81.4	19.7
	17		108.6	26.2
	18		135.7	32.8

<sup>¶</sup>Cada especie se evaluó en todas las concentraciones de auxinas.

Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad durante 4, 8 y 12 semanas (período de inducción de callo) y, posteriormente, se pasaron a condiciones de fotoperiodo normal (16 h de luminosidad), haciendo un subcultivo a medio fresco a las seis semanas. Al término de cada período de incubación solamente se contabilizó la tasa de inducción de callo (%). Los datos obtenidos se analizaron con un diseño factorial 3 x 6 = 18 tratamientos totales, los cuales tuvieron una distribución completamente al azar. Se establecieron 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un explante por frasco. El análisis de varianza de los

datos se realizó con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 1.2.2.5 Evaluación de la calidad de luz en la inducción de callos

D'Onofrio *et al.*, (1998) reportaron que la luz juega un papel importante como disparador de la inducción de la embriogénesis somática, así como en algunas características morfológicas de los embriones somáticos.

A partir de las concentraciones hormonales que resultaron apropiadas para la inducción de callo bajo condiciones de oscuridad, se evaluó el efecto de la intensidad luminosa (luz blanca fría fluorescente y luz azul). Para ello se sembraron explantes de secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de *H. collinsiana* obtenidas *in vitro* en medio MS (1962) adicionado con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado y se evaluaron las mejores dosis de 2,4-D y picloram resultantes del experimento descrito en el apartado 1.2.2.4 (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Relación de diferentes condiciones ambientales de incubación en la inducción de callos a partir de explantes de secciones transversales basales de pseudotallos de *H. collinsiana* cultivados en medio MS (1962) durante cuatro, ocho y 12 semanas.**

Tratamiento (Núm.)	Condición ambiental de incubación <i>in vitro</i>	Auxina	$\mu\text{M}$	$\text{mg L}^{-1}$
1	0 [Oscuridad (testigo)]	2,4-D	81.4	18.0
2		Picloram	135.7	32.8
3	45 (Fotoperiodo 16/8 h) (Luz blanca)	2,4-D	81.4	18.0
4		Picloram	135.7	32.8
5	25 (Fotoperiodo 16/8 h) (Luz azul)	2,4-D	81.4	18.0
6		Picloram	135.7	32.8

Los cultivos se mantuvieron en cada condición ambiental durante 4, 8 y 12 semanas (período de inducción de callo) y se hizo un subcultivo a medio fresco a las seis semanas. Al término de cada período de incubación sólo se contabilizó la tasa de inducción de callo (%). Los datos obtenidos se analizaron como un experimento con arreglo factorial 3 x 2= 6 tratamientos en total, el cual tuvo una distribución completamente al azar. Se establecieron 10 repeticiones por tratamiento con un explante por frasco como unidad experimental. El análisis de varianza se llevó a cabo

con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### **1.2.2.6 Efecto de la concentración de sales minerales (%) y sacarosa ( $\text{g L}^{-1}$ ) del medio de cultivo MS (1962) en la inducción de callo**

Para este experimento se probaron diferentes concentraciones de sales minerales del medio de cultivo en combinación con el nivel de sacarosa. Para ello se sembraron explantes de secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *H. collinsiana* en medio MS (1962) adicionado con 2,4-D ( $81.4 \mu\text{M}$ ) y carbón activado ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Concentraciones de sales minerales del medio de cultivo MS (1962) (%) y sacarosa ( $\text{g L}^{-1}$ ) evaluadas en la inducción de callo embriogénico en secciones transversales basales de pseudotallos de plántulas *in vitro* de *H. collinsiana* cultivadas en medio MS (1962) adicionado con 2,4-D ( $81.4 \mu\text{M}$ ) y carbón activado ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ).**

Tratamiento (Núm.)	Sales minerales MS (%)	Sacarosa ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	100	15
2 (testigo)		30
3		45
4		60
5	75	15
6		30
7		45
8		60
9	50	15
10		30
11		45
12		60

Los cultivos se incubaron a  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 12 semanas en condiciones de oscuridad (período de inducción de callo) y se pasaron a condiciones de fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) durante cuatro semanas más efectuando un subcultivo a las seis semanas. Al término de este período se contabilizó la tasa de inducción de callo (%). Se establecieron 10 repeticiones por tratamiento con un explante por frasco como unidad experimental. El experimento tuvo un

diseño factorial  $3 \times 4 = 12$  tratamientos en total, los cuales tuvieron una distribución completamente al azar. El análisis de varianza se llevó a cabo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y se empleó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para la comparación de medias.

### **1.2.3 Proliferación de callos, inducción de etapas embriogénicas y maduración de embriones somáticos**

Una vez definidas las condiciones óptimas para la inducción de callos *in vitro* con el empleo de secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de *H. collinsiana*, se probaron tres concentraciones de 2, 4-D con el propósito de evaluar y optimizar su efecto en la proliferación de los callos. Como explantes se usaron masas de callos (aproximadamente 400 mg) que se sembraron en medio MS (1962) suplementado con 0, 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D y 0.5  $\text{g L}^{-1}$  de carbón activado.

Los cultivos se incubaron a  $26 \pm 2$  °C en condiciones de fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante 16 semanas haciendo subcultivos a medio fresco cada cuatro semanas. A las 4, 8, 12 y 16 semanas se contabilizó el peso fresco de callo (g), el porcentaje de callo embriogénico (%) y el número de embriones diferenciados en etapas globular y escutelar. Cada tratamiento estuvo representado por 10 repeticiones cuya unidad experimental fue un explante por frasco. El experimento tuvo un diseño simple y estuvo distribuido completamente al azar. El análisis de varianza de los datos obtenidos se realizó con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) empleando la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para la comparación de medias.

### **1.2.4 Maduración de embriones somáticos y regeneración de plántulas**

Para este ensayo se usaron los callos y embriones somáticos de *H. collinsiana* obtenidos en la etapa de proliferación. Los explantes de callos embriogénicos consistieron de masas de callo de aproximadamente 300 mg de peso fresco que contenían 15 embriones en etapa globular/escutelar. Los explantes se sembraron en medio MS (1962) adicionado con ácido abscísico (ABA), benciladenina (BA) y sin fitohormonas (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Concentraciones de ácido abscísico (ABA) y benciladenina (BA) evaluadas en la maduración de embriones somáticos de *H. collinsiana*.**

Tratamiento (Núm.)	Fitohormona	Concentración	
		mg L <sup>-1</sup>	μM
1	Sin fitohormona	0	0
2	ABA	0.5	1.9
3		1.0	3.8
4		2.0	7.6
5		BA	0.5
6	1.0		4.4
7	2.0		8.8

Los cultivos se incubaron a  $26 \pm 2$  °C en condiciones de fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante ocho semanas con un subcultivo a las cuatro semanas. Al término de este tiempo se contabilizó el peso fresco de callo (g), número de embriones en sus diferentes etapas de desarrollo (etapa globular, escutelar y coleoptilar), tasa de regeneración (%; estimada con base en el número de cultivos que regeneraron plántulas) y número de plántulas regeneradas. Se establecieron 10 repeticiones por tratamiento distribuidas en un diseño completamente al azar cuya unidad experimental fue la porción de callo con los 15 embriones por frasco. Los datos obtenidos se analizaron como un experimento con arreglo factorial  $2 \times 4 = 8$  tratamientos en total, el cual tuvo una distribución completamente al azar. El análisis de varianza de los datos obtenidos se realizó con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) usando la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para la comparación de medias.

### 1.2.5 Alargamiento de plántulas

En esta etapa de la regeneración de plántulas se usaron plantas de *H. collinsiana* de 0.5-1 cm de longitud obtenidas por embriogénesis somática. Se evaluaron tres porcentajes de sales minerales [(100, 75 y 50%, donde 100% representó la cantidad total de sales minerales del medio MS (1962)] en el medio de cultivo adicionado con  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de carbón activado.

Los cultivos se incubaron a  $26 \pm 2$  °C en condiciones de fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante ocho semanas con un subcultivo al mismo medio a las cuatro semanas. Al término de

este tiempo se contabilizó el número total de plántulas regeneradas para estimar la tasa de regeneración (%) y la altura promedio de plantas (cm). Se establecieron 10 repeticiones por tratamiento distribuidas en un diseño completamente al azar con diez plantas por frasco de cultivo como unidad experimental. El análisis de varianza de los datos obtenidos se llevó a cabo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 1.2.6 Análisis histológico de la masa de callo embriogénico

Con el propósito de caracterizar la anatomía de los callos producidos, así como el origen de los embriones diferenciados, se llevó a cabo este estudio anatómico por medio de la técnica de inclusión en parafina. Los tejidos analizados fueron los explantes empleados para la inducción de callos en el experimento descrito en el apartado 1.2.2.2 y muestras de los callos embriogénicos y no embriogénicos. Las muestras se procesaron siguiendo la metodología propuesta por López *et al.* (2005) modificando el alcohol usado en la deshidratación (isopropílico).

**Fijación y deshidratación.** Los tejidos se fijaron en una solución FAA: 52% alcohol isopropílico, 5% ácido acético glacial, 10 % formaldehído y 33% de agua destilada por 24 h. Después se deshidrataron e infiltraron en parafina (Paraplast Plus® Sigma) usando un procesador de tejidos automático (FISHER Tissuematon®) programado siguiendo la secuencia de las soluciones siguientes: alcohol isopropílico (30, 50, 70, 85, 96 y 100%); alcohol isopropílico-xileno 1:1; xileno 100% y xileno-parafina 2:1, 1:1, 1:2 por 6 h en cada solución.

**Inclusión en parafina.** Los tejidos se transfirieron a parafina líquida (56 °C) con dos cambios cada 12 h y luego se colocaron en moldes de aluminio con parafina para orientarlos y así obtener cortes medianos. Las muestras se dejaron solidificar por 4 h.

**Microtomía.** Con un micrótopo rotatorio manual (Reichert® Histostat) se hicieron cortes medianos de 10 µm de grosor. Los cortes se colocaron en porta objetos en los que previamente se aplicó una capa de adhesivo de cromo (1% de grenetina, 0.2% fenol y 0.1% alumbre de cromo) y se extendieron sobre una platina caliente (58 °C) durante 1 min. Después se dejaron escurrir por 20 min y se colocaron en estufa de secado a 60 °C por 24 h.

**Desparafinación e hidratación.** Los cortes se desparafinaron en una serie de tres cambios en xileno al 100% seguido de cuatro en alcohol etílico (100, 85, 70 y 50%) por 3 min en cada cambio.

**Tinción.** Se usó la tinción doble con safranina-verde rápido. Inicialmente, los cortes se tiñeron en 0.05% de safranina (Merck®, preparada en una solución de 2% de cloruro de sodio) por 24 h. Los cortes se enjuagaron tres veces con agua destilada y se deshidrataron en una serie de alcohol isopropílico (50, 70, 85 y 100%) con 1 min en cada cambio. Enseguida se inmergieron en una solución de verde rápido FCF (Merck®) al 0.12% por 1 min y se eliminó el exceso antes de pasarlas por alcohol isopropílico (100%) y tres cambios en xileno 100% con 1 min en cada cambio. Los cortes se montaron en resina sintética y colocaron en una parrilla a 60 °C por 24 h. Las observaciones se hicieron en un Fotomicroscopio III (Carl Zeiss®) y las fotomicrografías se tomaron con cámara digital para microscopía Paxcam®.

### **1.2.7 Observación de callos y embriones somáticos en microscopio estereoscópico y electrónico de barrido**

Para una evaluación más detallada de los callos embriogénicos y embriones somáticos generados, se hicieron observaciones en un microscopio estereoscópico Carl Zeiss® (Modelo Tessoar) y se tomaron fotografías digitales con cámara para microscopía Paxcam®. También se prepararon muestras para su observación en el microscopio electrónico de barrido (MEB).

Los tejidos se fijaron en glutaraldehído (2.5%) en solución amortiguadora de fosfatos Sorensen's 0.1 M con pH de 7.2 durante 24 h (Bozzola y Rusell, 1999) y se lavaron tres veces (5 min cada uno) en el mismo amortiguador de fosfatos. La deshidratación de los tejidos se hizo con una serie gradual de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90%) por 45 min en cada concentración y tres cambios de etanol (100%) con 20 minutos en cada cambio. Posteriormente, las muestras se secaron punto crítico (Sandri-780A®), se montaron y orientaron sobre porta muestras usando cinta conductiva doble adhesiva de carbón. A continuación, las muestras se recubrieron con oro durante 4 min en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat) y se observaron y fotografiaron en microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6390®) operado a 10 Kv en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

En la Figura 9 se muestra un diagrama de flujo que resume la metodología empleada para inducir la embriogénesis somática en las especies de heliconias en estudio.

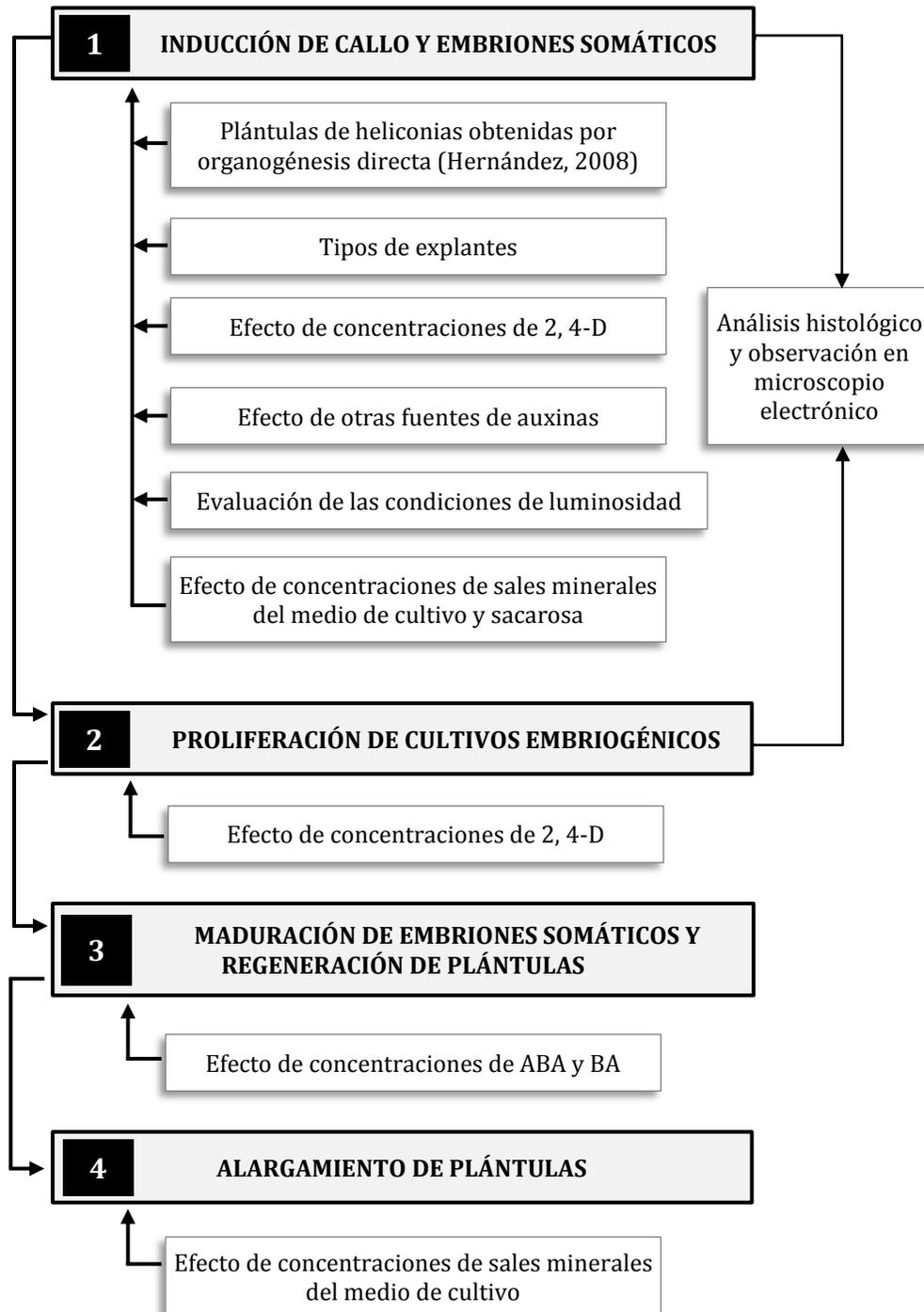


Figura 9. Diagrama de la metodología para la propagación *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' vía embriogénesis somática.

## 1.3 Resultados y discusión

### 1.3.1 Inducción de callo embriogénico

#### 1.3.1.1 Efecto del tipo de explante en la inducción de callos

El ANOVA practicado a los datos reveló que los factores principales del experimento (tipo de explante, las dosis de 2,4-D mezcladas con carbón activado y la interacción) tuvieron efectos significativos en el porcentaje de inducción de callos sólo en *H. collinsiana* a las 12 semanas de cultivo en condiciones de oscuridad. El tipo de explante fue el factor que mayor influencia tuvo en la respuesta, con 65.0% promedio de la variación total (Apéndice 1). En el caso de *H. nickeriensis* y la variedad Golden Torch la respuesta a las dosis de auxina fue nula en todos los explantes probados.

Las secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *H. collinsiana* fueron los únicos explantes que mostraron la capacidad de inducir la formación de callos en el 20% de los explantes. En cuanto a las concentraciones de 2,4-D el mayor porcentaje de inducción de callos (16.7%) se obtuvo cuando el medio de cultivo se suplementó con 81.4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D combinado con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. En los tratamientos donde se omitió el carbón activado no se logró la inducción de callos (Cuadro 7 y 8).

**Cuadro 7. Efecto del tipo de explante en la inducción de callos *in vitro* (%) en *Heliconia collinsiana* cultivados durante 12 semanas en oscuridad en varias concentraciones de 2,4-D y carbón activado (C.A.).**

Tipo de explante	%
<i>In vivo</i>	
Secciones basales de yemas laterales de rizomas	0 b
<i>In vitro</i>	
Secciones transversales basales de pseudotallo	20 a
Segmentos de hoja	0 b
Brotes	0 b
Segmentos de pecíolo	0 b
Ápices de raíz	0 b
<b>DMS</b>	<b>3.6</b>

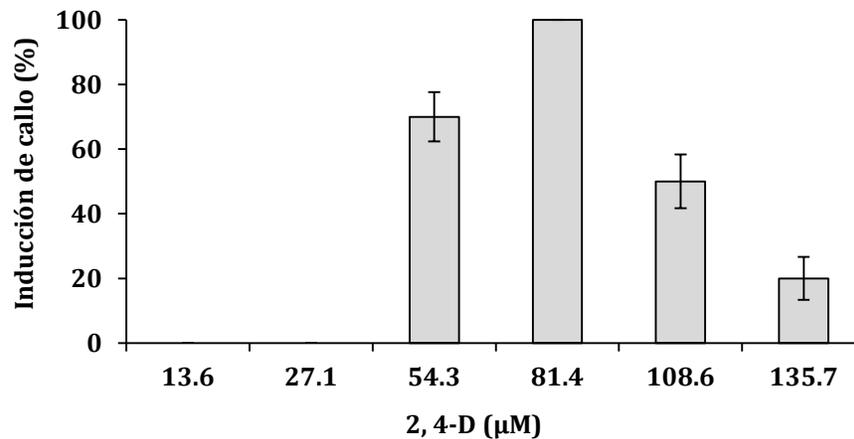
†Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

**Cuadro 8. Efecto del ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) y carbón activado (C.A.) en la inducción de callos *in vitro* (%) en diversos explantes de *Heliconia collinsiana* cultivados durante 12 semanas en oscuridad.**

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	+	C.A. ( $\text{g L}^{-1}$ )	%
13.6	+	0	0 d
13.6	+	0.5	0 d
27.1	+	0	0 d
27.1	+	0.5	0 d
54.3	+	0	0 d
54.3	+	0.5	11.7 ab
81.4	+	0	0 d
81.4	+	0.5	16.7 a
108.6	+	0	0 d
108.6	+	0.5	8.3 bc
135.7	+	0	0 d
135.7	+	0.5	3.3 cd
<b>DMS</b>			5.8

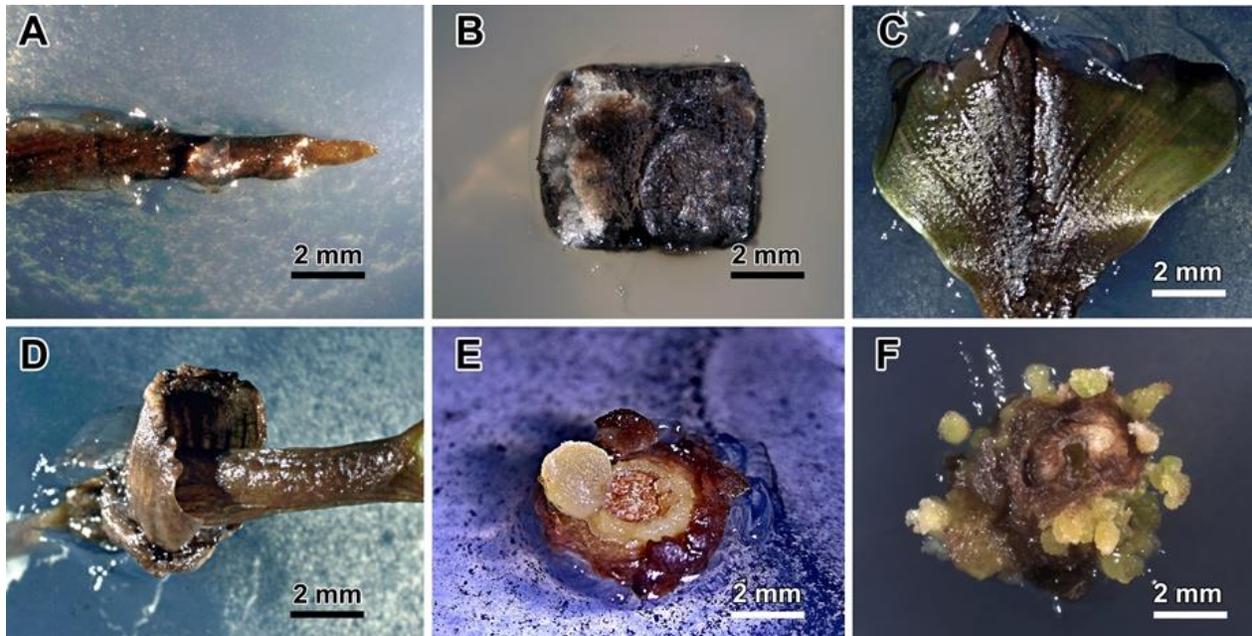
†Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

En la interacción tipo de explante con las dosis de 2,4-D mezcladas con carbón activado, las secciones transversales basales de pseudotallos de plántulas *in vitro* de *H. collinsiana* fueron las que respondieron favorablemente a la inducción de 100% de callo cuando se cultivaron con 81.4  $\mu\text{M}$  de esta auxina en medio de cultivo suplementado con 0.5  $\text{g L}^{-1}$  de carbón activado. Con la dosis de 54.3  $\mu\text{M}$ , la tasa de inducción en el mismo tipo de explante y concentración de carbón activado fue de 70% (Figura 10).



**Figura 10. Porcentaje de inducción de callos en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *H. collinsiana* cultivadas en 2,4-D y 0.5  $\text{g L}^{-1}$  de carbón activado después de 12 semanas en condiciones de oscuridad.**

Después de las 12 semanas de cultivo todos estos explantes se ennegrecieron (Figura 11A-D). Esta respuesta podría atribuirse al hecho de que en estos tejidos no existieron células blanco con la capacidad de competencia para responder a las diferentes concentraciones de 2,4-D probadas, por lo que pudieran requerir de otras hormonas y concentraciones diferentes para manifestar esa respuesta.



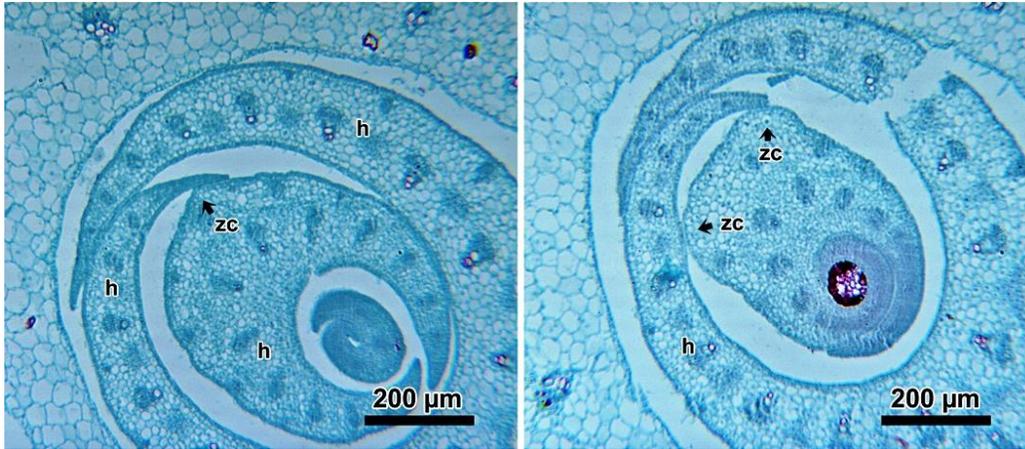
**Figura 11.** Respuestas de explantes de *Heliconia collinsiana* en la inducción de callos *in vitro* cultivados en 2,4-D y carbón activado ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) después de 12 semanas en oscuridad. (A) Ápices de raíz, (B) Sección transversal basal de pseudotallo, (C) Segmento de hoja, (D) Segmento de pecíolo. Inducción de callo en los bordes del explante de secciones transversales basales de pseudotallo con (E) 54.3 y (F) 81.4  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D.

A pesar de que cualquier órgano de la planta puede utilizarse como explante, no todos los tejidos son capaces de manifestar la totipotencia celular para responder a estímulos externos que disparen la competencia para generar callos, en un inicio, y posteriormente, la embriogénesis somática (Fehér *et al.*, 2003). Además, hay que tomar en cuenta que en la selección de los explantes, el estado fisiológico es importantísimo de considerar, ya que deben emplearse en la etapa de desarrollo correcta. En general, se deben usar tejidos jóvenes ya que éstos pueden ser más susceptibles de responder a las señales externas de inducción y reprogramación celular (Deo *et al.*, 2010). Debido a que estos explantes no respondieron a la inducción de callo se descartaron para estudios posteriores.

En contraste, los únicos explantes que mostraron capacidad morfogénica, para la inducción de callos, fueron las secciones transversales basales de pseudotallos de plantas de la especie *H. collinsiana* provenientes de cultivos *in vitro*. Al término de las 12 semanas de cultivo, los explantes de estos cultivos se tornaron de color marrón y café, (probablemente por oxidación del tejido), hasta tornarse de apariencia necrótica. Sin embargo, formaron pequeñas masas de callo en los bordes (Figura 11E-F). Los callos generados fueron de consistencia compacta y coloración blanquizca y amarillenta.

Este tipo de explante se inserta dentro del sistema de capa fina de células que se refiere a explantes de tamaño pequeño extraídos de diferentes órganos de la planta (tallos, hojas, inflorescencias, primordios florales, órganos florales, cotiledones, hipo/epicotilo, zona apical o embriones), ya sea longitudinal o transversalmente. A diferencia de las secciones longitudinales, que tienen sólo un tipo de tejido (monocapa de células epidérmicas), las transversales incluyen un pequeño número de células de los tejidos epidérmicos, vascular y fundamental (Tran Thanh Van, 1980).

La capacidad para formar callos en las secciones transversales basales de pseudotallo observada en el presente estudio demuestra que las células presentes pueden conducirse en un programa morfogénico *in vitro* específico si reciben las condiciones de crecimiento adecuadas (Teixeira da Silva, 2003). Estas mismas células, en este tipo de explantes son las que pueden tener la capacidad para responder a las concentraciones de 2, 4-D y continuar con la percepción y transducción de señales dentro de una ruta morfogénica deseada. En monocotiledóneas, incluyendo la mayor parte de los cereales de importancia agronómica, la competencia embriogénica se restringe sobre todo a las células con origen embrionario o meristemático, donde se incluyen embriones inmaduros o semillas, las bases de las hojas (gramíneas) o ápices (Orchidaceae), las escamas de bulbo (Liliaceae) y yemas laterales. El potencial embriogénico de estas células meristemáticas se puede mantener si los explantes se cultivan en un medio de cultivo que contenga ácido 2,4-diclorofenoxiacético seguido por la formación excesiva de callo (Fehér, 2005). El análisis de cortes histológicos de este tipo de explante reveló que en la base del pseudotallo de plántulas *in vitro* cultivadas con BA ( $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) se encuentran zonas de crecimiento activo con células meristemáticas que de manera natural dan origen a brotes, pero cuando se trata de inducir la embriogénesis somática son las que responden a la acción del 2, 4-D (Figura 12).



**Figura 12.** Cortes histológicos de secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *Heliconia collinsiana* usadas como explantes en la inducción de callos. zc = zona de crecimiento con células meristemáticas; h = hoja envainada.

Las secciones transversales han cobrado mucha relevancia en la propagación *in vitro* de muchas especies de plantas, tanto por organogénesis como por embrionénesis somática. En algunos cereales como sorgo, la inducción de callo fue efectiva en secciones transversales de raíz de plántulas de siete días de germinadas (Baskaran *et al.*, 2006). En arroz, la inducción fue factible con secciones transversales de ápices de meristemas de brote de plántulas de dos semanas de edad (Nhut *et al.*, 2000). Las plantas ornamentales también han sido eficientemente propagadas usando secciones transversales. En orquídeas como *Rhynchostylis gigantea*, se han obtenido múltiples yemas laterales usando secciones basales desde el tallo hasta el ápice de brotes de plántulas *in vitro* de un año de edad (Van Le *et al.*, 1999). En crisantemo también han sido efectivas las secciones transversales de entrenudos de plántulas *in vitro* para la inducción de callos embrionénesis (Teixeira da Silva y Fukai, 2003). En violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) y begonia (*Begonia rex*) se han usado hojas (pecíolos, nervadura central y lámina); en híbridos de geranio (*Pelargonium x hortorum*) se han obtenido buenos resultados con hipocotilos; en gladiolo, secciones de rizoma y en iris (*Iris pallida*) han sido útiles secciones de brotes (con 5 a 6 hojas) desde la base hacia el ápice (Teixeira da Silva *et al.*, 2007).

En el caso específico del género *Heliconia*, Goh *et al.* (1995) usaron secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* para lograr la organogénesis indirecta de *H. psittacorum* L. variedad 'Choconiana'. En estos explantes se formaron callos y cuerpos parecidos a protocormos.

La nula respuesta de las secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *H. nickeriensis* y de la variedad Golden Torch sugiere que posiblemente el genotipo es un factor que influencia la capacidad para la inducción de callo. A pesar de tratarse de especies del mismo género, se corrobora que no todas responden de forma similar a los estímulos externos proporcionados durante su cultivo *in vitro* (2, 4-D, carbón activado y oscuridad). No es raro haber obtenido este resultado en el presente estudio, ya que en muchos otros casos, el genotipo parece ser el factor que controla las respuestas morfogénicas observadas y porque es frecuente que sólo algunas variedades de una misma especie puedan regenerarse, y más aún mediante embriogénesis somática. Si bien la influencia genotípica puede tener una base genética, investigaciones sugieren la participación de fenómenos epigenéticos, en particular, el patrón de condensación de la cromatina. Las investigaciones de estos fenómenos han revelado que la heterocromatina se caracteriza por la metilación de citosina e histona H3. Otros estudios demuestran la participación de pequeños RNAs de interferencia en la condensación de la cromatina. Los patrones de metilación de ADN son hereditarios y se pueden mantener con la mitosis (Rose *et al.*, 2010).

La falta de respuesta de *H. nickeriensis* y de la variedad Golden Torch también puede deberse a la recalcitrancia. En algunos genotipos, este fenómeno es un obstáculo para la obtención de respuestas morfogénicas deseadas, ya que con esta condición las células vegetales, tejidos y órganos no tienen la capacidad para responder a las manipulaciones *in vitro* en cualquier etapa del cultivo (Benson, 2000). Normalmente, las plantas tropicales se consideran especies recalcitrantes y las heliconias son ornamentales tropicales. Tal incapacidad en este tipo de plantas es producto del alto contenido de sustancias fenólicas que se oxidan cuando las células sufren heridas o entran en senescencia. Por ello, cuando estos tejidos se disecan llegan a tornarse de color café u oscurecerse y no prosperan en condiciones *in vitro*. Muchas plantas son ricas en compuestos fenólicos, por lo que después de las heridas provocadas al tejido, estos compuestos son oxidados por polifenol oxidasas y el tejido se torna color marrón. Los productos de oxidación no sólo oscurecen el tejido, sino también inhabilitan la actividad de diversas proteínas que pueden tener efecto inhibitorio sobre la embriogénesis somática (George, 2008; Kamle *et al.*, 2011).

El carbón activado fue esencial para lograr la inducción de callos en las secciones transversales basales de pseudotallo en *H. collinsiana*. Su omisión en el medio de cultivo impidió la inducción

y los explantes se ennegrecieron. La efectividad de este compuesto en el medio de cultivo se debe a su elevada capacidad como adsorbente, el cual posiblemente tiene la habilidad de eliminar sustancias liberadas a los medios de cultivo por los tejidos de los explantes cultivados que inhiben las respuestas morfogénicas, en particular el ácido fenilacético, derivados del ácido benzoico y otros compuestos tóxicos incoloros (Pan y Van Staden, 1998; Thomas, 2008). También se ha demostrado que absorbe el 5-hidroximetilfurfural, un inhibidor formado en la degradación de la sacarosa durante el tiempo de esterilización en la autoclave. Regularmente se recomienda usarlo en dosis de 0.5 a 1.0 g L<sup>-1</sup> porque además de eliminar los inhibidores del crecimiento, también puede adsorber y reducir los niveles de fitohormonas que de otro modo estimularían la iniciación, crecimiento y proliferación del callo (Deo *et al.*, 2010).

### **1.3.1.2 Efecto de otras fuentes de auxinas en la inducción e iniciación de callos durante 4, 8 y 12 semanas después de la siembra**

El análisis estadístico ( $p \leq 0.05$ ) de este experimento reveló que la fuente de auxina, dosis y su interacción tuvieron efectos significativos en el porcentaje de inducción de callos a las ocho y 12 semanas de cultivo en condiciones de oscuridad. A las cuatro semanas, la respuesta fue afectada sólo por la fuente de auxina y la interacción auxina x dosis. Sin embargo, en los tres períodos de evaluación la fuente de auxina fue el factor que mayor influencia tuvo en la respuesta con 48.0% promedio de la variación total (Apéndice 2).

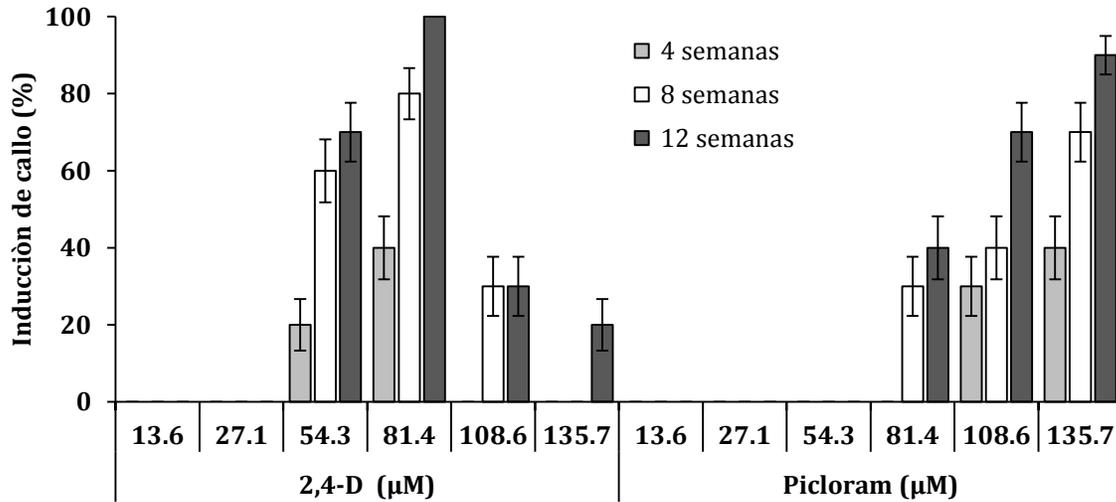
El 2,4-D y picloram fueron las auxinas que mejor promovieron la inducción de callos en los tres períodos de evaluación, aunque los mayores valores se alcanzaron a las 12 semanas de cultivo. Con el dicamba los resultados fueron nulos. En cuanto a las dosis empleadas de las tres fuentes de auxinas, el mayor porcentaje de inducción de callos (46.7%) se obtuvo con 81.4  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D seguido de 135.7  $\mu\text{M}$  de picloram a las 12 semanas de cultivo. Las dosis de 13.6 y 27.1  $\mu\text{M}$  tuvieron efecto negativo en la inducción (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Inducción de callos (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio MS (1962) adicionado con varias fuentes y dosis de auxinas y carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>) a las cuatro, ocho y 12 semanas en oscuridad.**

	4 semanas	8 semanas	12 semanas
<b>Auxina</b>			
Dicamba	0.0 b	0.0 b	0.0 b
2, 4-D	10.0 a	28.3 a	36.7 a
Picloram	11.7 a	23.3 a	33.3 a
<b>DMS</b>	9.9	12.0	11.4
<b>Dosis (µM)</b>			
13.6	0.0 a	0.0 b	0.0 c
27.1	0.0 a	0.0 b	0.0 c
54.3	6.7 a	20.0 ab	23.3 b
81.4	13.3 a	36.6 a	46.7 a
108.6	10.0 a	23.3 a	33.3 ab
135.7	13.3 a	23.3 a	36.6 ab
<b>DMS</b>	17.0	20.8	19.6

‡Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

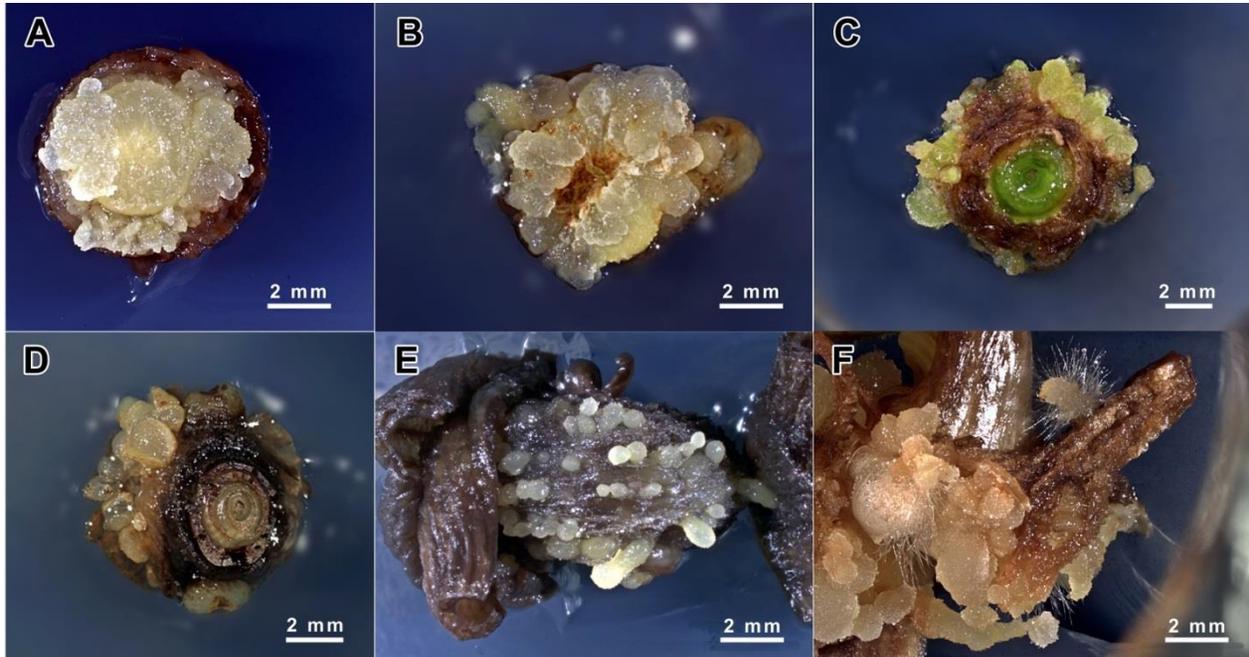
En la interacción fuente de auxina con las dosis, la mejor tasa de inducción de callo (100%) se logró a las 12 semanas de cultivo con 81.4 µM de 2, 4-D. Las dosis de 108 y 135.7 µM de 2,4-D también indujeron callos pero en proporción decreciente, lo que sugiere que probablemente estas concentraciones empezaron a tener efectos negativos en el explante. En contraste, el picloram promovió la inducción de callos de forma directamente proporcional conforme se incrementó la dosis hasta alcanzar el máximo porcentaje de inducción (90%) con 135.7 µM a las 12 semanas de cultivo (Figura 13).



**Figura 13. Inducción de callos en secciones transversales basales del pseudotallo de plántulas *in vitro* de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio MS (1962) adicionado con 2,4-D y picloram a las cuatro, ocho y 12 semanas en oscuridad.**

Los callos generados con el 2,4-D mostraron consistencia compacta y coloración blanca, mientras que los producidos con el picloram fueron friables y de color amarillento. Los callos se formaron en los bordes y sobre el explante. La coloración blanca de los callos formados con 2, 4-D se mantuvo desde las cuatro hasta las 12 semanas de cultivo. Los callos del picloram mostraron coloración amarillenta en todos los períodos de evaluación (Figura 14). En todas las concentraciones de dicamba los explantes se ennegrecieron y no generaron respuesta morfológica, por lo que se descartó como auxina inductora de callo.

Cuando los callos generados con 2,4-D se transfirieron a condiciones de fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), se tornaron de color verde claro y continuaron creciendo en tanto que los procedentes del picloram se ennegrecieron y no prosperaron. Esto indica que, si bien ambas auxinas fueron capaces de generar callos, los obtenidos con 2,4-D mostraron mayor capacidad de crecimiento que los de picloram (Figura 15).



**Figura 14.** Inducción de callos *in vitro* en explantes de secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) adicionado con carbón activado ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ). (A) Callos inducidos con  $81.4 \text{ } \mu\text{M}$  de 2,4-D después de 4, (B) 8 y (C) 12 semanas de cultivo en oscuridad. (D) Callos inducidos con  $135.7 \text{ } \mu\text{M}$  de picloram cultivados en oscuridad después de 4, (E) 8 y (F) 12 semanas.



**Figura 15.** Crecimiento de callos generados en secciones transversales basales del pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) sin fitohormonas en fotoperiodo de 16 h ( $45 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) durante ocho semanas. (A) Callos procedentes de  $135.7 \text{ } \mu\text{M}$  de picloram mantenidos en oscuridad por 12 semanas. (B, C) Callos procedentes de  $81.4 \text{ } \mu\text{M}$  de 2,4-D mantenidos en oscuridad por 12 semanas.

Si bien existen células de los explantes que pueden ser inducidas a la embriogénesis somática directa e indirecta donde involucra la fase de callos, en las secciones transversales basales de

psedudotallo de plántulas de *H. collinsiana* no se observaron estructuras que permitieran sugerir la presencia de embriones formados directamente en los explantes. Cuando sucede esta respuesta se debe a que en los explantes existen células predeterminadas embriogénicamente. En cambio, los callos generados en los explantes de heliconia indican que las células presentes no están determinadas embriogénicamente y primero se forman callos antes de formar embriones (Von Arnold *et al.*, 2002). En estas células se requiere inducir la desdiferenciación y la iniciación de la división celular en el explante antes de que puedan expresar la competencia embriogénica (Namasivayam, 2007).

Se ha propuesto que las fitohormonas y el estrés juegan un papel central en la mediación de las cascadas de transducción de señales que conduce a la reprogramación de la expresión génica. Esto se traduce en una serie de divisiones celulares que inducen el crecimiento desorganizado de callos o crecimiento polarizado que da lugar a la embriogénesis somática (Von Arnold *et al.*, 2002). Existen pocos ejemplos en donde la embriogénesis somática se indujo en un medio de cultivo carente de fitohormonas, como en *Eleutherococcus koreanum* (Park *et al.*, 2005), el estudio detallado de estos modelos ayudaría a esclarecer los primeros eventos que suceden en el desarrollo del embrión (Lakshmanan y Taji, 2000).

El primer paso en cualquier evento asociado con una respuesta a determinada hormona es el propio reconocimiento por las células destino. Tal reconocimiento normalmente involucra receptores, los cuales son proteínas asociadas a las membranas celulares o localizadas en el citoplasma. Las hormonas más ampliamente usadas para inducir y regular la embriogénesis somática *in vitro* son las auxinas y las citocininas. Básicamente regulan el ciclo celular y disparan las divisiones celulares, factores claves en el inicio de la embriogénesis somática. Específicamente, las auxinas regulan la expresión génica y el 2, 4-D es la principal hormona empleada en la inducción de la embriogénesis somática (Thomas y Jiménez, 2005).

La alta eficiencia del 2, 4-D en la inducción de callo, observada en los explantes de heliconia y en diversos sistemas *in vitro* y especies, indica el carácter específico y único de las fitohormonas. EL 2,4-D parece actuar no sólo como un análogo de auxina exógeno sino también como un factor de estrés efectivo. Los estudios que asocian al 2,4-D con diversos cambios fisiológicos y de expresión génica indican su posible papel como factor de estrés que desencadena el patrón embriogénico de desarrollo en células cultivadas. Se ha establecido que, durante la inducción de

callos el 2,4-D puede actuar directamente como auxina o modificando el metabolismo intracelular del AIA (Fehér *et al.*, 2003).

Además, el 2,4-D es más efectivo en la inducción de la embriogénesis somática que el AIA endógeno, debido a que la auxina artificial no se puede metabolizar en las células vegetales (Stasolla *et al.*, 2004). Debido a estas características muchos sistemas de cultivo de tejidos usan al 2,4-D como el mejor inductor de la embriogénesis somática. Así, en especies de *Musa* spp, relacionadas filogenéticamente con *Heliconia*, esta auxina ha sido la que mejores resultados ha brindado para el establecimiento de la embriogénesis a partir de yemas florales y ápices de brotes (Jalil *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2006; Smitha y Ashalatha, 2010).

Por su parte, el picloram *per se* ha sido una auxina eficaz para la inducción de callo embriogénico en algunas especies como *Manihot esculenta* (Atehnkeng *et al.*, 2005) aunque en otras como *Phylla nodiflora* debe ser combinado con otras auxinas como el 2,4-D u otros componentes del medio de cultivo (Ahmed *et al.*, 2011). Incluso, en *Musa* spp, el picloram es eficiente para la inducción de callo embriogénico en ápices de brote, superando al 2,4-D (Filippi *et al.*, 2001).

El dicamba es una auxina que se usa en la inducción *in vitro* de callos; aunque en el presente estudio no promovió la inducción. Sin embargo, sí ha resultado útil en explantes de secciones longitudinales de yemas de *Musa* spp. (grupo AAA), donde 10  $\mu$ M indujeron callos que después se convirtieron en estructuras embriogénicas (Filippi *et al.*, 2001). También se ha demostrado que esta auxina ha sido más eficiente para la proliferación de callos en explantes de flores masculinas inmaduras de *Musa* spp. (grupo AAA), de las variedades Lalkela y Grande Naine, más que en la inducción de los mismos (Sidha *et al.*, 2007).

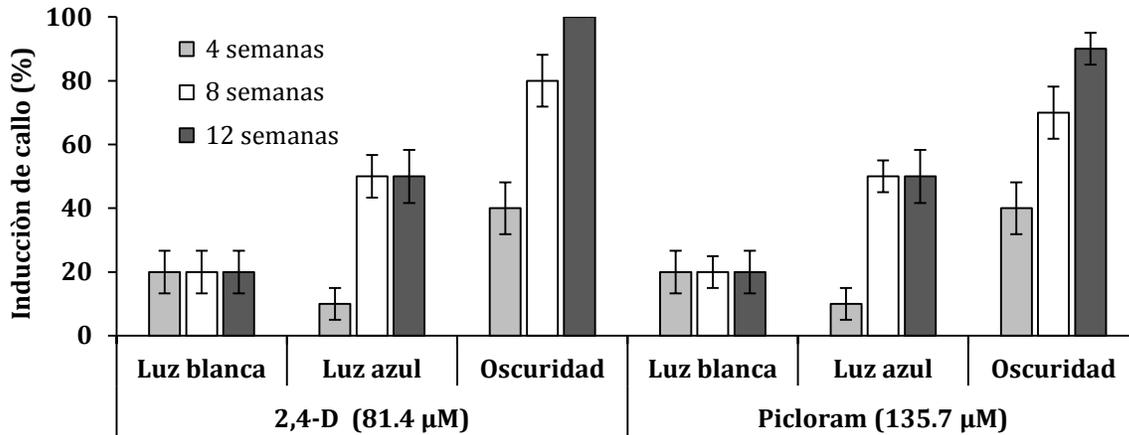
Un aspecto que es importante resaltar es el tiempo que tomó la inducción de callo (12 semanas) que es un lapso considerablemente superior al que se puede observar en algunas especies relacionadas filogenéticamente con *Heliconia* como *Musa* spp y *Zingiber officinale*, en donde la mayor tasa de inducción ocurre en las primeras cuatro semanas de cultivo en oscuridad (Jalil *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2006; Lincy *et al.*, 2009). En *H. chartacea*, variedad 'Sexy pink', Ulisses *et al.* (2007), indujeron la formación de callos en secciones de ovarios después de 13 semanas de

cultivo en oscuridad con 45.5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, pero los callos fueron de apariencia friable y de color amarillento, y no prosperaron en estructuras embriogénicas.

Las razones por las que las secciones transversales requirieron 12 semanas en oscuridad y en presencia de 2, 4-D para inducir callos son difíciles de explicar. Se desconoce a ciencia cierta si durante el tiempo de inducción de callos embriogénicos el 2,4-D es requerido para la adquisición de la competencia o para iniciar el destino celular embriogénico, o ambos. Actualmente sí se ha definido que la determinación del destino celular toma lugar en presencia del 2,4-D, el cual bloquea la progresión del desarrollo al mismo tiempo y con solo removerlo del medio de inducción se puede establecer la polaridad celular, el cual es uno de los primeros eventos que subyacen al desarrollo embriogénico (Fehér *et al.*, 2003; Samaj *et al.*, 2003).

### **1.3.1.3 Evaluación de la calidad de luz en la inducción de callos**

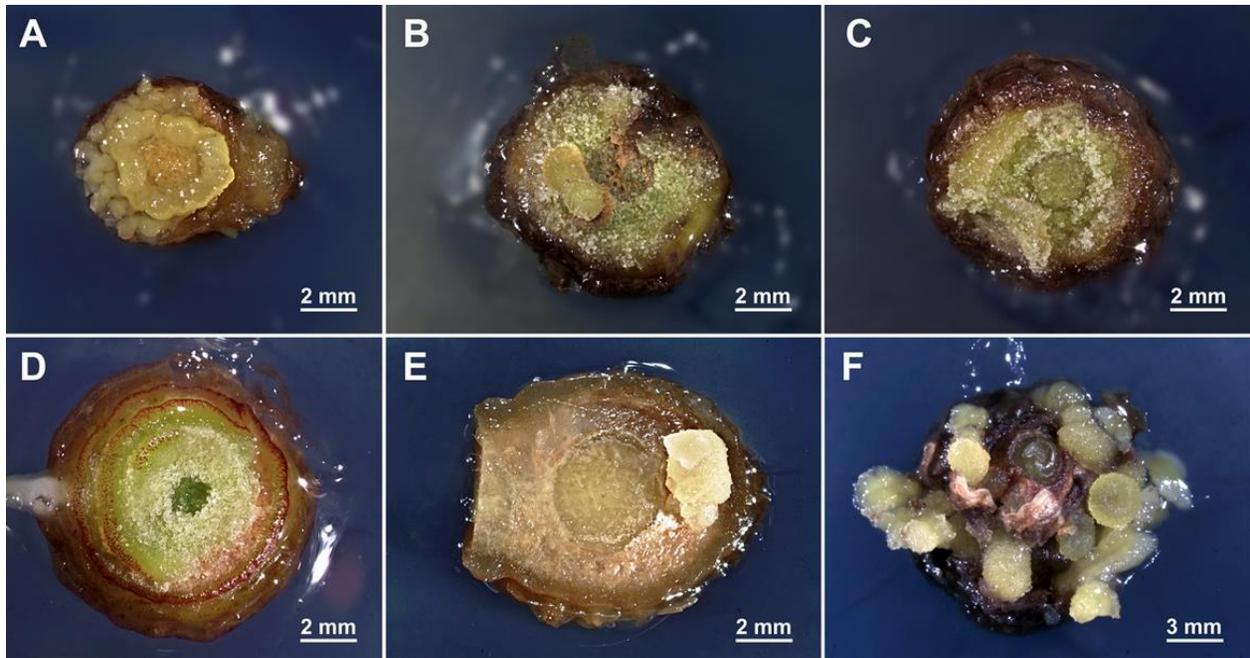
La inducción de callos fue afectada significativamente ( $p \leq 0.05$ ) por la condición de luz empleada en los seis tratamientos evaluados a las ocho y 12 semanas de cultivo (Apéndice 3). La respuesta obtenida con la luz blanca fría ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y la luz azul ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), proporcionada a los cultivos en fotoperiodos de 16 h, fue inferior a la observada en la oscuridad. La luz azul superó a la luz blanca en la inducción de callo, pero la máxima tasa (50%) fue la mitad de la obtenida en condiciones de oscuridad, tanto en 2, 4-D como en picloram (Figura 16).



**Figura 16.** Efecto de las condiciones de luz en la inducción de callos *in vitro* (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio MS (1962) adicionado con 2, 4-D y picloram a las cuatro, ocho y 12 semanas.

Los explantes cultivados en luz blanca generaron pequeñas masas de callo que a las cuatro semanas eran de apariencia blancuzca y verduzcas. Sin embargo, conforme transcurrieron las semanas estos callos cesaron su crecimiento y, junto con el explante, se empezaron a ennegrecer hasta tornarse totalmente de color café (Figura 17A-C). En el caso de los explantes cultivados con luz azul, las escasas masas de callos formados mostraron la misma apariencia que los de luz blanca, sólo que el ennegrecimiento se presentó cerca de las 12 semanas de cultivo (Figura 17D-F).

Después de definir las mejores dosis de auxinas para la inducción de callo en condiciones de oscuridad (apartado 1.3.1.2), se evaluó la influencia de las condiciones de luz. El fotoperiodo u oscuridad son críticos para inducir callos embriogénicos, así como también la longitud de onda de la luz. Aunque los resultados alcanzados en el presente estudio demostraron que la luz blanca y azul son ineficientes para la inducción de callos embriogénicos en *H. collinsiana*, en algunas especies otras condiciones de luz favorecen la respuesta. En cultivos de *C. oblonga*, *Begonia gracilis* y *Araujia sericifera* la luz roja, contraria a la blanca, estimuló la más alta capacidad embriogénica, mientras que en cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis* irradiados continuamente con luz azul, opuesto a la luz roja, promovió la regeneración. La estimulación de la embriogénesis somática por la luz roja se debe a la fotoactivación de las fitohormonas (Gaj, 2004).



**Figura 17.** Inducción de callos en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en (A-C) luz blanca ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y (D-F) luz azul ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (A) Callos generados a las 4 semanas con  $81.4 \mu\text{M}$  de 2, 4-D. (B) Callos inducidos a las 8 y (C) 12 semanas con  $135.7 \mu\text{M}$  de picloram. (D) Callos inducidos a las 4 semanas con  $135.7 \mu\text{M}$  de picloram. (E) Callos formados a las 4 y (F) y 12 semanas de cultivo con  $81.4 \mu\text{M}$  de 2, 4-D.

En la inducción de callos embriogénicos de membrillo (*Cydonia oblonga*) la competencia embriogénica mostró una correlación con el fitocromo de la luz roja que mostró efecto inductivo pero su respuesta fue influenciada adversamente por el fotorreceptor de luz azul (D'Onofrio *et al.*, 1998). En otros casos, se ha reportado que la luz azul favorece la síntesis de antocianinas pero reduce el desarrollo de los embriones somáticos. En *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado que la luz azul tiene efectos positivos en la embriogénesis somática (Kaldenhoff *et al.*, 1994). En general, no existe consenso amplio sobre los efectos producidos por las diferentes calidades de luz en la embriogénesis somática, ya que las respuestas inducidas son muy variables entre las especies.

La escasa respuesta a luz blanca y azul en los explantes de heliconia demuestra que las condiciones de oscuridad juegan un papel importante en la inducción de callos en *H. collinsiana*. Si bien no se ha definido el papel específico que juega la oscuridad en la inducción de callos embriogénicos, se sugiere que la luz juega un papel clave mediante la modulación de la expresión de algunas proteínas. Entre las moléculas identificadas destacan los fitocromos, ya

que interactúan con los factores de transcripción y regulan la expresión de numerosos genes (Gaj, 2004).

En el género *Musa* y especies afines, los mejores resultados de inducción de callos embriogénicos se han conseguido con periodos de oscuridad que oscilan entre dos y doce semanas (Escalant y Teisson, 1989; Khalil y Elbanna, 2004; Divakaran y Nair, 2011). En híbridos de *Zantedeschia* la oscuridad también ha proporcionado las mejores condiciones para inducción de callos embriogénicos (Duquenne *et al.*, 2006). Para iniciar el proceso de embriogénesis somática se requiere en principio de un efecto inductor que normalmente lo proporcionan las condiciones de estrés. Sin embargo, se considera que el 2, 4-D es el principal inductor de la embriogénesis somática (Rose *et al.*, 2010). Por la baja respuesta lograda en *H. collinsiana* con la luz blanca y azul se descartaron para futuros estudios. En cambio, los altos porcentajes de inducción de callos obtenidos bajo oscuridad permiten definirla como la condición óptima para la inducción de callos.

#### **1.3.1.4 Efecto de la concentración de sales minerales (%) y sacarosa ( $\text{g L}^{-1}$ ) del medio de cultivo MS (1962) en la inducción de callo**

Con base en el análisis estadístico ( $p \leq 0.05$ ) de los resultados obtenidos en este experimento se determinó que la tasa de inducción de callos se afectó significativamente por las concentraciones de sales minerales y sacarosa y su interacción a las 12 semanas de cultivo en condiciones de oscuridad. Sin embargo, la concentración de sales minerales en el medio de cultivo fue el factor que mayor influencia tuvo en la respuesta con 54.6% promedio de la variación total (Apéndice 4).

Las sales minerales del medio MS (1962) concentradas al 100% promovieron la mayor tasa de inducción de callos seguida de la concentración de 75%. El medio de cultivo con 50% de sales redujo considerablemente la inducción de callo. En cuanto a la concentración de sacarosa, los mayores valores de inducción de callo se obtuvieron con  $30 \text{ g L}^{-1}$  en el medio de cultivo. Conforme se incrementó la concentración de sacarosa se redujo la tasa de inducción de callo (Figura 18).

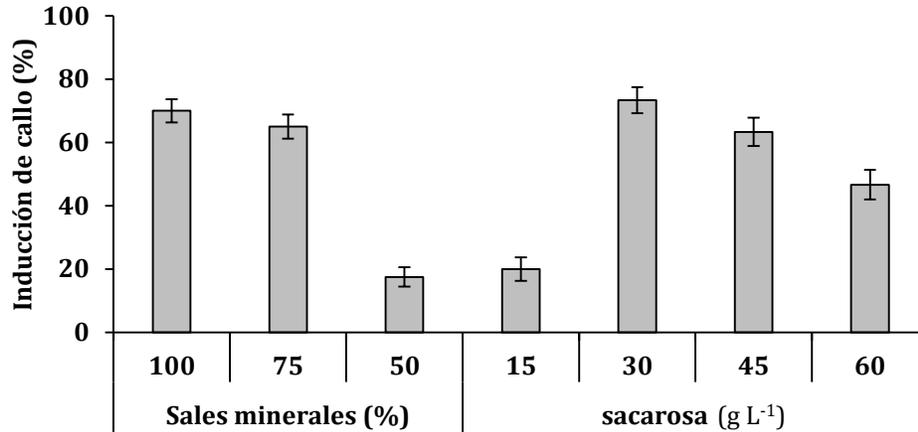


Figura 18. Efecto de las concentraciones de sales minerales del medio de cultivo MS (1962) (%) y sacarosa (g L<sup>-1</sup>) en la inducción de callos *in vitro* (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana* con 2, 4-D (81.4 μM) durante 12 semanas en oscuridad.

En la interacción de las concentraciones de sales minerales y sacarosa, la mejor tasa de inducción de callo (100%) se logró con la combinación de 100% de sales minerales con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa en el medio de cultivo. Esta combinación correspondió al testigo y fue la que arrojó los mejores resultados desde los ensayos preliminares de inducción de callos. Las concentraciones de 75% de sales minerales con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa también indujeron 100% de callos. En orden de mayor respuesta, le siguió la combinación de 75 y 100% de sales minerales con 45 g L<sup>-1</sup> de sacarosa donde se obtuvo 80% de inducción (Figura 19).

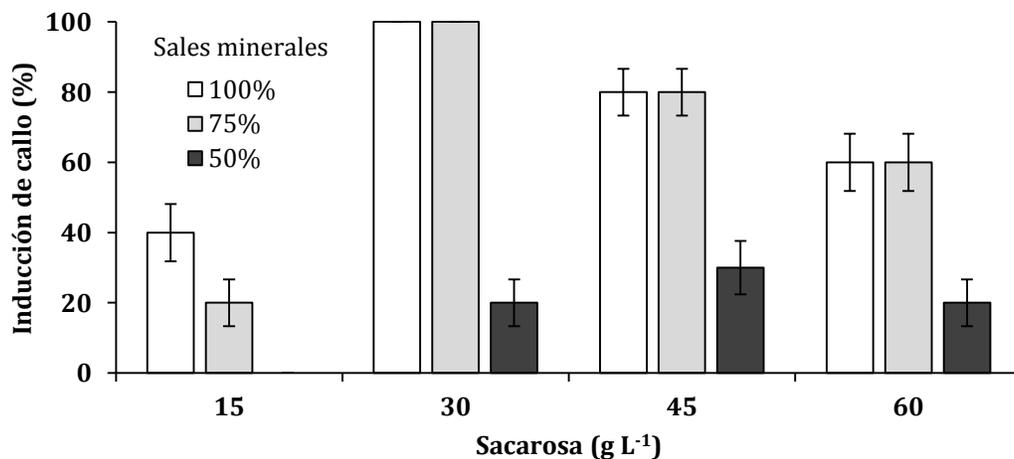


Figura 19. Efecto de la combinación de sales minerales (%) y sacarosa (g L<sup>-1</sup>) en la inducción de callos *in vitro* (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio MS (1962) adicionado con 2, 4-D (81.4 μM) a las 12 semanas en oscuridad.

La concentración de las sales minerales del medio de cultivo tiene marcados efectos en la embriogénesis somática. Las concentraciones de 75 y 100% en el medio de cultivo fueron óptimas para la inducción de callos en los explantes de heliconia. Sin embargo, con 50% se afectó notablemente la respuesta. Básicamente los efectos se deben a la fuente de nitrógeno que debe ser suministrada en forma reducida (Bhojwani y Razdan, 1996). Su presencia en forma reducida juega un papel clave durante la inducción del callo embriogénico. El medio de cultivo MS (1962) es el que se ha usado en la mayoría de las especies para inducir embriogénesis somática y por los resultados obtenidos pareciera que aporta las concentraciones de nitrógeno óptimas para el desarrollo de los cultivos embriogénicos, mientras que otras formulaciones como las del medio de White (1963), que carece de ellas, los cultivos no muestran respuestas satisfactorias.

La sacarosa es un componente esencial en todos los medios de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, ya que es la fuente esencial de energía para los explantes, además de crear las condiciones apropiadas de potencial osmótico para el crecimiento celular *in vitro*. La sacarosa ha sido el disacárido más ampliamente usado para inducir la embriogénesis somática y rara vez se usan otros carbohidratos como maltosa, fructosa o glucosa. Los efectos del azúcar y las condiciones osmóticas influyen sobre la morfogénesis *in vitro* y la expresión génica (Gaj, 2004; Gibson, 2005).

La concentración óptima de sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>) encontrada para la inducción de callos en explantes de *H. collinsiana* también ha sido reportada para especies similares de los géneros *Musa*, *Zantedeschia* y *Zingiber* (Escalant y Teisson, 1989; Kackar *et al.*, 1993; Khalil y Elbanna, 2004; Duquenne *et al.*, 2006; Divakaran y Nair, 2011). En contraste, en otras especies de plantas las mejores condiciones de inducción de callos embriogénicos se han alcanzado con menos concentración de sacarosa. Así, en la inducción de embriogénesis somática en clavel, Karami *et al.* (2006) determinaron que la máxima frecuencia de callo embriogénico se obtuvo en los medios de cultivo con 9 y 12% de sacarosa. La embriogénesis somática se incrementó significativamente cuando se usó más de 12% de sacarosa pero fue bajo el desarrollo de embriones normales.

Los diferentes porcentajes de inducción obtenidos en las concentraciones de sacarosa evaluadas responden al papel que desempeña el azúcar en la morfogénesis vegetal y la

expresión génica. Se ha reportado que la síntesis de ABA en condiciones osmóticas apropiadas es inducida por los azúcares así como la expresión génica modulada por sacarosa en suspensiones celulares de colza (Gaj, 2004). También se ha determinado que existe una interacción compleja entre el azúcar y la señalización hormonal en el crecimiento y desarrollo vegetal (Leon y Sheen, 2003). La baja respuesta observada con 45 y 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa se ha reportado en otras especies. En la embriogénesis somática de soya, Lazzeri *et al.* (1988) encontraron que concentraciones superiores a 40 g L<sup>-1</sup> de sacarosa en el medio tienen efecto negativo en la inducción de callo embriogénico y en el desarrollo de los embriones, probablemente debido a su interferencia con las auxinas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en todos los experimentos de inducción de callos en *H. collinsiana*, se definieron como las condiciones óptimas para tal fin el cultivo de secciones transversales de la base de pseudotallo de plántulas *in vitro* en medio MS (1962) con las sales minerales completas, suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 81.4 µM de 2, 4-D y 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado durante 12 semanas en oscuridad. Estas condiciones de cultivo fueron las que se usaron para el establecimiento de subsecuentes cultivos de inducción de callos embriogénicos y su evaluación en las siguientes etapas de la embriogénesis somática.

### **1.3.2 Proliferación de callos, inducción de etapas embriogénicas y maduración de embriones somáticos**

Los callos obtenidos bajo las condiciones óptimas definidas en la etapa de inducción de callo embriogénico se pasaron a condiciones de fotoperiodo de 16 h (45 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante dos semanas, manteniéndolos en el medio de cultivo suplementado con 81.4 µM de 2, 4-D. Después de este lapso de tiempo los callos se subcultivaron a medio MS (1962) sin fitohormonas y adicionado con 2, 4-D (0, 4.5 y 9.0 µM).

El análisis estadístico ( $p \leq 0.05$ ) del experimento reveló que la proliferación de callos embriogénicos fue afectada significativamente por las concentraciones de 2, 4-D en el medio de cultivo a las ocho, 12 y 16 semanas. El aumento de los callos a las cuatro semanas no fue significativo entre los tratamientos (Apéndice 5). En el porcentaje de callos embriogénicos formados y número de embriones en etapa globular y escutelar sólo fue significativo a las 16 semanas de cultivo (Apéndice 6). El mayor incremento de callo se obtuvo con 4.5 y 9.0 µM de 2,

4-D a las 16 semanas de cultivo. La cantidad de callo registrada hasta este tiempo con estas concentraciones de auxina fue en promedio más de 18 veces superior a la cantidad inicial sembrada. Los callos cultivados en medio MS (1962) sin fitohormonas sólo mostraron crecimiento en las primeras cuatro semanas (Figura 20).

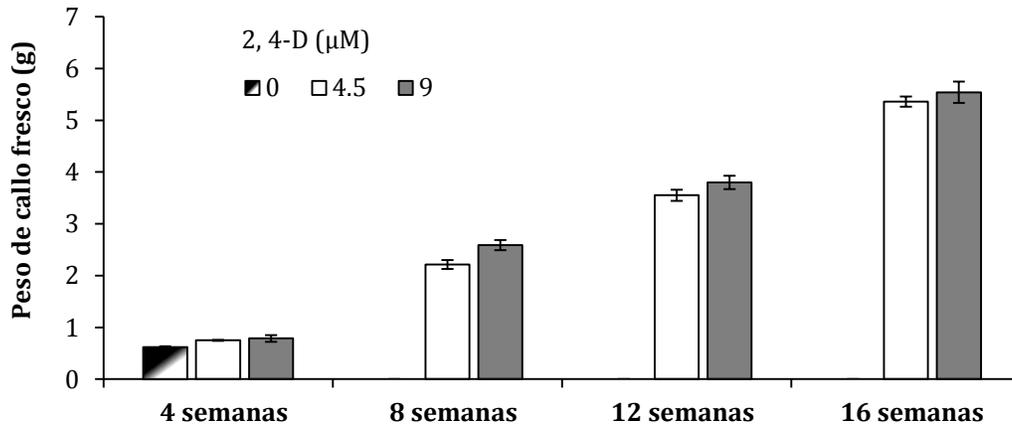
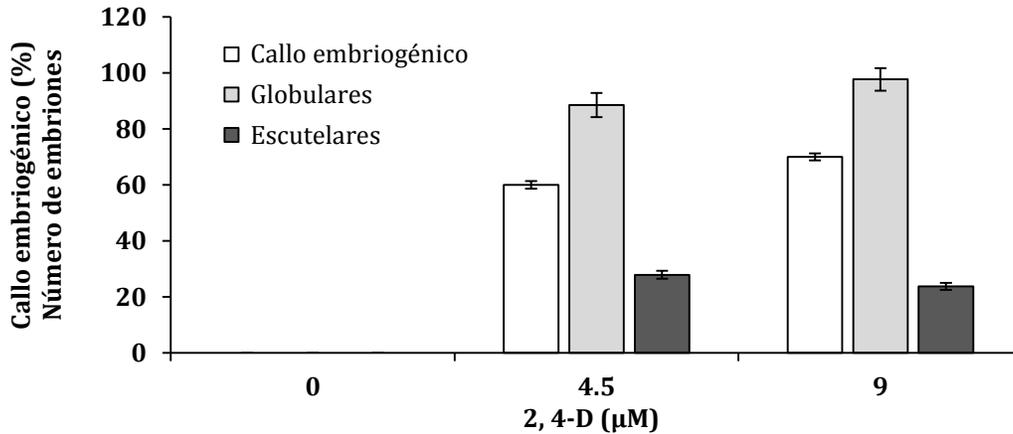


Figura 20. Proliferación de callos (g) de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) en fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

El porcentaje de callo embriogénico sólo pudo determinarse a las 16 semanas de cultivo, que fue el tiempo en el que se observaron los primeros embriones en etapa globular y escutelar. El 2, 4-D adicionado al medio de cultivo favoreció la formación de callos embriogénicos con las dosis de 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$ , y entre ellas la respuesta fue similar (65% entre ambas concentraciones). En esos callos embriogénicos se contabilizó el número de embriones formados en etapa globular y escutelar. El número de embriones en estado globular superó por 3.6 veces en promedio la cantidad de embriones escutelares. La cantidad de embriones globulares formados no fueron estadísticamente diferentes, pero fue ligeramente mayor la respuesta con 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D. En los escutelares tampoco hubo diferencias estadísticas en la cantidad y la respuesta fue ligeramente mayor con 4.5  $\mu\text{M}$  (Figura 21).

Los callos generados en los primeros ensayos de inducción en condiciones de oscuridad (apartados 1.3.1.1 al 1.3.1.4) se pasaron a fotoperiodo normal de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sin cambiar el medio de cultivo con 2, 4-D (81.4  $\mu\text{M}$ ) durante dos semanas. En seguida se pasaron a

medio MS (1962) sin fitohormonas con la finalidad de promover la proliferación del callo y la consecuente formación de masas proembriogénicas. Sin embargo, todos los callos se ennegrecieron y no continuaron su crecimiento a las cuatro semanas de cultivo. Por esta razón, se adicionaron al medio de cultivo diferentes dosis de 2, 4-D (0, 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$ ) y se evaluó su efecto en la proliferación y mantenimiento de los callos.

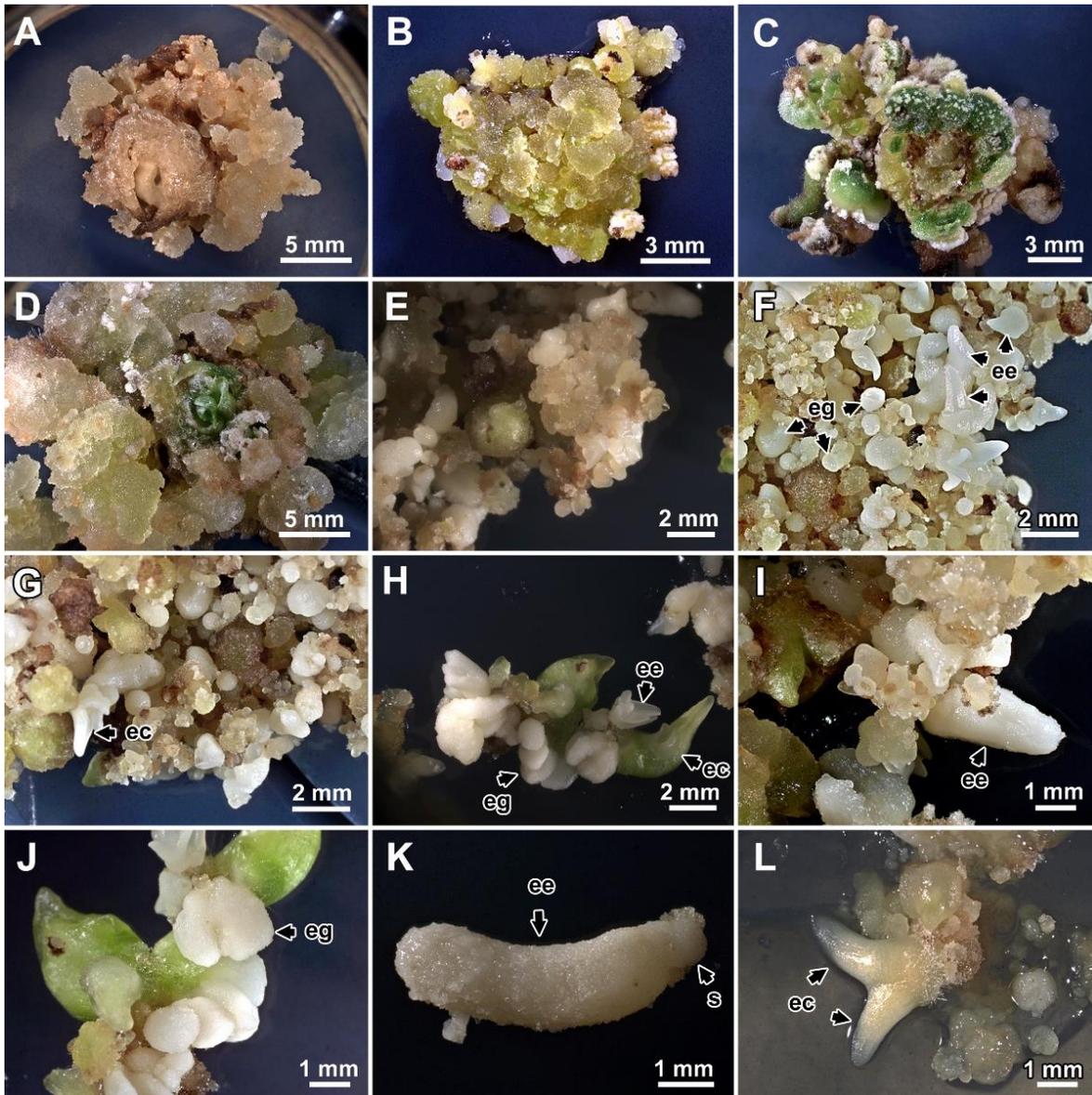


**Figura 21. Callos embriogénicos (%) y embriones globulares (%) y escutelares (%) formados en la etapa de proliferación en *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) adicionado con 2, 4-D (0, 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$ ) en fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a las 16 semanas.**

Los callos cultivados en medio MS (1962) mostraron crecimiento de forma similar al observado con las dosis de 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D en las primeras cuatro semanas pero después se empezaron a tornar de color café hasta ennegrecerse completamente a la sexta semana (Figura 22A). En cambio, los callos cultivados con 2, 4-D (4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$ ) continuaron su crecimiento y después de ocho semanas empezaron a adquirir una coloración verde amarillenta que posteriormente dieron origen a masas proembriogénicas que se fueron separando del callo y mostraron una apariencia arenosa (Figura 22B-D).

A las 16 semanas de cultivo se observaron en el mismo callo masas proembriogénicas junto con embriones globulares (que fueron de color blanco y translúcidos), escutelares y coleoptilares (Figura 22E-L). Incluso los embriones coleoptilares iniciaron su cambio de color blanco a verde que fue indicativo de la germinación de los embriones somáticos y regeneración de las primeras plántulas. Observaciones detalladas a nivel estereoscópico nos permitieron determinar que para alcanzar la forma escutelar, los embriones globulares debieron adquirir una forma elíptica

que fue avanzando hasta adquirir la típica forma alargada escutelar, característica distintiva de la embrionénes en monocotiledóneas (KrishnaRaj y Vasil, 1995).



**Figura 22.** Proliferación de callos embrionénes y germinación de embriones somáticos de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) en fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (A) Callos cultivados en medio sin fitohormonas a las cuatro semanas. (B) Callos cultivados con 4.5 y (C) 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D a las ocho semanas. (D) Masas proembrionénes cultivadas con 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D a las 12 semanas. (E) Embriones en estado globular en masas proembrionénes. (F-G) Embriones globulares y escutelares en 4.5  $\mu\text{M}$  a las 16 semanas. (H-L) Transición de embriones globulares a escutelar y coleoptilar. eg=embrión globular; ee=embrión escutelar; ec=embrión coleoptilar; s=suspensor.

De forma general, el proceso de embriogénesis somática se divide en dos fases: inducción y expresión y ambas fueron observables en el presente estudio. En la primera, las células somáticas diferenciadas adquieren competencia embriogénica y proliferan como células embriogénicas. En la fase de expresión, las células embriogénicas disparan su competencia embriogénica y se diferencian para formar embriones somáticos. Las dos fases se sugieren como independientes y son influenciadas por diversos factores (Jiménez 2001). En el caso de las heliconias las dos fases fueron inducidas por la acción del 2, 4-D y las condiciones ambientales de cultivo.

En la etapa de proliferación fue posible observar callos embriogénicos y no embriogénicos. A simple vista eran similares; sin embargo, los embriogénicos iniciaron la formación de masas proembriogénicas a partir de las 12 semanas de cultivo en 2, 4-D, mientras que los callos no embriogénicos sólo se mantuvieron dividiendo e incrementando su tamaño. Aquí las células de las periferias del callo empezaron a cambiar de coloración y pasaron de blanco a café hasta ennegrecerse. Tal ennegrecimiento progresó hasta cubrir totalmente el callo y cesar el aumento del callo. En contraste con esto, los callos embriogénicos expresaron la capacidad para formar células embriogénicas que fueron las que completaron su transición de estado somático a embriogénico, y a su vez formaron los primeros embriones.

En la progresión de la embriogénesis somática, una vez que se forman las células embriogénicas continúa la proliferación de las mismas hasta formar masas proembriogénicas tal como ocurrió en los callos de heliconia. En esta etapa se requiere la participación del 2, 4-D, como la auxina inductora, para que proliferen estas masas; sin embargo, también ejerce efecto inhibitorio en el desarrollo de las masas para su conversión en embriones somáticos (Nomura y Komamine, 1985; Filonova *et al.*, 2000). El grado de diferenciación de los embriones que se lleva a cabo en presencia de la auxina varía según la especie. Las distintas etapas de los embriones somáticos de heliconia observadas en los medios de cultivo con 2, 4-D se explica porque la auxina es tomada rápidamente del medio de cultivo por los callos de tal modo que se agota a los pocos días. Por consiguiente, si los cultivos no se transfieren cada semana a un medio fresco se inicia el desarrollo de los embriones somáticos (Von Arnold *et al.*, 2002).

Si bien en la mayoría de los protocolos en los que las auxinas actúan como un inductor eficaz de la embriogénesis somática, la progresión de la misma se logra con la reducción o eliminación de

la auxina del medio de cultivo, en los callos de heliconia no se observó este comportamiento. Estudios sugieren que la exposición continua de los explantes a los altos niveles de auxina exógenos interfiere con el gradiente polar de auxina que normalmente se establece durante la embriogénesis, evitando el correcto patrón apical-basal del embrión (Jiménez y Thomas, 2005). Sin embargo, en algunas especies de plantas se requieren de las auxinas para continuar la embriogénesis somática y este fue el comportamiento observado en los callos embriogénicos de *H. collinsiana*, donde la eliminación del 2, 4-D del medio de cultivo provocó el ennegrecimiento de los callos y la supresión de la embriogénesis somática.

En la embriogénesis somática de variedades Cavendish de *Musa acuminata*, la proliferación de los callos embriogénicos se logró conservándolos en presencia de 2, 4-D (4.5  $\mu\text{M}$ ) (Youssef *et al.*, 2010). En otras especies de clima tropical como el cacao (*Theobroma cacao*), la proliferación de los callos embriogénicos requirió de mantener los cultivos con 2, 4-D (9.0  $\mu\text{M}$ ) (Santos *et al.*, 2002) y lo mismo se observó en *Colocasia esculenta* donde también fue necesario dejar los callos en la auxina para lograr la proliferación (Deo *et al.*, 2009). En cambio, en palma de aceite (*Elaeis guineensis*), la etapa de proliferación y formación de embriones somáticos se logró retirando el 2, 4-D del medio de cultivo (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010).

En el caso específico de las heliconias, Ulisses *et al.* (2007), intentaron el establecimiento de callos embriogénicos de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros variedades Sexy Pink y Sexy Scarlet a partir de secciones de ovarios. Emplearon medio MS (1962) suplementado con 22.6  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D y después de 13 semanas en oscuridad los explantes no generaron callos y se ennegrecieron. En un segundo trabajo, los mismos autores lograron la inducción de callos embriogénicos en la variedad Sexy Pink usando el mismo tipo de explante, dosis de 2, 4-D y tiempo de incubación, pero añadiendo al medio de cultivo 14.2  $\mu\text{M}$  de AIA. Sin embargo, no hubo proliferación de callos embriogénicos ni embriones somáticos (Ulisses *et al.*, 2010).

### **1.3.3 Análisis histológico y observación en MEB del callo embriogénico y embriones somáticos**

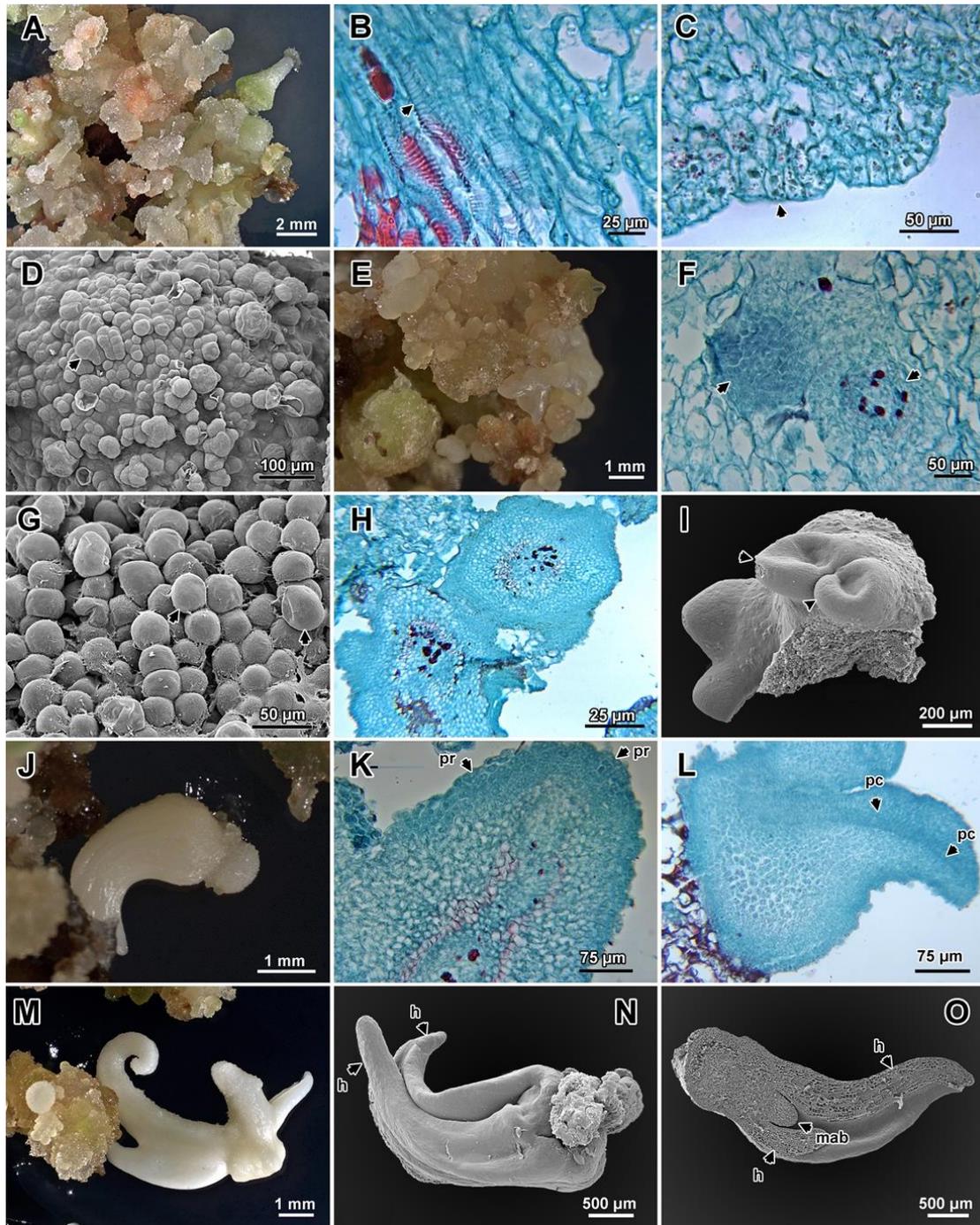
En los sistemas de propagación *in vitro* mediante embriogénesis somática, los estudios histológicos tienen la finalidad de demostrar que en efecto la regeneración se logró vía embriogénesis y no por organogénesis (Rose *et al.*, 2010). En el presente estudio, los callos

cultivados en la etapa de proliferación con 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D a las ocho semanas tenían una apariencia translúcida que posteriormente se convirtieron en callos de color verde amarillento (Figura 23A).

En los cortes histológicos se observaron callos constituidos por tejido parenquimatoso formado por células isodiamétricas con paredes delgadas. Además, los callos se mostraron altamente irrigados con tejido vascular. En este tejido también se observaron inclusiones de color rojo de apariencia compacta y granulosa de posible naturaleza fenólica (Figura 23B). En la periferia del callo se observaron células en constante división de forma anticlinal, perpendicular a su superficie, con núcleos grandes (Figura 23C-D).

Cuando los callos alcanzaron las 12 semanas de cultivo se empezaron a diferenciar masas proembriogénicas de color blancuzco amarillento y se observaron los primeros embriones en etapa globular (Figura 23E). En la formación de los embriones somáticos se apreciaron estructuras circulares con células pequeñas de núcleos prominentes y citoplasma denso (Figura 23F). A las 16 semanas de cultivo, se apreciaron los embriones globulares formados por células pequeñas con citoplasma denso que se encontraban en proceso de división y procambium (Figura 23G-H). Los embriones que continuaron su desarrollo ontogenético después de la etapa globular empezaron a mostrar el crecimiento asimétrico que caracteriza nuevas etapas de desarrollo y el posterior origen al primordio de hoja mientras en la región central se aprecia bien diferenciado el meristemo de brote (Figura 23I).

Una vez que los embriones alcanzaron la etapa coleoptilar se observó en el ápice del embrión la protodermis (Figura 23K) y el procambium que dará origen al tejido vascular embrionario (Figura 23L). En un estado más avanzado del desarrollo del embrión se observaron las primeras hojas envainantes y el meristemo apical de brote (Figura 23M-O).



**Figura 23.** Aspectos morfo histológicos de la embrionénesis somática de *Heliconia collinsiana*. (A) Callo embrionénesico con (B) tejido vascular y presencia de fenoles. (C-D) Callo embrionénesico con divisiones celulares constantes. (E) Masas proembrionénesicas con la (F) formación de proembriones de estructura circular y (G-H) embriones globulares. (I) Primordios de hoja y meristemo de brote. (J) Embrión en etapa coleoptilar donde se aprecia la (K) protodermis y (L) procambium. (M-O) Embrión con las primeras hojas y meristemo apical de brote. pr=protodermis; pc=procambium; h=hoja; mab=meristemo apical de brote.

### 1.3.4 Maduración de embriones somáticos y regeneración de plántulas

El análisis estadístico de este experimento reveló que la cantidad de callo embriogénico y el número de embriones en sus diferentes etapas de desarrollo fueron afectados significativamente por las fitohormonas adicionadas al medio de cultivo a las ocho semanas (Apéndice 7). Los callos cultivados sin fitohormonas fueron los que mostraron mayor incremento seguido de los cultivados con 2.2  $\mu\text{M}$  de BA, mientras que las concentraciones de ABA redujeron considerablemente el aumento de los mismos. Respecto al número de embriones formados en sus diferentes etapas, se observó que el medio de cultivo adicionado con 2.2  $\mu\text{M}$  de BA fue el que favoreció la mayor cantidad embriones en etapa globular, escutelar y coleoptilar (Cuadro 10).

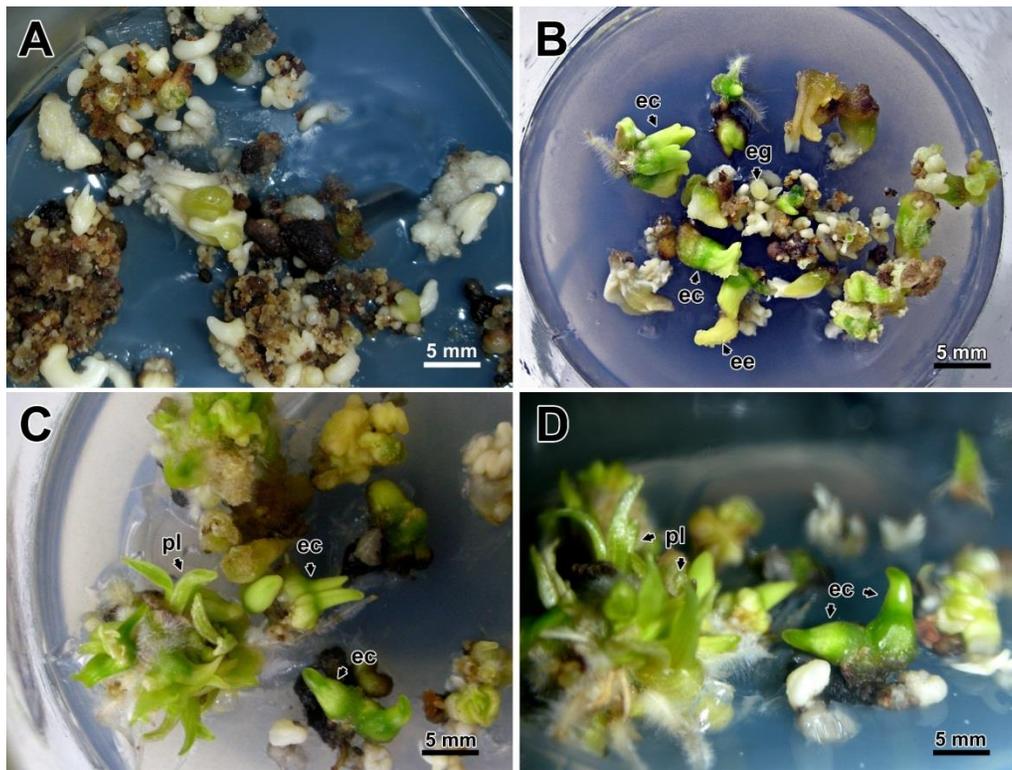
**Cuadro 10. Efecto del tipo y concentración de ácido abscísico (ABA) y bencil adenina (BA) en el incremento de callos embriogénicos y número de embriones (globulares, escutelares y coleoptilares) en *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) durante ocho semanas.**

Fitohormona	$\mu\text{M}$	Callo fresco <sup>†</sup> (g)	Embriones (Núm.) <sup>†</sup>		
			Globular	Escutelar	Coleoptilar
Sin hormona	0	4.9 a	4.5 b	7.0 d	0.0 d
ABA	1.9	2.1 cd	7.1 b	5.0 e	2.1 cd
	3.8	1.6 de	5.7 b	4.0 e	1.0 cd
	7.6	0.9 e	3.9 b	4.0 e	0.0 d
BA	2.2	3.6 b	11.8 a	15.0 a	12.5 a
	4.4	2.8 bc	7.0 b	11.0 b	6.9 b
	8.8	2.1 cd	5.9 b	9.0 c	4.1 bc
<b>DMS</b>		1.0	4.5	1.9	3.2

<sup>†</sup>Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

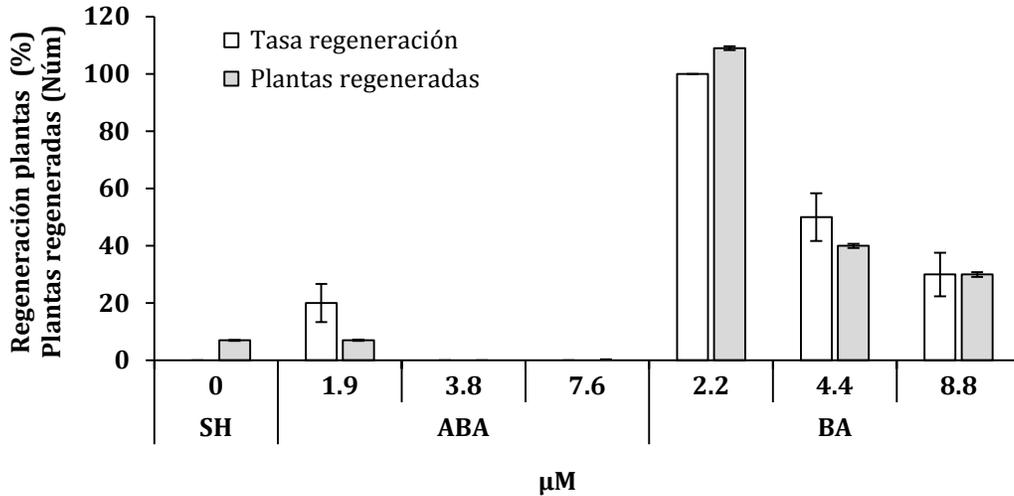
Los callos cultivados en medio MS (1962) sin hormonas continuaron creciendo y la cantidad producida superó todos los demás tratamientos con ABA y BA a las ocho semanas. Sin embargo, los callos mostraron secciones ennegrecidas en la periferia que posteriormente frenaron la formación de más embriones (Figura 24A). Con las dosis de ABA, los callos embriogénicos cesaron su división y crecimiento y también mostraron cierto grado de ennegrecimiento. En cambio con las dosis de BA, los embriones cambiaron de color blanco a amarillento y verde y diferenciaron mayor número de embriones. La mejor concentración que estimuló la cantidad de

embriones somáticos fue 2.2  $\mu\text{M}$  de BA. De forma general, la cantidad de embriones escutelares aumentó mientras disminuyó la de globulares. También se observó que esta dosis promovió la formación de embriones en estado coleoptilar que se tornaron de color verde y la subsecuente regeneración de plántulas con raíces (Figura 24B-D). Las dosis de 4.4 y 8.8  $\mu\text{M}$  de BA promovieron la regeneración de plantas anormales que mostraron aspecto de arrosetamiento.



**Figura 24.** Etapa de maduración de embriones somáticos de *Heliconia collinsiana* cultivados durante ocho semanas en medio MS (1962). (A) Callos embriogénicos cultivados en medio sin fitohormonas con secciones ennegrecidas. (B) Embriones somáticos globulares en proceso de desarrollo a escutelares y coleoptilares en 2.2  $\mu\text{M}$  de BA. (C, D) Regeneración de plántulas a partir de embriones coleoptilares en medio suplementado con 2.2  $\mu\text{M}$  de BA. eg=embrión globular; ee=embrión escutelar; ec=embrión coleoptilar; pl=plántula.

La regeneración de plántulas sólo pudo observarse en los embriones cultivados con 2.2  $\mu\text{M}$  de BA, donde la totalidad de los cultivos (100%) mostraron en promedio 10.9 plantas regeneradas. En los medios de cultivo sin fitohormonas y con ABA la tasa de regeneración fue nula (Figura 25).



**Figura 25. Tasa de regeneración de plántulas (%) y total de plantas regeneradas (Núm.) en cultivos de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo en medio MS (1962) sin hormonas (SH) y suplementado ácido abscísico (ABA) y benciladenina (BA).**

La etapa de maduración experimentada en los embriones de heliconia es una etapa esencial de la embriogénesis somática, ya que la alta frecuencia de recuperación de plantas se logra a partir de embriones maduros. Con la maduración de los embriones se finaliza la acumulación de carbohidratos, lípidos y proteínas de reservas, reducción en el contenido de agua y declinación gradual o cese del metabolismo. Esta etapa en algunas especies llega a ser limitante porque normalmente los embriones somáticos no maduran correctamente si se comparan con los cigóticos. De hecho, en la mayoría de los casos, sigue ocurriendo el crecimiento rápido, dando lugar a la germinación precoz (Gray, 2005).

Se ha reportado ampliamente que el ABA promueve la maduración de embriones somáticos en varias especies, gracias a que impide la germinación precoz y estimula el desarrollo normal de los embriones suprimiendo la embriogénesis secundaria y pluricotiledonar (Bhojwani y Razdan, 1996). También su uso común se debe a que regula varios procesos durante la embriogénesis y la formación de las semillas, y se sabe que se acumulan en varias otras partes de la planta en respuesta a estreses abióticos tales como sequía, heladas y salinidad. Su contenido endógeno alcanza su punto máximo durante la maduración del embrión y disminuye a niveles bajos en la semilla desecada (Chugh y Khurana, 2002).

En algunas especies, es necesario tratar los cultivos embriogénicos con ABA para estimular la maduración. En general, un tratamiento durante un mes es óptimo, ya que la exposición prolongada puede tener un efecto negativo en el crecimiento de las plantas (Von Arnold *et al.*, 2002). Aunque muchos protocolos utilizan el ABA como la hormona que favorece la maduración de los embriones somáticos, en el presente estudio la respuesta fue superada notablemente por la acción de la BA.

En el caso específico de la BA, su uso en la maduración de los embriones somáticos es menos habitual. En variedades Cavendish de *Musa acuminata* la maduración del embrión se logró con la adición de 0.1  $\mu\text{M}$  de BA en combinación con 0.002  $\mu\text{M}$  de AIA (Youssef *et al.*, 2010). En otras variedades de la misma especie, los mejores resultados de maduración se obtuvieron con 0.22  $\mu\text{M}$  de BA (Jalil *et al.*, 2003). En *Cajanus cajan* los mejores resultados en la maduración de embriones somáticos se consiguieron con 0.22  $\mu\text{M}$  de BA (Aboshama, 2011) y esa misma concentración fue efectiva para embriones de *Castanea sativa* durante ocho semanas (Corredoira *et al.*, 2003). En todos los ejemplos predomina el uso de la bencil adenina en concentraciones bajas y su eficiencia se demostró en los callos de heliconia donde los mejores resultados se obtuvieron con 1.1  $\mu\text{M}$  de BA.

En cuanto al efecto individual de otros tipos de hormonas, la adición de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) al medio de regeneración de pasto bermuda aceleró la germinación y regeneración de los embriones somáticos (Li y Qu, 2002). Por su parte, el etileno, aplicado en forma de etefón, durante la maduración se ha relacionado con un aumento en las anomalías morfológicas en abeto blanco, pero no mostró ningún efecto aparente sobre *Picea sitchensis* (Jiménez, 2005).

También se han estudiado los efectos de varios componentes del medio de cultivo para promover la maduración de los embriones. En particular, en *Picea* y alfalfa se ha tenido éxito notable con altos niveles de sacarosa (9-12%) y polietilenglicol en combinación con aminoácidos, en particular glutamina (Gray, 2005).

### 1.3.5 Alargamiento de plántulas

El análisis estadístico de este experimento reveló que la tasa de regeneración y altura de planta fueron significativamente influenciadas por el porcentaje de las sales minerales totales

adicionadas al medio de cultivo MS (1962) (Apéndice 8). Los mayores valores en la tasa de regeneración (90%) y altura de plantas (5.85 cm) se lograron en el medio de cultivo con 50% de las sales minerales totales. Los bajos valores observados con 75 y 100% de sales minerales se debieron a que las plántulas no prosperaron (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Efecto del porcentaje total de sales del medio de cultivo MS (1962) en la tasa de regeneración y altura de plantas de *Heliconia collinsiana* obtenidas por embriogénesis somática a las ocho semanas de cultivo.**

Sales minerales MS (1962) (%)	Tasa de regeneración <sup>¶</sup> (%)	Altura de planta <sup>¶</sup> (cm)
100	25.0 b	2.90 b
75	51.0 b	3.80 b
50	90.0 a	5.85 a
<b>DMS</b>	27.1	1.9

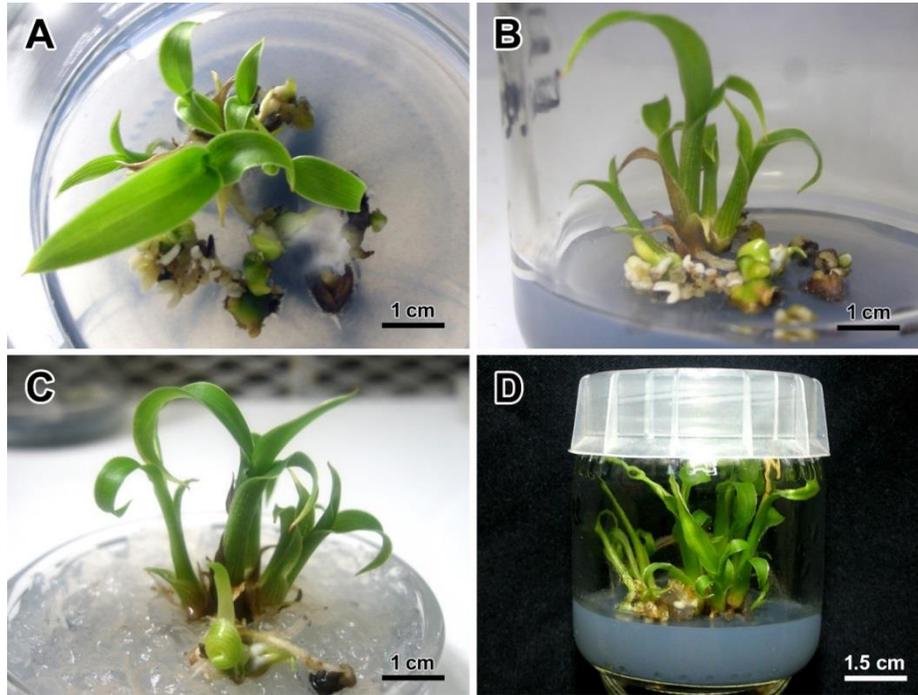
<sup>¶</sup>Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

En las primeras cuatro semanas de cultivo, las plántulas cultivadas con 50% de sales minerales totales mostraron diferencias en altura que variaron desde 1 hasta 5 cm. A las ocho semanas las plantas empezaron a desarrollar su sistema de raíces e incrementaron el número de hojas.

La embriogénesis somática es un proceso complejo en el que la calidad del producto final, es decir, la supervivencia y el crecimiento de las plantas regeneradas, depende de las condiciones brindadas en las fases de maduración y germinación de los embriones somáticos. Por lo tanto, con el fin de desarrollar la propagación masiva de plantas de embriones somáticos, se requiere una disección de los factores críticos que podrían contribuir al rendimiento *ex vitro* de plantas (Von Arnold, 2008).

Normalmente, sólo los embriones maduros con morfología normal, y que han acumulado suficientes sustancias de almacenamiento y adquirido tolerancia a la desecación al final de la maduración, se desarrollan en plantas normales. En el presente estudio la conversión de 90% en plantas indica que las condiciones de cultivo a las que fueron sometidos los embriones somáticos fueron las adecuadas para poder desarrollarse en plantas normales. Aunque en algunas especies de plantas es necesario el uso de auxinas y citocininas para estimular la germinación del embrión, en heliconia se pudo observar que sólo fue necesario el medio MS (1962) a la mitad de concentración de sales sin fitohormonas. En casos más específicos se

puede requerir la inclusión de compuestos adicionales como glutamina y de caseína hidrolizada para lograr la conversión de embriones a plantas (Von Arnold, 2008).



**Figura 26. Alargamiento de plantas de *Heliconia collinsiana* obtenidas mediante embriogénesis somática. (A, B) Apariencia de las plantas de diferente tamaño a las cuatro semanas de cultivo. (C, D) Plantas de mayor tamaño que iniciaron su enraizamiento a las ocho semanas de cultivo.**

Los beneficios de reducir la concentración de sales del medio de cultivo a la mitad sobre la conversión de embriones somáticos se ha reportado en muchas especies. En *Musa* sp, la mayor tasa de regeneración de plantas (70%) se obtuvo con este nivel de sales (Sidha *et al.*, 2007) y en *Litchi chinensis* fue de 46% (Raharjo y Litz, 2007). También en la embriogénesis somática de *Jatropha curcas* los embriones maduros se convirtieron en plántulas cuando se pasaron al medio MS (1962) a la mitad de concentración de sales y se obtuvo 90% de conversión (Jha *et al.*, 2007). Mientras que en los embriones somáticos de variedades de clavel se desarrollaron en plantas a las dos semanas de cultivo con tasa de germinación de 90-95% cuando se transfirieron a medio MS libre de hormonas a la mitad de sales minerales (Karami *et al.*, 2006).

En la presente investigación se logró el establecimiento de un protocolo para la regeneración de *in vitro* de *H. collinsiana* vía embriogénesis somática a partir de secciones transversales de

pseudotallo de la base de plántulas *in vitro*. Éste explante fue el único que mostró capacidad morfogénica para la inducción de callos embriogénicos comparados con brotes y segmentos de hoja, pecíolo y raíz. Si bien el proceso completo desde la inducción de callos hasta la obtención de plantas demanda bastante tiempo (44 semanas aproximadamente), la cantidad de plantas supera notablemente la obtenida mediante organogénesis directa. A partir de 1.0 g de callo embriogénico es posible obtener 131 embriones, pero aplicando de 2 a 3 subcultivos en el mismo medio de cultivo de proliferación es posible duplicar y triplicar esa cantidad. Mediante organogénesis directa es posible obtener como máximo 156 brotes por explante en seis meses (24 semanas) (Hernández, 2008).

Aunque en la literatura existen reportes de intentos fallidos por lograr la embriogénesis somática en estas ornamentales (Ulisses *et al.*, 2007; 2010), los resultados de la presente investigación constituyen el primer reporte científico de la propagación de heliconias mediante embriogénesis somática (Figura 27). Este método de propagación podría probarse, con ciertas modificaciones, para la propagación de genotipos élite de heliconia que son altamente comerciales pero que tienen la desventaja de emitir pocos rebrotes al año (p. e. variedades de *H. caribaea* y *H. vellerigera*). Además, con este método se tiene la ventaja de que puede usarse como sistema de micropropagación en virtud de la estabilidad genética que ofrecen los embriones, ya que son intolerantes a las mutaciones comparados con la organogénesis.

Mediante esta ruta morfogénica de embriogénesis somática se podrá contar con un sistema eficiente para la obtención de gran cantidad de material vegetativo para su trasplante a campo, el cual será de gran ayuda para los productores dedicados a estas ornamentales. Además, se podrá disponer de un sistema de generación de callos que pudieran emplearse para el mejoramiento genético de este grupo de plantas ornamentales a través de ingeniería genética.

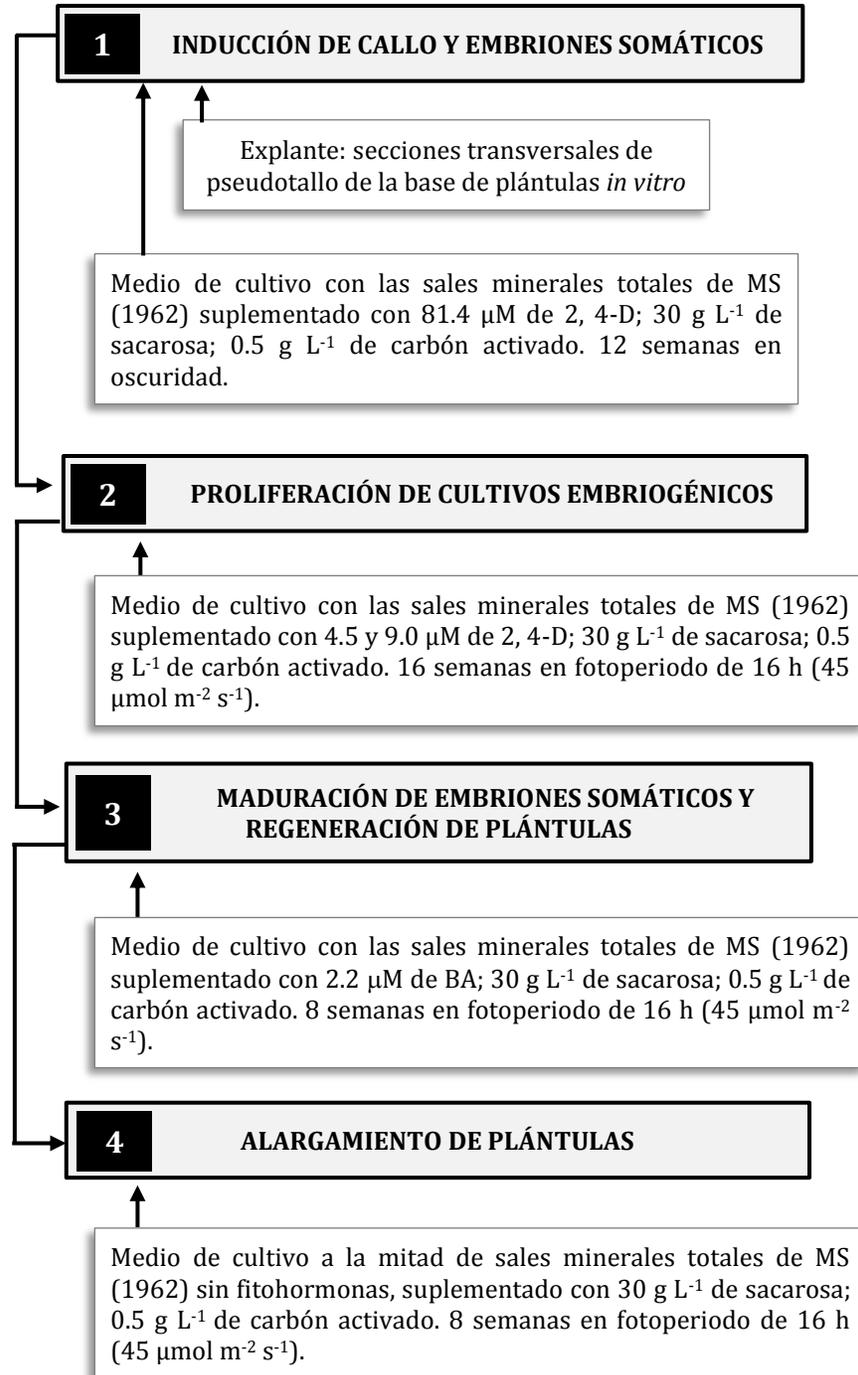


Figura 27. Protocolo para la propagación *in vitro* de *H. collinsiana* vía embriogénesis somática.

## 1.4 Conclusiones

- Las secciones basales de yemas laterales de rizomas *in vivo* y los brotes, segmentos de hoja y pecíolo y ápices de raíz de plántulas *in vitro* no respondieron a los tratamientos de inducción de callos.
- *Heliconia nickeriensis* y la variedad Golde Torch fueron especies que no respondieron a ningún tratamiento de inducción de callos en ninguno de los explantes evaluados.
- Las secciones transversales de pseudotallo de la base de plántulas *in vitro* de *H. collinsiana* fueron los únicos explantes que mostraron capacidad morfogénica para la inducción de callos.
- La mayor tasa de inducción de callo se obtuvo con 81.4  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D seguida de 135.7  $\mu\text{M}$  de picloram a las 12 semanas en condiciones de oscuridad. Los callos obtenidos con 2, 4-D fueron de consistencia compacta mientras que los obtenidos con picloram fueron friables. Cuando estos callos se pasaron a condiciones de fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por dos semanas, los procedentes de 81.4 M de 2, 4-D continuaron su crecimiento en tanto los de 135.7  $\mu\text{M}$  de picloram se ennegrecieron.
- Los explantes constituidos de secciones transversales de pseudotallo de *H. collinsiana* cultivados en condiciones de oscuridad fueron los que mostraron la mayor tasa de inducción de callo (100%) a las 12 semanas de cultivo seguido por la luz azul. En presencia de luz blanca la mayoría de los explantes se ennegrecieron y no superaron el 20% de inducción de callo.
- En la combinación de las concentraciones de sales minerales totales y sacarosa en el medio de cultivo los mejores resultados en la inducción de callo de secciones transversales se obtuvo con 100 y 75% de sales y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa a las 12 semanas de cultivo en condiciones de oscuridad.
- La proliferación de los callos embriogénicos fue mejor con 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D después de 16 semanas de cultivo en fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los callos

cultivados en medio sin fitohormonas se ennegrecieron y no prosperaron. Se comprobó que la presencia de la auxina siguió siendo necesaria para lograr la progresión de la embriogénesis somática.

- Con el análisis histológico, se observaron los primeros embriones en callos conformados por tejido parenquimatoso altamente irrigado por tejido vascular. Estos embriones tenían estructura circular y estaban constituidos por células pequeñas, con núcleos prominentes y citoplasma denso. En los embriones de estado coleoptilar se observó la protodermis y procambium, que posteriormente dio origen al tejido vascular embrionario.
- La maduración de los embriones somáticos se consiguió con 2.2  $\mu\text{M}$  de BA durante ocho semanas donde disminuyó la formación de embriones globulares y aumentó la de escutelares. También promovió la formación de embriones coleoptilares. Los callos embriogénicos cultivados con ABA cesaron su crecimiento a la vez que mostraron ennegrecimiento.
- Durante el alargamiento de las plantas la mayor tasa de conversión de embriones somáticos a plántulas (90%) se obtuvo con la concentración de sales del medio de cultivo MS (1962) al 50% a las ocho semanas de cultivo. En este tiempo las plantas empezaron a desarrollar su sistema radicular y aumentaron el número de hojas.

## 1.5 Literatura citada

- Aboshama, H. M. S. 2011. Somatic embryogenesis proliferation, maturation and germination in *Cajanus cajan*. World Journal of Agricultural Sciences 7: 86-95.
- Ahmed, A.B., A. S. Rao, M. V. Rao, R. M. and Taha. 2011. Effect of picloram, additives and plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyllanthus nodiflorus* (L.) Greene. Braz. Arch. Biol. Technol. 54: 7-
- Atehnkeng, J., N. Adetimirin, and SYC Ng. 2005. Exploring the african cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. African Journal of Biotechnology 5: 1324-1329.
- Balbão, F.S., B. Appezzato-da-Gloria, and R. A. Martinelli. 2001. Morphological variation of somatic embryos obtained from banana inflorescences. Scientia Agricola 58: 711-716.
- Baskaran, P., B. R. Rajeswari, and N. Jayabalan. 2006. Development of an *in vitro* regeneration system in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using root transverse thin cell layers (tTCLs). Turk J. Bot. 30: 1-9.
- Benson, E. E. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. In *Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 36: 141-148.
- Bhojwani, S. S., and M. K. Razdan. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and practice, a Revised Edition. Elsevier Science, The Netherlands. 767 p.
- Bozzola, J. J. and L. D. Russell. 1999. Electron Microscopy: Principles and techniques for biologists. 2nd Ed. Sudbury, MA, USA. Jones & Bartlett Publishers. 670 p.
- Chugh, A., and P. Khurana. 2002. Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances. Curr. Sci. 86: 715-730.
- Colfloras. 2007. Manual técnico para el cultivo de heliconias. Asociación de Floricultores del Centro Occidente Colombiano. Pereira, Colombia. 37 p.
- Corredoira, E., A. Ballester, and A. M. Vieitez. 2003. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. Anal. Bot. 92: 129-136.
- D'Onofrio, C.D., Morini S., and Bellocchi G. 1998. Effect of light quality on somatic embryogenesis in quince leaves. Plant Cell Tissue and Organ Culture 53: 91-98.
- Deo, P. C., A. P. Tyagi, M. Taylor, R. Harding, and D. Becker. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences 28: 27-40.
- Deo, P. C., R. M. Harding, M. Taylor, A. P. Tyagi, and D. K. Becker. 2009. Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration in taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 99: 61-71.
- Divakaran, S. P., and A. S. Nair. 2011. Somatic embryogenesis from bract cultures in diploid *Musa acuminata* cultivars from South India. Scientia Horticulturae 131: 99-102.

- Duquenne, B., T. Eeckhaut, S. Werbrouck and J. V. Huylenbroeck. 2006. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zantedeschia* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 329–331.
- Escalant, J. V., and C. Teisson. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports* 7: 665-668.
- Fehér, A. 2005. Why somatic plant cells start to form embryos? *In: Somatic embryogenesis*. (Ed.) A. Mujib & J. Samaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 85-101.
- Fehér, A., T. P. Pasternak, and D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201–228.
- Filippi, S. B., B. Appezato-da-Gloria, and A. P. M. Rodriguez. 2001. Histological changes in banana explants, cv. Nanicaõ (*Musa* spp., group AAA), submitted to different auxins for induction of somatic embryogenesis. *Rev. Bras. Bot.* 24: 595–602.
- Filonova, L., P. Bozhkov and S. Von Arnold. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51: 249–264.
- Gaj, M. D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul.* 43: 27–47.
- García, Á. L., K. R. Gómez, N. R. Albany, J. A. Vilchez, Y. Alvarado, and M. Reyes. 2007. Influence of illumination conditions on germination of somatic embryos of plantain crop hybrid 'FHIA-21'. *Rev. Fac. Agron.* 24: 679-689.
- George, E. F. 2008. Plant tissue culture procedure – Background. *In: Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (eds.). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background.* Springer, The Netherlands. Pp 1-28.
- Gibson, S. I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 93–102.
- Goh, C., M. J. Nathan, and P. P. Kumar. 1995. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. *Scientia Horticulturae* 62: 113-120.
- Gray, D. J. 2005. Propagation from nonmeristematic tissues: Nonzygotic embryogenesis. *In: Robert N. Trigiano and D. Dennis J. Gray (eds.). Plant Development and Biotechnology.* CRC PRESS LLC. Pp 187-200.
- Hernández, M. E. 2008. Regeneración *in vitro* de *Heliconia* spp vía organogénesis directa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 96 p.
- Jalil, M., N. Khalid, and R. Yasmin. 2003. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 209–214.
- Jha, T. B., P. Mukherjee, and M. M. Datta. 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. – *Plant Biotechnol. Rep.* 1: 135-140, 2007.

- Jimenez, V. M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev. Brasi. de Fisio. Vegl.* 13:196–223.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47: 91–110.
- Jiménez, V. M., and C. Thomas. 2005. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. *In: Plant Cell Monogr.* (Ed.) A. Mujib, J. Samaj: Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 103-118.
- Kackar, A., S. R. Bhat, K. P. S. Chandel, and S. K. Malik. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 289-292.
- Kaldenhoff, R., U. Henningsen, and G. Richter. 1994. Gene activation in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana* during blue-light-dependent plantlet regeneration. *Planta* 195: 182-187.
- Kamle, M., A. Bajpai, R. Chandra, S. Kalim, and R. Kumar. 2011. Somatic embryogenesis for crop improvement. *GERF Bulletin of Biosciences* 2: 54-59.
- Karami, O., A. Deljou, M. Esna-Ashari, and P. Ostad-Ahmadi. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae* 110:340–344.
- Khalil, S. M., and A. A. M. Elbanna. 2004. Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration via suspension cultures of banana (*Musa* spp.). *Arab J. Biotech.* 7: 99-110.
- Khalil, S. M., K. T. Cheah, E. A. Perez, and D. A. Gaskill. 2002. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 20: 1128–1134.
- Kress, W. J., J. Betancur, and B. Echeverry. 1999. *Heliconias: Llamaradas de la selva Colombiana*. Cristina Uribe Editores, Bogotá, Colombia. 191 p.
- KrishnaRaj S., and Vasil I. K. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. *In: T. A. Thorpe (ed). In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 471–540.
- Lakshmanan, P., and A. Taji. 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biol.* 2: 136–148.
- Lazzeri, P.A., D. F. Hildebrand, J. Sunega, E. G. Williams, and G. B. Collins. 1988. Soybean somatic embryogenesis: interactions between sucrose and auxin. *Plant Cell Rep.* 7: 517–520
- Leon, P., and J. Sheen. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 8: 110–116.
- Li, L. and R. Qu. 2002. *In vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. *Plant Breed.* 121: 155–158.
- Lincy, A. K., A. B. Remashree, and B. Sasikumar. 2009. Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Acta Bot. Croat.* 68: 93–103.

- López, C. M. A., Márquez, G. J. y Murguía, S. G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2 ed. 177 p.
- Mahanom, J., K. Norzulaani, and Y. O. Rofina. 2003. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 209–214.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-493.
- Namasivayam, P. 2007. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 1–8.
- Nathan, M. J., P. P. Kumar, and C. Goh. 1993. High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum* L.f. *Plant Science*, 90: 63-71.
- Nhut, D. T., B. V. Le, and T. T. Van. 2000. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice using thin cell layer culture of apical meristemic tissues. *J. Plant Physiol.* 157: 559–565.
- Nomura, K., and A. Komamine. 1985. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988–991.
- Pan, M.J. and Van Staden, J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture—a review. *Plant Growth Regul.* 26: 155–163.
- Park, S., J. Ahn, W. Lee, H. N. Murthy, and K. Paek. 2005. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Science* 168: 1221–1225.
- Raharjo, S. H., and R. E. Litz, 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from leaves of mature phase trees. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 89: 113–119.
- Rose, R. J., F.R. Mantiri, S. Kurdyukov, S. K. Chen, X-D. Wang, K.E. Nolan, and M. B. Sheahan. 2010. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: E.C. Pua and M.R. Davey (eds.), *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives: Vol. 2*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. pp 3-26.
- Samaj, J., F. Baluska, A. Pretová, and D. Volkmann, D. 2003. Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeletal arrays. *Plant Cell Rep* 21:940–945.
- Santos, M. O., E. V. Barros, M. L. Tinoco, A. C. Brasileiro, and F. J. Aragao. 2002. Repetitive somatic embryogenesis in cacao and optimisation of gene expression by particle bombardment. *J. Plant Biotech.* 4: 71–76.
- SAS Institute. 2003. *SAS/STAT User's Guide*. (Release 9.1). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Scherwinski-Pereira, J. D., R. S. Guedes, P. C. Fermino, T. L. Silva, and Costa, F. H. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 46: 378–385.

- Sidha, M., P. Suprasanna, V.A. Bapat, U.G. Kulkarni, and B.N. Shinde. 2007. Developing somatic embryogenic culture system and plant regeneration in banana. Bhabha At. Res. Centre (BARC) Newslett. 285:153–161.
- Smitha, P.D., and N. S. Ashalatha. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid banana cultivars (*Musa acuminata* cv. Chingan and *Musa acuminata* cv. njalipoovan) from Kerala. Indian Journal of Plant Genetic Resources 23: 69-72.
- Stasolla, C., Bozhkov, P.V., Chu, T.M., Van Zyl, L., Egertsdotter, U. and Suarez, M.F. 2004. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. Tree Physiol 24: 1073–1085.
- Strosse, H., H. Schoofs, B. Panis, E. Andre, K. Reyniers, and R. Swennen. 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). Plant Science 170: 104–112.
- Teixeira da Silva, J. A., and S. Fukai. 2003. Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control. Asian Journal Plant Sci 2: 505-514.
- Teixeira da Silva, J. A., K. Tran Thanh Van, S. Biondi, D. T. Nhut, and M. M. Altamura. 2007. Thin cell layers: developmental building blocks in ornamental biotechnology. Floricult. Ornam. Biotechnol. 1: 1–13.
- Teixeira da Silva, J.A. 2003. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal Biotech 2: 683–91.
- Thomas, C., and V. M. Jiménez. 2005. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: Plant Cell Monogr. (Ed.) A. Mujib, J. Samaj: Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 157-175.
- Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnol Adv. 26: 618–631.
- Tran Thanh Van, K. 1980. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. Intl. Rev. Cytol. 32:291-311.
- Ulisses, C., T. Camara, L. Willadino, and C. Albuquerque. 2007. Induction of somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy pink and cv. Sexy scarlet from sections of ovaries. Revista Brasileira de Ciências Agrárias 2: 281-284.
- Ulisses, C., T. Rangel C., L. Willadino, C. C. Albuquerque, and J. Z. Brito. 2010. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section Explants. Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 11-18.
- Van Le, B., N. T. Hang Phuong, L.T. Anh Hong, and K. Tran Thanh Van. 1999. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (orchidaceae) using thin cell layers. Plant Growth Regulation 28: 179–185.
- White, P. R. 1963. The cultivation of plant and animal cells. 2nd ed. Ronald Press, New York.
- Von Arnold, S. 2008. Somatic embryogenesis. In: Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (eds.). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. Springer, The Netherlands. Pp 335-354.

Von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, and L. Filanova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.

Youssef, M., A. James, A. Mayo-Mosqueda, J. R. Ku-Cauich, R. Grijalva-Arango, and R. Escobedo-GM. 2010. Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology* 9: 2216-2223.

## **CAPÍTULO II.**

### **ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Heliconia* spp OBTENIDAS POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA A CONDICIONES DE INVERNADERO**

## CAPÍTULO II. ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Heliconia* spp OBTENIDAS POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA A CONDICIONES DE INVERNADERO

### 2.1 Introducción

La micropropagación se ha convertido en una técnica común dentro del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Muchos grupos de plantas se han propagado mediante esta técnica, incluidas las plantas ornamentales. Sin duda, la industria ornamental es la que más se ha beneficiado con esta forma de propagación porque permite obtener, a escala comercial, gran cantidad de plantas, genéticamente uniformes y libres enfermedades y virus (Rout *et al.*, 2006). Sin embargo, la etapa de aclimatación de las plantas regeneradas durante la micropropagación siempre se convierte en una limitante en el éxito de este tipo de sistemas de propagación porque existen grandes diferencias en las condiciones ambientales en los cultivos *in vitro* donde crecen las plantas y las existentes en los invernaderos, cámaras de crecimiento o el campo (Chandra *et al.*, 2010). Como consecuencia de esto, las plantas regeneradas normalmente sufren de estrés después del trasplante al invernadero y se pueden registrar pérdidas de entre el 40 al 100% si no se toman en cuenta algunas consideraciones fisiológicas de las plantas, o bien, si las plantas no son sometidas a un proceso adecuado de aclimatación (George y Debergh, 2008).

En general, un procedimiento de aclimatación eficiente debe proporcionar a las plantas las condiciones óptimas para la adaptación gradual al ambiente externo y garantizar un elevado porcentaje de supervivencia (Hazarika, 2006).

Los fundamentos y condiciones de cultivo para la regeneración de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' vía organogénesis directa fueron establecidas en estudios previos (Hernández, 2008). Sin embargo, para completar este protocolo de micropropagación y extrapolarlo a las plántulas obtenidas vía embriogénesis somática en este estudio, se consideró necesario estudiar algunos aspectos fisiológicos y morfológicos de los materiales producidos bajo condiciones *in vitro* y los factores que controlan la aclimatación de las plántulas, y con ello desarrollar un método de manejo que asegure la supervivencia de las plantas regeneradas. Con base en estos antecedentes, la presente investigación tuvo como objetivos 1) Estudiar el efecto del tipo de sustrato en combinación con la dosis de fertilización en plántulas producidas *in vitro*

de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante la etapa de aclimatación y cultivo en condiciones de invernadero y 2) Evaluar la respuesta fisiológica de los estomas a la aplicación exógena de ácido abscísico en hojas de plántulas micropropagadas (mantenidas en medio de cultivo para enraizamiento) y hojas de plantas de 75 días de haber sido trasplantadas.

## 2.2 Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en los Laboratorios de: Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Genética; Histopatología Vegetal del Postgrado en Fitosanidad – Fitopatología; Morfología de Insectos del Postgrado en Fitosanidad – Entomología y Acarología y en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

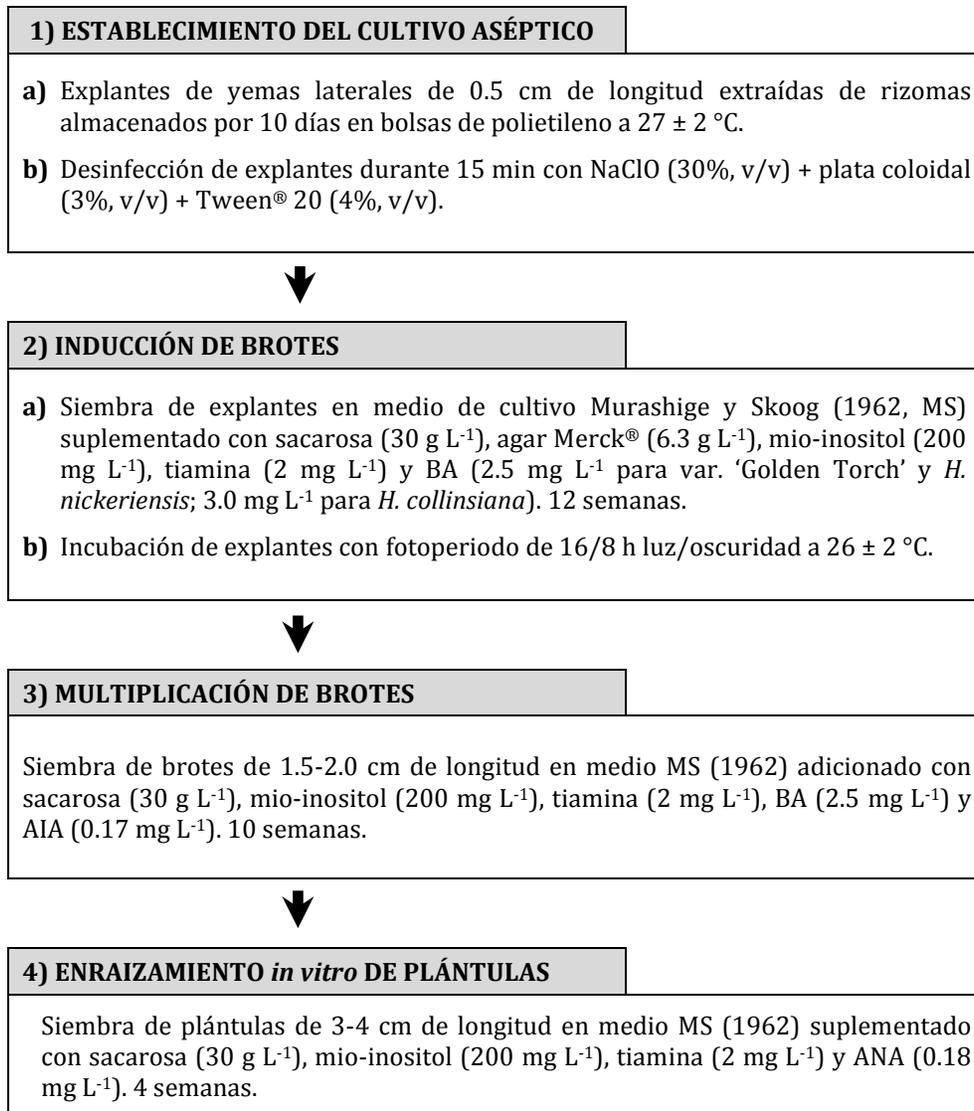
### 2.2.1 Material vegetal y obtención de plántulas *in vitro*

Se utilizaron plantas de *H. collinsiana* Griggs, *H. nickeriensis* Mass & Rooij y *H. psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta var. 'Golden Torch' que se colectaron en campo y que fueron proporcionadas por la finca las Abejas en Tacotalpa, Tabasco. Las plántulas de las tres especies de heliconia que se usaron para evaluar su aclimatación a condiciones de invernadero se obtuvieron mediante organogénesis directa siguiendo la metodología desarrollada por Hernández (2008) (Figura 28).

### 2.2.2 Aclimatación de plántulas

#### 2.2.2.1 Transferencia, acondicionamiento y establecimiento *ex vitro* de plántulas

Se seleccionaron plántulas enraizadas de tres las especies de heliconia, con altura promedio de 7 cm, para evaluar la supervivencia en condiciones *ex vitro*. Las plántulas se extrajeron de los frascos y las raíces se lavaron con agua destilada esterilizada para retirar residuos de medio de cultivo. Las plántulas se trasplantaron a vasos de poliestireno de 175 mL de capacidad. Para evaluar la supervivencia de las plántulas se probaron tres tipos de sustratos artificiales constituidos por turba (100%), perlita (100%) y la mezcla turba/perlita (proporción 1:1) en combinación con tres concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) aplicadas en el agua de riego (0, 50 y 100%).



**Figura 28. Protocolo de regeneración *in vitro* de *H. collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* var. 'Golden Torch' vía organogénesis directa (Hernández, 2008).**

Una vez trasplantadas las plántulas al tratamiento correspondiente, se pusieron dentro de un vaso de polietileno transparente (14 x 9 cm alto/diámetro) con perforaciones, para favorecer la circulación de aire, y se cubrieron con otro vaso transparente (5 x 9 cm alto/diámetro). La unión entre los vasos se selló con parafilm® (Figura 29). Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento (Environmental chamber, Lab-Line Instruments®) a  $25 \pm 2$  °C con fotoperiodo de 12 h ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 60% de humedad relativa para su aclimatación y se fertilizó con la solución nutritiva correspondiente cada cinco días. Las plantas se sacaron de sus envases a los 20, 40 y 60 días después del trasplante (ddt) y se mantuvieron en la cámara de crecimiento

durante dos semanas más recibiendo la fertilización aplicando riegos con la solución nutritiva respectiva cada dos días.



**Figura 29.** Traslante *ex vitro* de plántulas de tres especies de *Heliconia*, regeneradas por organogénesis directa *in vitro* para su establecimiento a sustrato y aclimatación.

### **2.2.2.2 Variables evaluadas y análisis estadístico**

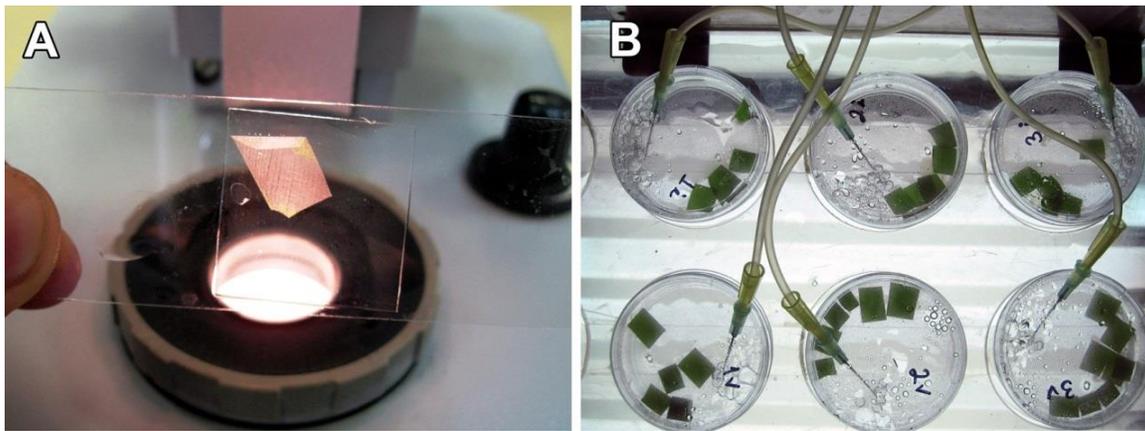
A los 35, 55 y 75 ddt se contabilizó la tasa de supervivencia (%), número de hojas, altura de planta (cm) y diámetro de la base del pseudotallo (cm). Los datos obtenidos de cada variable se analizaron con un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $3 \times 3 = 9$  tratamientos totales para cada especie. Cada tratamiento estuvo representado por 20 repeticiones y la unidad experimental fue una planta. El análisis de varianza se llevó a cabo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### **2.2.3 Análisis histológico de hojas**

Para evaluar el grosor de la cutícula de hojas de plántulas *in vitro* se tomaron muestras de las regiones basal, media y apical para hacer cortes en parafina. También se tomaron muestras de hojas de plantas aclimatadas. Las muestras se procesaron siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo I, apartado 1.2.6.

## 2.2.4 Fisiología estomática de plántulas *in vitro* y *ex vitro*

Para detallar la morfología estomática se montaron tiras de epidermis de hojas de plántulas de *H. collinsiana* mantenidas en medio de cultivo para enraizamiento *in vitro* y de plantas aclimatadas. Las tiras se extrajeron de la superficie abaxial jalando cuidadosamente en ángulo recto. Se midió el tamaño de los estomas ( $\mu\text{m}$ ), frecuencia (número de estomas  $\text{mm}^{-2}$ ) y apertura ( $\mu\text{m}$ ) de estomas con un microscopio óptico (Carl Zeiss®). Las observaciones se hicieron con el objetivo de 40X y los valores analizados fueron los promedios de 100 repeticiones en cada condición (Figura 30).



**Figura 30. Tiras de epidermis de superficie abaxial empleadas en la descripción de la morfología (A) y fisiología estomática (B) de *Heliconia collinsiana*.**

La respuesta fisiológica de los estomas a factores externos se llevó a cabo por medio de la aplicación exógena de varias concentraciones de ácido abscísico (ABA). Se utilizaron tiras de epidermis de hojas de plántulas de *H. collinsiana* mantenidas en medio de cultivo para enraizamiento *in vitro* y de plantas de 75 días de aclimatadas. Las tiras se incubaron en buffer MES (ácido 2-N-morfolino etano sulfónico) 10 mM con 50 mM de KCl y pH 6.15 (ajustado con KOH). Se incubaron durante 3 h a 25 °C en una corriente de aire libre de  $\text{CO}_2$  e intensidad luminosa de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 30B). Las concentraciones de ABA probadas fueron 0.001, 0.01 y 0.1 mM y las soluciones finales de los tratamientos se prepararon con la solución MES-KCl. Las observaciones se hicieron en un microscopio óptico (Carl Zeiss®) con el objetivo de 40X y los valores analizados fueron los promedios de 100 repeticiones por tratamiento y condición.

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Supervivencia de plántulas

El ANOVA de los datos obtenidos del experimento reveló que el sustrato, la concentración de solución Steiner en el riego y la interacción tuvieron efectos significativos en la tasa de supervivencia de plántulas a los 55 y 75 días después del trasplante en cada especie de heliconia. Sin embargo, el sustrato fue el factor que más efecto produjo con 50.7% promedio de la variación total (Apéndice 9). Las plantas de 35 ddt de cada especie no sobrevivieron en ninguno de los sustratos y concentraciones de la solución nutritiva evaluados.

Las plantas mostraron los porcentajes de supervivencia más altos cuando se trasplantaron en la mezcla de turba/perlita a los 75 ddt. En *H. collinsiana* sobrevivieron el 60% de las plantas, lo que representó el doble del porcentaje logrado en turba y el triple al obtenido en perlita. En plantas de *H. nickeriensis* se obtuvo 63.3% de supervivencia, que se tradujo en 2.3 y 2.7 veces los porcentajes alcanzados en turba y perlita, respectivamente. En la variedad Golden Torch, el porcentaje de supervivencia de plantas conseguido (65.0%) significó 2.0 y 2.6 veces la respuesta en turba y perlita, respectivamente (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Porcentajes de supervivencia de plantas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos y concentraciones de solución nutritiva de Steiner (1961) a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).**

	<i>H. collinsiana</i> <sup>†</sup>		<i>H. nickeriensis</i> <sup>†</sup>		Golden Torch <sup>†</sup>	
	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt
<b>Sustrato</b>						
Turba	21.7 b	28.3 b	23.3 b	26.7 b	26.7 b	31.7 b
Perlita	11.7 b	18.3 b	16.7 b	23.3 b	20.0 b	25.0 b
Turba/perlita	46.7 a	60.0 a	51.7 a	63.3 a	55.0 a	65.0 a
<b>Solución Steiner (%)</b>						
0	16.7 b	18.3 b	18.3 b	20.0 b	25.0 a	25.0 b
50	43.3 a	58.3 a	43.3 a	58.3 a	43.3 a	60.0 a
100	20.0 b	30.0 b	30.0 ab	35.0 b	33.3 a	36.7 b
<b>DMS</b>	17.2	17.7	18.5	18.3	19.5	18.9

<sup>†</sup>Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

En cuanto a los niveles de solución nutritiva evaluados, las plantas de las tres especies de heliconia alcanzaron los mejores porcentajes de supervivencia cuando el agua de riego contenía 50% de la solución Steiner (1961) a los 75 ddt. Así, en *H. collinsiana* y *H. nickeriensis* sobrevivieron 58.3% de las plantas, mientras en la variedad Golden Torch 60% (Cuadro 11).

En la interacción sustrato con la concentración de la solución nutritiva se observó que la mezcla de turba/perlita con 50% de la solución Steiner (1961) fue la combinación óptima que favoreció la supervivencia de las plantas en las tres especies de heliconia. Aunque las tendencias en los resultados fueron consistentes tanto a los 55 como a los 75 ddt, la totalidad de las plantas de las tres especies sobrevivieron después de 75 días del trasplante (Figura 31).

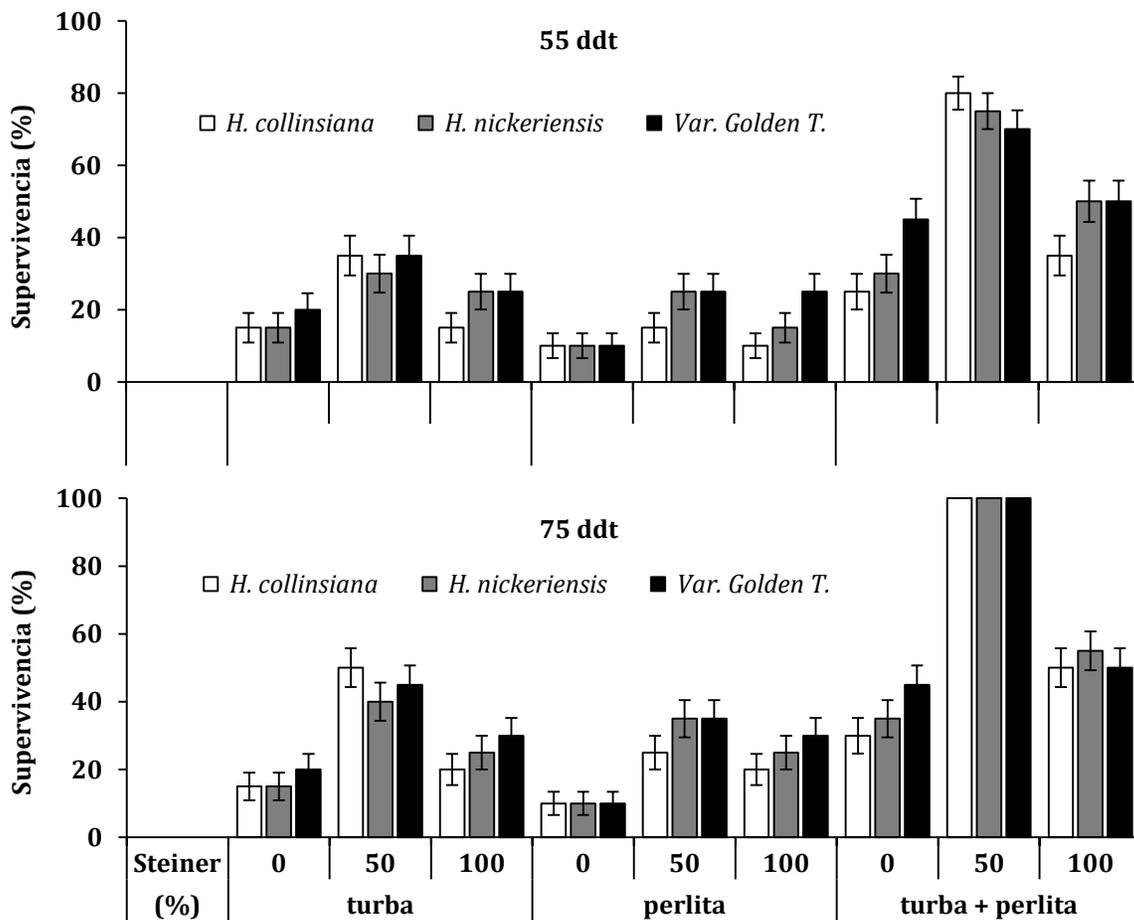


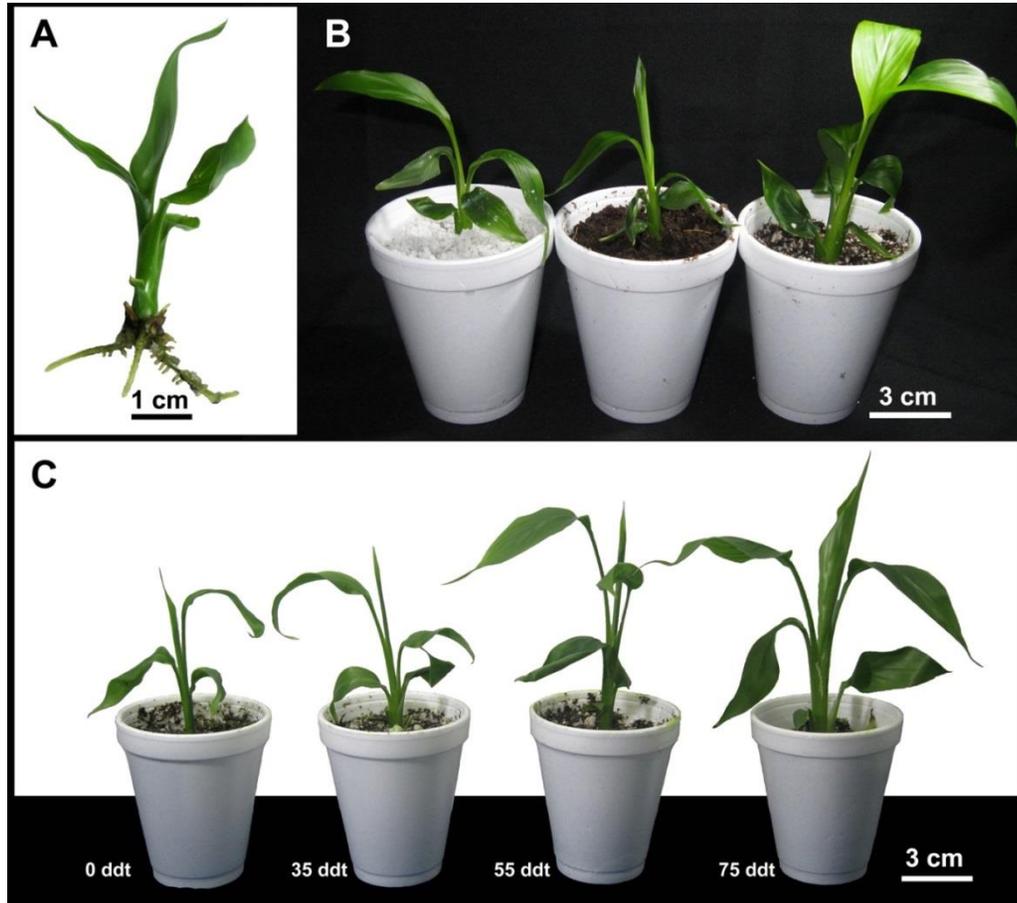
Figura 31. Efecto del sustrato y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) en la supervivencia (%) de plantas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).

El 100% de aclimatación en las tres especies de heliconia a los 75 ddt no es un modelo que se cumpla en todas las especies propagadas mediante cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Lo ideal en los procesos de aclimatación es alcanzar la supervivencia de la totalidad de las plantas pero no siempre es factible debido a que no todas las especies responden de forma similar y a que se presentan diferencias abismales al pasar de condiciones *in vitro* a invernadero. Por ello, el objetivo principal de un proceso de aclimatación es reducir al mínimo el porcentaje de pérdidas (Preece y Sutter, 1993).

Como lo revelaron los análisis estadísticos, el sustrato jugó un papel clave en la aclimatación de las tres especies de heliconia evaluadas. Aunque la turba, producto de la descomposición lenta de musgos *Sphagnum* spp, en la actualidad es uno de los principales materiales usados como sustratos de cultivos en muchos países, debido a su fácil disponibilidad y excelentes propiedades, los mejores resultados se obtienen cuando se combina con otros materiales (Maher *et al.*, 2008). En la presente investigación, la respuesta conseguida con la turba fue superior a la perlita pero superada por la mezcla de ambos.

Por su parte la perlita de forma individual fue escasamente efectiva en la aclimatación. A pesar de ser un vidrio volcánico amorfo capaz de retener altas cantidades de agua y que se expande mucho mediante deshidratación, su estructura granulada de muy baja densidad aparente es un inconveniente que dificulta el establecimiento de plántulas en algunas especies (Abad *et al.*, 2004; Moreno, 2004). En la aclimatación de las tres especies de heliconia esta fue la razón por la que los porcentajes de supervivencia no superaron 25%.

En cambio, la mezcla de turba y perlita fue muy eficiente en la aclimatación en las tres especies de heliconia (Figura 32). Dicha respuesta es resultado de la unión de ambos materiales que mejora notablemente las propiedades físicas del sustrato. De esta manera, la mezcla proporciona alta porosidad, buena aireación, alta capacidad de retención de agua, bajo pH, nutrientes, sanidad, ligereza y estabilidad (Maher *et al.*, 2008). Además, la perlita tiene la característica de actuar como un medio de anclaje de las raíces y como reservorio de la solución nutritiva (Adams, 2004). La mezcla de turba y perlita o vermiculita es de las más usadas en la horticultura en virtud de que favorece el enraizamiento de las plantas y esquejes/estacas y facilita a las nuevas raíces la absorción de nutrientes, ya sea por flujo de masa o por difusión y también por el crecimiento de la raíz (Benton, 2005).



**Figura 32.** Aclimatación de plantas de heliconias obtenidas vía organogénesis directa en diferentes sustratos. (A) Plántula enraizada de *H. nickeriensis* previo al trasplante. (B) Plántulas de variedad Golden Torch recién trasplantadas en perlita, turba y turba/perlita. (C) Plantas aclimatadas de *H. collinsiana* en mezcla turba/perlita en diferentes periodos de trasplante. Nota: La imagen de la planta de 35 ddt se tomó al tercer día de retirada la cubierta protectora.

Las raíces de las plantas propagadas *in vitro* se caracterizan por ser muy delgadas, carecen de pelos radicales y presentan sistema vascular subdesarrollado, lo que provoca que mueran después del trasplante (Hazarika, 2006). Durante la aclimatación se forman nuevas raíces laterales y adventicias que promoverán el crecimiento vigoroso las plantas (Preece y Sutter, 1993). Por estas razones se requiere un sustrato que ocasione la menor perturbación a las raíces, que sea de textura fina, con estructura estable y fluida, que mantenga la humedad constantemente y con bajo nivel de salinidad. Estas características las brindó la mezcla de turba y perlita.

Respecto a la solución nutritiva empleada, los efectos producidos sobre la aclimatación fueron menos remarcados que los del sustrato. La mejor respuesta obtenida con 50% de la solución nutritiva Steiner (1961) tiene su explicación con la etapa fisiológica de las plantas. Para la aplicación precisa de nutrientes es importante desarrollar soluciones nutritivas estándares de acuerdo a las condiciones específicas de cultivo. Dichas condiciones se refieren principalmente a las condiciones climáticas, los patrones de riego y las etapas de desarrollo del cultivo. Con las etapas de desarrollo, el cambio de la fase vegetativa a reproductiva es crucial. Por lo general en la fase reproductiva se incrementa la absorción en de K y Ca, debido a que es mayor la demanda en los órganos reproductivos, como flores y frutos, que en los vegetativos (hojas) (Sonneveld y Voogt, 2009). En el caso de la aclimatación de las heliconias la dosis de 50% cubrió óptimamente los requerimientos de las plantas, lo que resultó en la activación y acumulación de crecimiento vegetativo.

Aunque en las tres especies de heliconia los mejores resultados se alcanzaron invariablemente con la solución Steiner (1961) a mitad de concentración, hay que tomar en cuenta que no existen formulaciones ideales. Si bien con frecuencia se cuestiona sobre la formulación óptima para diversos cultivos, ninguna llega a ser perfecta y no pueden serlo, puesto que la ideal depende de muchas variables que a veces son difíciles de controlar. Las principales son la especie y variedad, estado de desarrollo de la planta, la parte de la planta que se desea cosechar, la estación del año, la duración del día, las condiciones climáticas y la intensidad luminosa (Resh, 2006).

### **2.3.2 Número de hojas**

El análisis estadístico de esta variable experimental indicó que el sustrato y la interacción con la concentración en el riego de la solución Steiner (1961) fueron los factores que afectaron significativamente el número de hojas en las tres especies de heliconia a los 55 y 75 ddt. El nivel de solución nutritiva empleado en el agua de riego no tuvo efectos significativos en esta variable. De forma general, nuevamente, el sustrato fue el factor que más efecto produjo con 60.8% promedio de la variación total (Apéndice 10).

Las plantas de las tres especies produjeron la mayor cantidad de hojas cuando se plantaron en la mezcla de turba/perlita a los 75 ddt. Las plantas de *H. collinsiana* generaron 6.3 hojas, más

del doble de las generadas en turba y perlita. En plantas de *H. nickeriensis* se produjeron 4.3 hojas, que significaron el doble y 1.4 veces más a las emitidas en perlita y turba, respectivamente. En la variedad Golden Torch, las plantas produjeron 5.1 hojas, que se tradujo en 1.5 y 2.4 veces superior a la respuesta conseguida en turba y perlita, respectivamente (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Número de hojas de plantas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).**

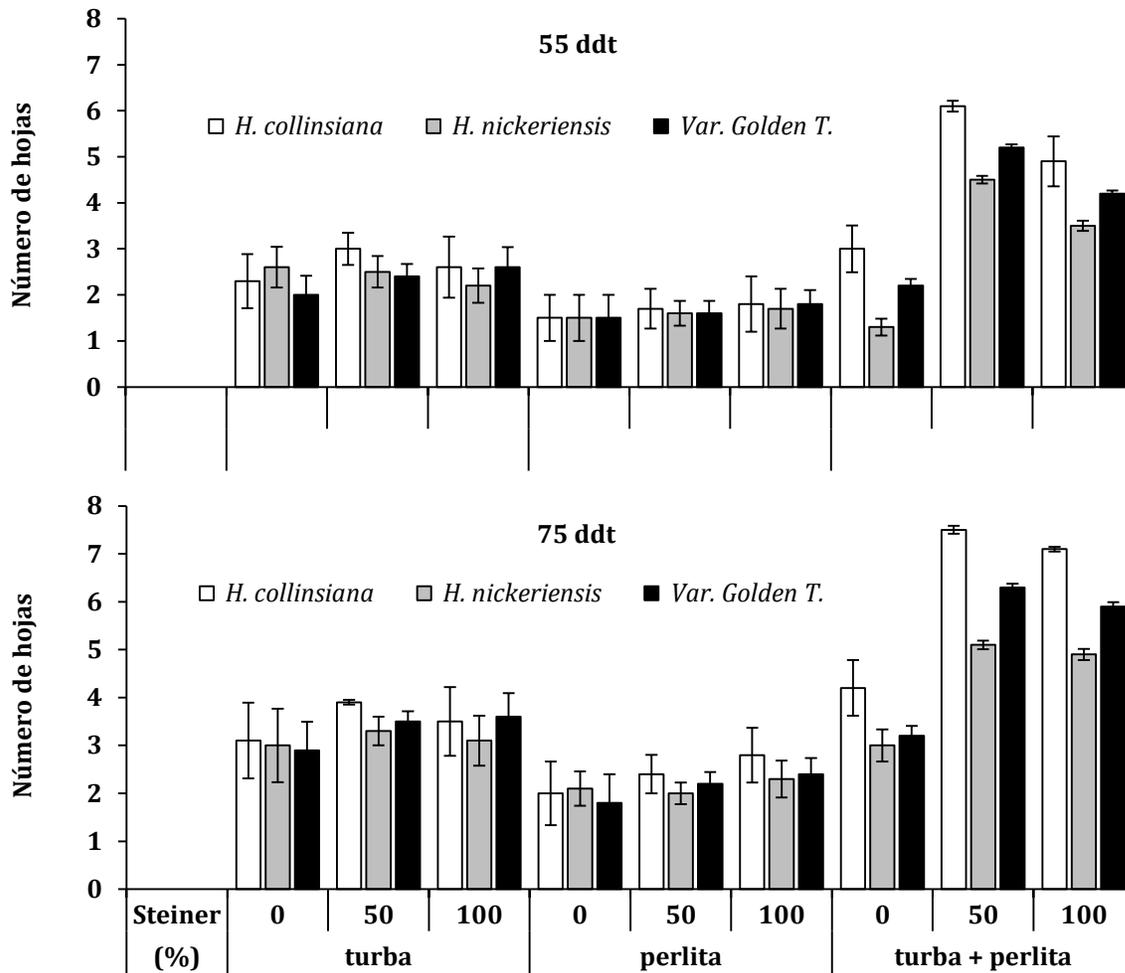
Sustrato	<i>H. collinsiana</i> <sup>¶</sup>		<i>H. nickeriensis</i> <sup>¶</sup>		Golden Torch <sup>¶</sup>	
	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt
Turba	2.6 b	3.5 b	2.4 ab	3.1 ab	2.3 b	3.3 b
Perlita	1.7 b	2.4 b	1.6 b	2.1 b	1.6 b	2.1 b
Turba/perlita	4.7 a	6.3 a	3.1 a	4.3 a	3.9 a	5.1 a
DMS	1.9	2.0	1.3	1.5	1.2	1.4

<sup>¶</sup>Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

La interacción del tipo de sustrato con la concentración de la solución nutritiva reveló, de forma similar a la tasa de supervivencia, que la mezcla de turba/perlita con 50% de la solución Steiner (1961) fue la combinación óptima que promovió el número de hojas en las plantas de las tres especies de heliconia. La respuesta mostró la misma tendencia a los 55 y 75 ddt, pero los mayores valores en las tres especies se alcanzaron después de 75 días del trasplante. Con estas combinaciones, las plantas de *H. collinsiana* produjeron 7.5 hojas, las de *H. nickeriensis* 5.1 y las de la variedad Golden Torch 6.3 (Figura 33).

Un aspecto notable durante la aclimatación de las tres especies de heliconia fue la senescencia de las hojas basales. Independientemente del tipo de sustrato y condición de riego con solución nutritiva, las hojas basales desde la primera semana de trasplantes se empezaron a tornar amarillentas hasta volverse senescentes al término de uno o dos meses (Figura 34). Esta respuesta se debe a que muy probablemente hubo removilización de nutrimentos de las hojas viejas a las nuevas y por ello se tornaron de ese color. Además, las hojas formadas *in vitro* por lo regular tienen capas de células en empalizada pobremente desarrolladas con una gran cantidad de espacio de aire en el mesófilo comparada con una hoja normal (Chandra *et al.*, 2010). Además, las hojas *in vitro* tienen escaso contenido de clorofila que imposibilita la fotosíntesis. En cambio, las hojas nuevas que se desarrollan durante la aclimatación, pero cuyos primordios

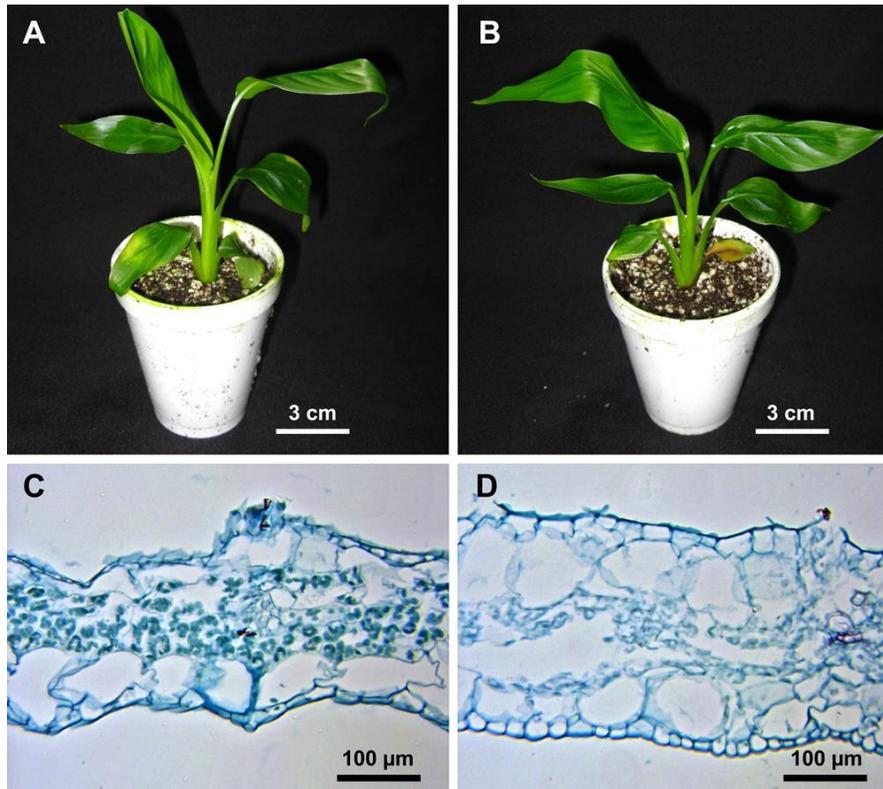
se formaron en condiciones *in vitro*, alcanzan características intermedias a las hojas normales. Únicamente, las nuevas hojas que se generan después de haberlas extraído de las condiciones *in vitro* son las que llegarán a ser completamente funcionales como cualquier hoja normal (Hazarika, 2006).



**Figura 33. Efecto del sustrato y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) en el número de hojas de plantas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante.**

Las hojas de las plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio de enraizamiento *in vitro* promediaron 19  $\mu\text{m}$  de grosor mientras que las de plantas aclimatadas por 75 días en mezcla de turba y perlita y fertilizadas con 50% de solución nutritiva Steiner (1961) fueron de 27  $\mu\text{m}$ . Los valores indican que las hojas de plántulas *in vitro* son 28% más delgadas que las de plantas aclimatadas (Figura 34C-D). Normalmente estos cambios en el grosor de la hoja se observan en

la mayoría de las especies que pasan de condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Durante el proceso de aclimatación en el mesófilo de la hoja se produce la diferenciación del parénquima en empalizada y esponjoso, lo que explica el incremento en grosor (Pospisilova *et al.*, 1999). Además, también se incrementa la cantidad de cera cuticular que se relaciona directamente con la tasa de supervivencia de las plantas (Preece y Sutter, 1993).



**Figura 34.** Amarillamiento y necrosis de hojas basales en plantas aclimatadas de *Heliconia* plantadas en mezcla de turba y perlita a los 75 días después del trasplante. (A) *Heliconia nickeriensis*, (B) *H. collinsiana*.

### 2.3.3 Diámetro de la base del pseudotallo

El ANOVA practicado a esta variable experimental reveló que el sustrato, concentración de solución Steiner (1961) en el riego y la interacción tuvieron efectos significativos en el diámetro de la base del pseudotallo a los 55 y 75 días después del trasplante en las tres especies de *Heliconia*. Consistentemente con las tres variables anteriores, el sustrato fue el factor que más influencia tuvo con 59.3% promedio de la variación total (Apéndice 11).

Las plantas de las tres especies de heliconia mostraron mayor diámetro de la base del pseudotallo en la mezcla de turba/perlita a los 75 ddt. En *H. collinsiana* las plantas promediaron 0.84 cm de diámetro, resultaron plantas 40% más gruesas que las plantadas en turba. Las plantas de *H. nickeriensis* alcanzaron 0.63 cm de diámetro y superaron en 30% la respuesta obtenida en turba. En la variedad Golden Torch el diámetro promedio fue de 0.68 cm, 36% superior al logrado en turba. En las tres especies la perlita fue el sustrato donde el diámetro del pseudotallo fue 4.3 veces menor a los alcanzado en turba/perlita (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Diámetro de la base del pseudotallo de plantas (cm) de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).**

	<i>H. collinsiana</i>		<i>H. nickeriensis</i>		Golden Torch	
	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt
<b>Sustrato</b>						
Turba	0.41 b	0.57 b	0.33 b	0.47 b	0.35 b	0.50 b
Perlita	0.12 c	0.18 c	0.11 c	0.13 c	0.11 c	0.15 c
Turba/perlita	0.62 a	0.84 a	0.47 a	0.63 a	0.49 a	0.68 a
<b>Solución Steiner (%)</b>						
0	0.24 c	0.35 c	0.20 c	0.28 c	0.20 c	0.29 c
50	0.55 a	0.72 a	0.41 a	0.54 a	0.44 a	0.60 a
100	0.37 b	0.52 b	0.30 b	0.41 b	0.31 b	0.45 b
DMS	0.07	0.11	0.06	0.08	0.07	0.09

‡Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

En la interacción sustrato con la concentración de la solución nutritiva, la mezcla de turba/perlita con 50% de la solución Steiner (1961) fue la combinación óptima que promovió el mayor diámetro de la base del pseudotallo en la base de las tres especies de heliconia. Los valores tuvieron comportamiento similar tanto a los 55 como a los 75 ddt, pero los mayores promedios más altos se alcanzaron después de 75 días del trasplante. Con estas combinaciones el diámetro fue de 1.18 cm en las plantas de *H. collinsiana*, 0.81 cm en las de *H. nickeriensis* y 0.96 cm en las de la variedad Golden Torch (Figura 35).

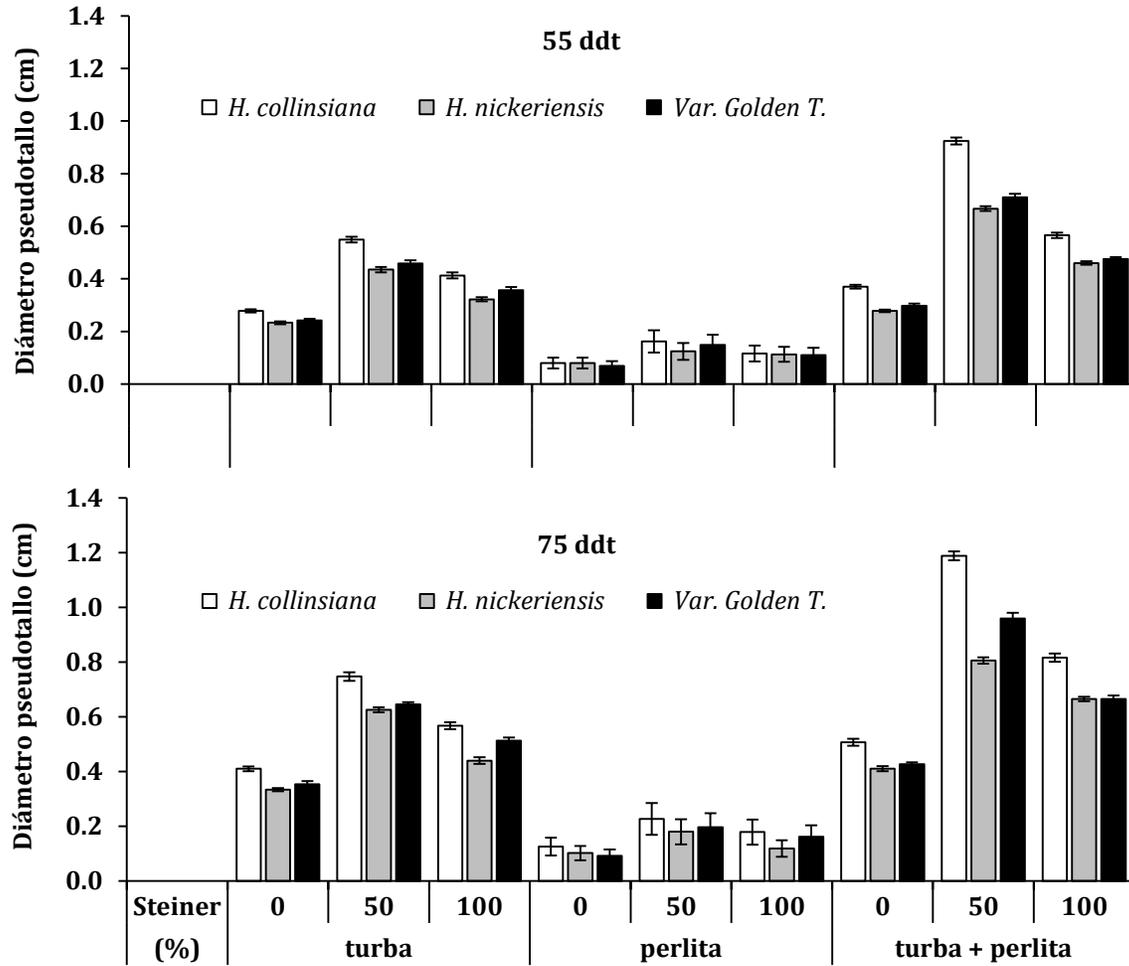


Figura 35. Efecto del sustrato y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) en el diámetro de pseudotallo en la base de plantas (cm) de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante.

### 2.3.4 Altura de planta

El ANOVA practicado a esta variable experimental reveló que el sustrato, concentración de solución Steiner en el riego y la interacción tuvieron efectos significativos en la altura de planta a los 55 y 75 días después del trasplante en las tres especies de heliconias. Al igual que en la supervivencia y número de hojas, el sustrato fue el factor de mayor influencia con 60.2% promedio de la variación total (Apéndice 12).

Las plantas de las tres especies que se cultivaron en la mezcla de turba/perlita alcanzaron su mayor crecimiento en altura a los 75 ddt. En *H. collinsiana* las plantas promediaron 20.8 cm de altura, fueron plantas 2.8 veces más grandes que las plantadas en turba y 4.2 veces más a las de perlita. Las plantas de *H. nickeriensis* alcanzaron 17.9 cm de altura y superaron 2.4 y 4.2 veces más a la respuesta obtenida en turba y perlita, respectivamente. En la variedad Golden Torch, la altura de planta obtenida (17.0 cm) significó 2.2 y 3.8 veces la lograda en turba y perlita, respectivamente (Cuadro 14).

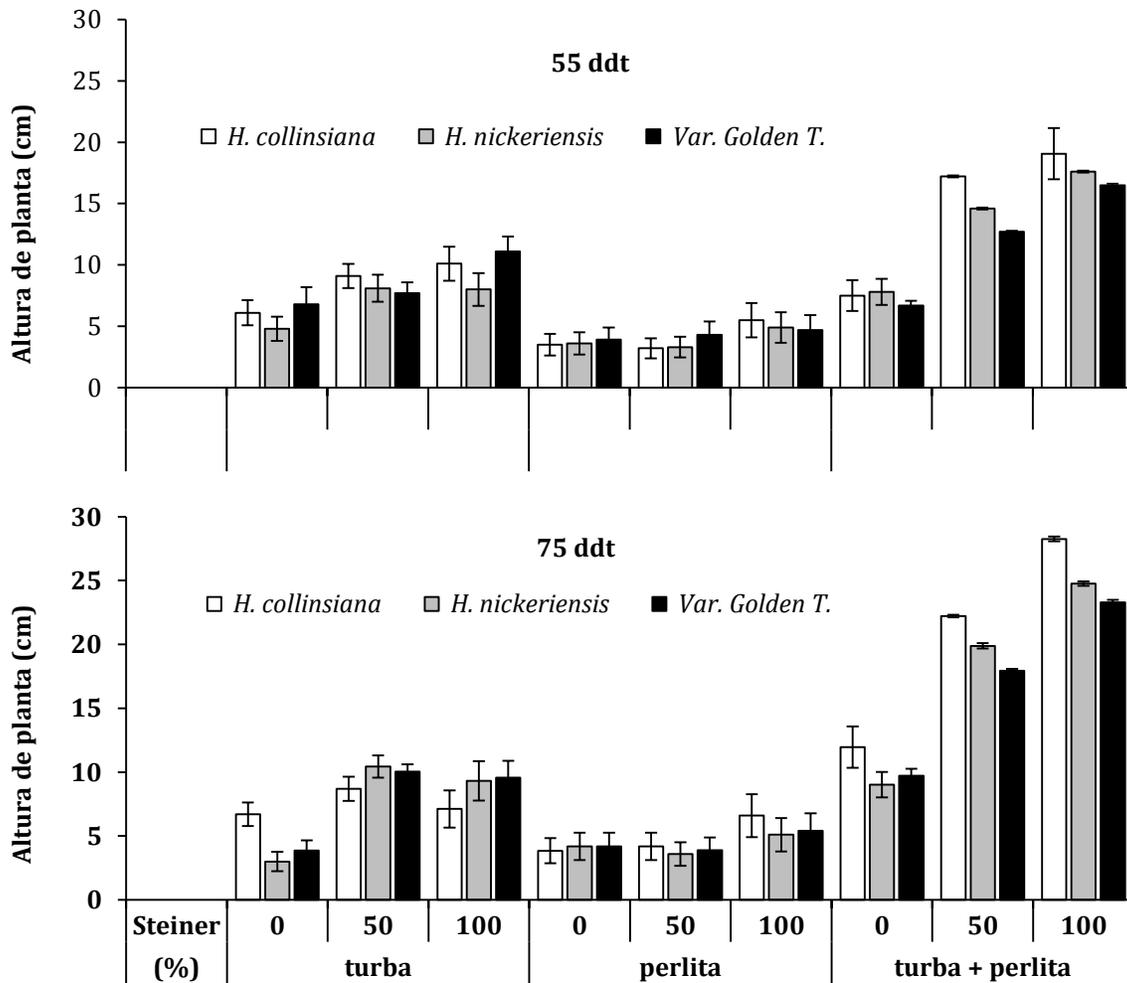
A diferencia de la tasa de supervivencia y diámetro de la base del pseudotallo de planta donde 50% de la solución Steiner (1961) fue la concentración óptima con la que se obtuvieron los mejores resultados en las tres especies, los mayores valores de altura de planta se alcanzaron cuando al agua de riego contenía 100% de la solución nutritiva a los 75 ddt. Así, las plantas de las tres especies promediaron alturas de 13.3 cm (Cuadro 15).

**Cuadro 15. Altura de planta (cm) de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero en diferentes sustratos y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).**

	<i>H. collinsiana</i>		<i>H. nickeriensis</i>		Golden Torch	
	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt
<b>Sustrato</b>						
Turba	8.4 b	7.5 b	7.0 b	7.6 b	8.5 a	7.8 b
Perlita	4.1 b	4.9 b	3.9 b	4.3 b	4.3 b	4.5 b
Turba/perlita	14.6 a	20.8 a	13.3 a	17.9 a	12.0 a	17.0 a
<b>Solución Steiner (%)</b>						
0	5.7 b	7.5 b	5.4 b	5.4 b	5.8 b	5.9 b
50	9.8 ab	11.7 ab	8.7 ab	11.3 a	8.2 ab	10.6 a
100	11.6 a	14.0 a	10.2 a	13.1 a	10.8 a	12.8 a
<b>DMS</b>	4.7	4.4	3.7	3.8	3.7	3.4

†Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

En la interacción sustrato con la concentración de la solución nutritiva se apreció que la mezcla de turba/perlita con 100% de la solución nutritiva Steiner (1961) fue la combinación que promovió la mayor altura de planta en las tres especies de heliconia. Los valores mostraron la misma tendencia a los 55 y 75 ddt, pero fueron mayores a los 75 ddt en las tres especies. Con estas combinaciones las plantas de *H. collinsiana* promediaron alturas de 28.25 cm, las de *H. nickeriensis* 24.76 cm y las de Golden Torch 23.3 cm (Figura 36).



**Figura 36. Efecto del sustrato y concentraciones de solución nutritiva Steiner (1961) en la altura de plantas (cm) de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante.**

Los mayores valores de altura registrados con el 100% de concentración de la solución nutritiva se debieron a que promovió el alargamiento excesivo de los peciolos de la última hoja. Sin embargo, esta respuesta tuvo efectos negativos en el crecimiento porque las plantas alcanzaron diámetros de base de pseudotallo menores a los obtenidos con 50% de solución nutritiva, lo que produjo plantas frágiles.

Al correlacionar la altura con el diámetro de pseudotallo en las tres especies de heliconia se observó que hubo un efecto inversamente proporcional. Con el 100% de la solución nutritiva se produjeron plantas de mayor altura pero con base de pseudotallo delgadas. En cambio, con 50% de concentración se obtuvieron plantas de porte mediano pero con base de pseudotallo

gruesos, lo que se reflejó en plantas vigorosas (Figura 37-38). Por esta razón es conveniente regar las plantas de las tres especies de heliconia con la solución nutritiva a la mitad de su concentración y mantenerlas en dichas condiciones aún después de haber sido aclimatadas.

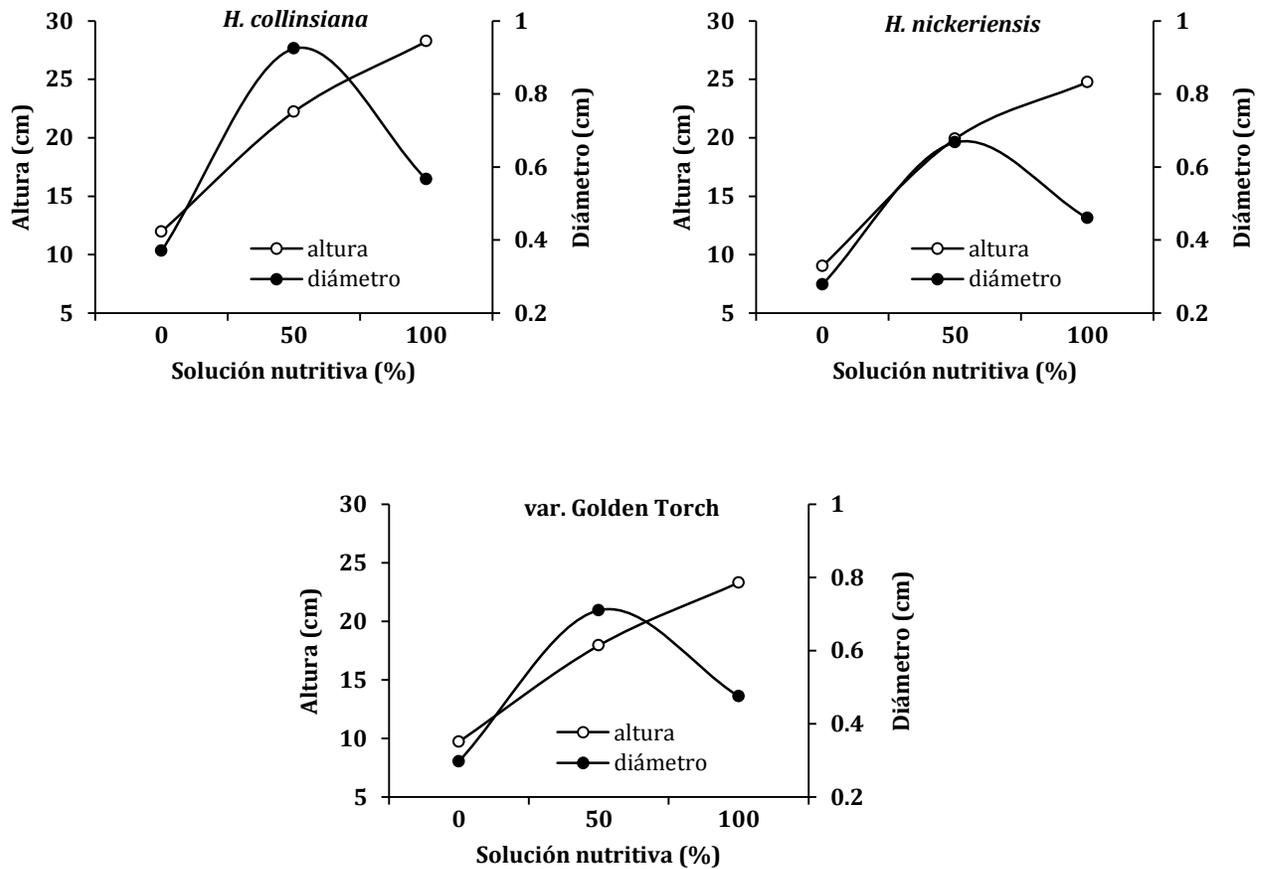
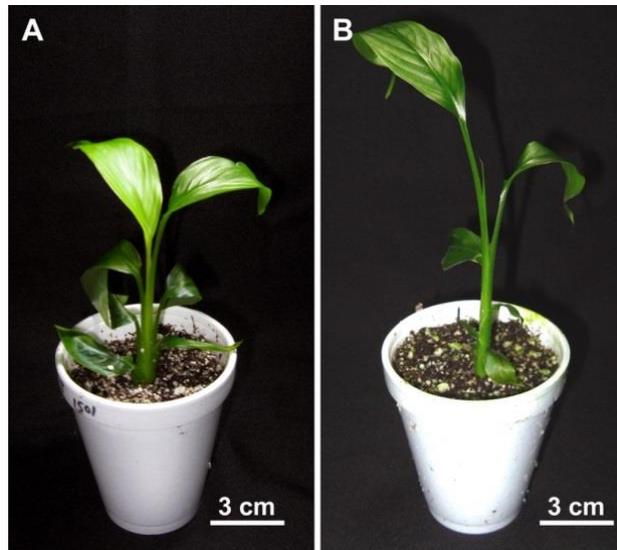
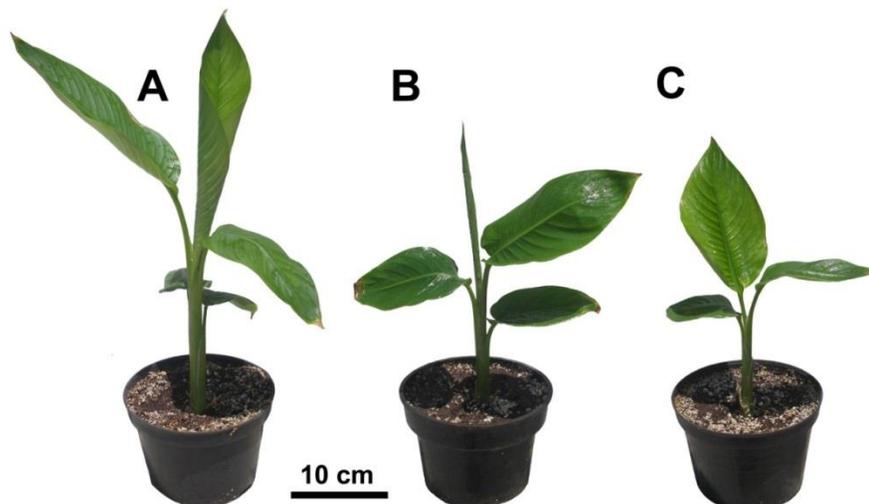


Figura 37. Relación entre altura y diámetro de base de pseudotallo en plantas de heliconia aclimatadas a condiciones de invernadero en mezcla de turba y perlita a los 75 días después del trasplante.



**Figura 38.** Respuesta en plantas de *Heliconia collinsiana* aclimatadas a condiciones de invernadero en mezcla de turba y perlita a los 75 días después del trasplante. (A) Solución Steiner (1961) a 50% y (B) 100%.

Las plantas aclimatadas en la mezcla de turba y perlita y regadas con 50% de la solución nutritiva Steiner (1961) continuaron su crecimiento conservando su vigor y después de cinco meses de cultivo alcanzaron el porte ideal para su trasplante a condiciones de campo (Figura 39).



**Figura 39.** Plantas de heliconia aclimatadas en mezcla de turba y perlita después de cinco meses del trasplante y listas para su plantación en el campo. (A) *Heliconia collinsiana*, (B) *H. nickeriensis* y (C) var. 'Golden Torch'.

### 2.3.5 Fisiología estomática de plántulas *in vitro* y *ex vitro*

El análisis de las tiras de epidermis de *Heliconia collinsiana* reveló que los estomas de las plántulas *in vitro* fueron 20% más pequeños que los de plantas aclimatadas (25  $\mu\text{m}$  de longitud versus 30.2  $\mu\text{m}$  respectivamente). En cuanto a la apertura estomática, el promedio obtenido en las plantas aclimatadas fue 4.4  $\mu\text{m}$  mientras que en las plántulas *in vitro* fue de 8.1  $\mu\text{m}$ , casi el doble (85%) (Figura 40). Los estomas de plántulas *in vitro* fueron de forma circular en tanto que los de plantas aclimatadas fueron elípticos, y por ello fueron de mayor tamaño. La frecuencia estomática también resultó diferente entre las plántulas *in vitro* y las aclimatadas. En las primeras el número de estomas  $\text{mm}^{-2}$  fue 28% mayor a las aclimatadas (Figura 41).

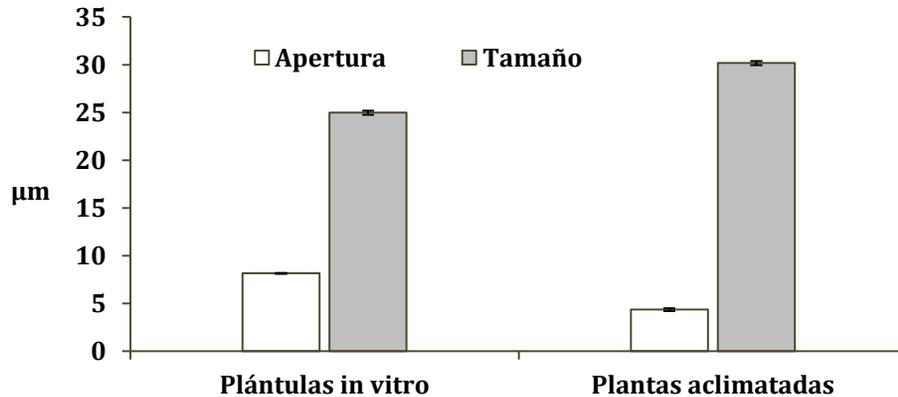


Figura 40. Longitud y apertura ( $\mu\text{m}$ ) de estomas en plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio de enraizamiento *in vitro* y plantas aclimatadas por 75 días en mezcla de turba y perlita y fertilizadas con 50% de solución nutritiva Steiner (1961).

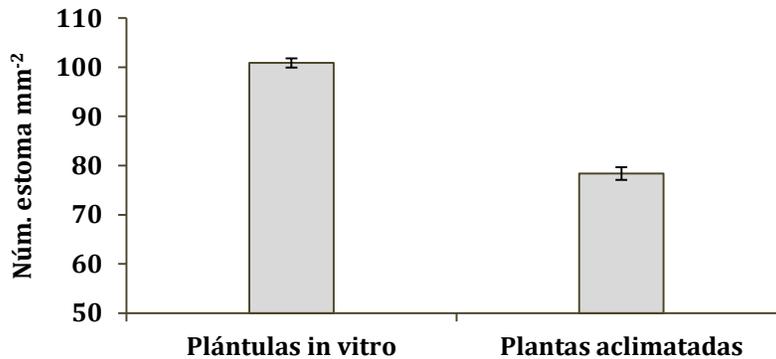


Figura 41. Frecuencia estomática observada en plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio de enraizamiento *in vitro* y plantas aclimatadas por 75 días en mezcla de turba y perlita y fertilizadas con 50% de solución nutritiva Steiner (1961).

Como se observó en plántulas de *Heliconia collinsiana*, la mayoría de las especies cultivadas *in vitro* tienen estomas grandes con forma y estructura variable. Por lo regular las células guarda tienen paredes celulares delgadas y contienen más almidón y cloroplastos. También es común que las plántulas cultivadas *in vitro* presenten mayor número de estomas por  $\text{mm}^{-2}$ , mismo que disminuye cuando pasan al proceso de aclimatación. Además, los estomas cambian su morfología de circular a elíptica (Chandra *et al.*, 2010). Los valores de apertura estomática cuantificados en plántulas *in vitro* en el presente estudio se consideran una característica típica de plántulas micropropagadas (Preece y Sutter, 1993).

Los resultados combinados de apertura, tamaño y frecuencia estomáticos explican la nula respuesta de supervivencia obtenida en plántulas de las tres especies de heliconia a los 35 días después de trasplantadas. Los estomas de hojas de plántulas *in vitro* resultaron más pequeños, mayor cantidad  $\text{mm}^{-2}$  y estaban más abiertos en comparación con los de plantas aclimatadas. Por ello, la estructura y funcionamiento estomáticos se consideran como factores claves que contribuyen a la pérdida excesiva de agua cuando las plántulas pasan a condiciones *ex vitro* (Hazarika, 2006). Diversos estudios afirman que el factor responsable de las anomalías del comportamiento estomático es la alta humedad relativa dentro de los frascos de cultivo (Preece y Sutter, 1993).

Respecto a la respuesta de los estomas a factores externos, evaluados con tratamientos de ABA, los ensayos revelaron que los estomas de las plántulas *in vitro* sólo mostraron cierta respuesta al cierre cuando se trataron con la dosis más alta de ABA (0.1 mM). En cambio, en las plantas aclimatadas el cierre estomático ocurrió incluso en la dosis más baja de ABA (0.001 mM) y fue total con 0.01 mM (Figura 42-43).

Muchos estudios han demostrado que los estomas de las plantas cultivadas *in vitro* muestran de algún modo cierta incapacidad para cerrar cuando se retiran de los frascos de cultivo y por ello enseguida se presenta la deshidratación y muerte de las plántulas. Esta respuesta se ha observado en la micropropagación de varias especies cuando se someten a tratamientos con ABA,  $\text{CO}_2$  o manitol, mientras que los estomas de las plantas aclimatadas responden con el cierre inmediato (Hronkova *et al.*, 2003; Hazarika, 2006).

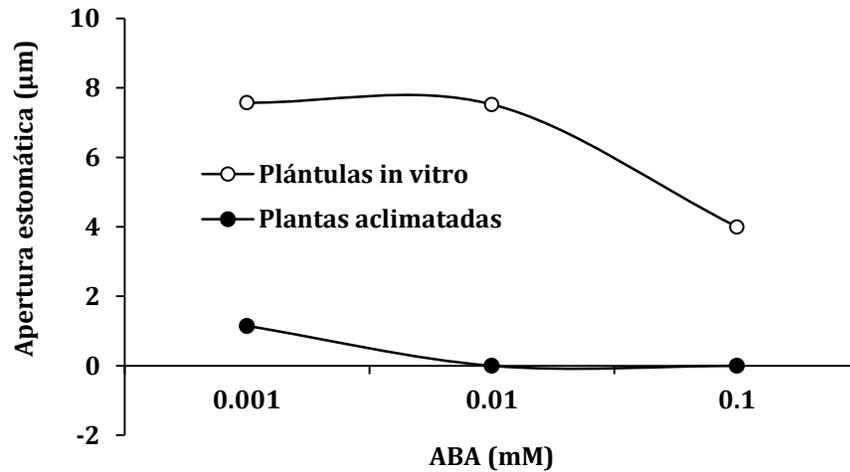


Figura 42. Apertura estomática de tiras de epidermis de hojas de plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio de enraizamiento *in vitro* y plantas aclimatadas por 75 días expuestas a diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA).

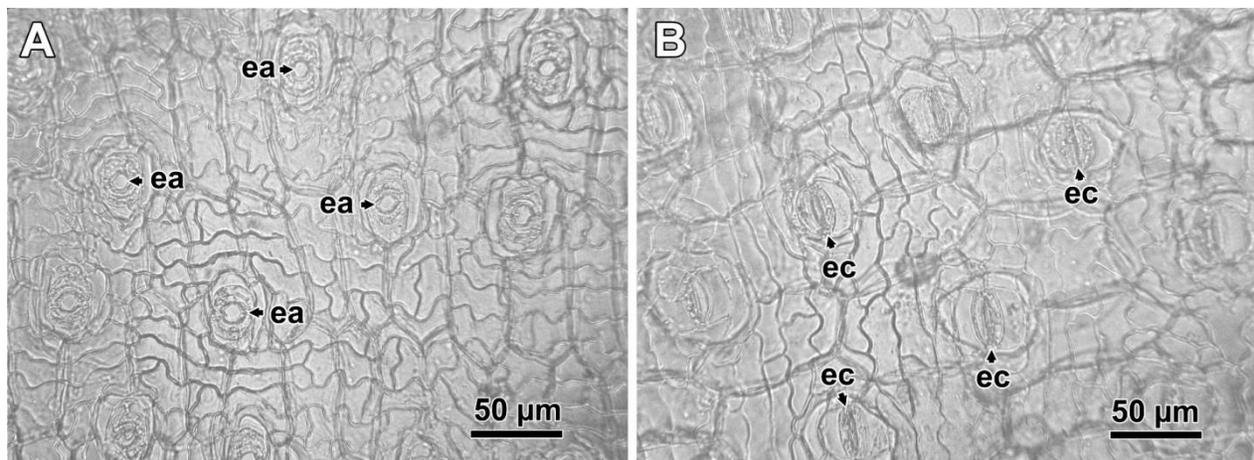


Figura 43. Respuesta observada en tiras de epidermis de hojas de (A) plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio de enraizamiento *in vitro* y (B) plantas aclimatadas por 75 días expuestas a 0.01 mM de ácido abscísico. ea=estoma abierto; ec=estoma cerrado.

Si bien se sabe que la acción del ABA como molécula de señalización regula la pérdida de agua por transpiración y el crecimiento foliar, diversos factores de estrés inducen su síntesis y por ello se considera como la hormona del estrés (Assmann, 2010). Mediante estudios histoquímicos se ha podido concluir que esta incapacidad de los estomas *in vitro* para responder al ABA se debe al mal funcionamiento de la celulosa, pectina, calosa, cutina y los patrones de birrefringencia producidos por las microfibrillas de celulosa. El tamaño de apertura estomática es controlado por el volumen relativo de las células guarda que dependen de la turgencia. A su vez, la turgencia depende de los potenciales osmótico e hídrico. La incapacidad

de los estomas para cerrarse podría ser debido a las propiedades anormales de la pared celular o al funcionamiento inadecuado de los protoplastos (Hazarika, 2006).

De estos resultados se puede desprender que los porcentajes de supervivencia alcanzados a los 75 ddt son producto del buen funcionamiento de los estomas. En cambio, las tasas de supervivencia a los 55 ddt permiten sugerir que, si bien no todas las plantas sobrevivieron, los estomas ya mostraban cierto grado de funcionamiento.

El objetivo central de la aclimatación es proporcionar el ambiente adecuado para permitir un ajuste fisiológico y morfológico gradual de las plántulas *in vitro* a las *ex vitro*. Las técnicas se deben enfocar a proporcionar menor humedad relativa, mayor nivel de luz, crecimiento autotrófico y ambiente aséptico aunque difícilmente puede mantenerse en el invernadero o campo. Aquí cobra relevancia el hecho de que el proceso de aclimatación empieza desde que las plántulas están dentro del frasco de cultivo.

Por ejemplo, Pospisilova *et al.* (2009) reportaron que durante la aclimatación de tabaco, la aplicación de 50  $\mu\text{M}$  de ABA inmediatamente después pasarlas a condiciones *ex vitro*, incrementa considerablemente su concentración en las hojas. Con ello disminuyó drásticamente la conductancia estomática y tasa de transpiración, incluso al primer día de la transferencia *ex vitro*.

En la aclimatación de plántulas de chile ancho regeneradas *in vitro* se observó que la tasa de crecimiento relativo fue baja, producto del efecto negativo del choque del trasplante. Sin embargo, el crecimiento se mejoró de manera general cuando las relaciones hídricas e intercambio gaseoso se estabilizaron. Esta respuesta se atribuyó a la mayor capacidad fotoautotrófica de las plántulas y a mayor luz y  $\text{CO}_2$  después de la aclimatación (Estrada-Luna *et al.*, 2001).

Otra estrategia sugerida es el uso de tapas en los frascos de cultivo *in vitro* que permitan mayor intercambio de gases y reducción de humedad relativa. Ya existen diferentes materiales selladores que se utilizan en recipientes de cultivo de tejidos. Se incluyen cierres metálicos, películas de poliuretano, cierres de silicón, fibra de algodón, películas de polipropileno y sistemas de películas de cultivo alternativos. Recientemente, se ha reportado que las tapas de

cierre permeables ayudan a crecer a las plántulas *in vitro* fotomixotróficamente y con ello obtener plántulas de alta calidad y menor pérdida de propágulos en el proceso de aclimatación (Mohamed y Alsadon, 2010; 2011).

También cada vez se vuelve más común el uso de micorrizas en virtud de que la micorrización artificial bajo condiciones controladas, puede proporcionar beneficios importantes sobre la fisiología de las plantas. En trabajos hechos con plántulas de *Castanea sativa* inoculadas con el hongo *Pisolithus tinctorius*, después del enraizamiento *in vitro*, se observó que después de 50 días de la inoculación el crecimiento de las plantas fue mayor que en las no inoculadas. Se mejoró el desarrollo radicular, así como la altura de planta y diámetro de tallo (Martins, 2008). También Estrada-Luna y Davies (2003) encontraron que durante la aclimatación de plántulas de chile ancho regeneradas *in vitro* la aplicación de micorrizas arbusculares mejoraron notablemente las características fisiológicas después de 45 días de inoculación. En las plantas inoculadas fueron mayores las tasas de transpiración y fotosíntesis, contenido de clorofila, contenido nutrimental en hojas (N, P y K), biomasa seca foliar, área foliar, producción de frutos y diferencias en la distribución del carbón (proporción raíz/brote más baja y área foliar más alta) en comparación con las plántulas no inoculadas.

Por todos los aspectos antes mencionados es que la aclimatación de las plántulas a condiciones de invernadero por mucho tiempo se consideró un obstáculo en la micropropagación. Sin embargo, en la actualidad existen estudios que se han enfocado a entender con mayor precisión la fisiología de la aclimatación. Aunque los resultados no se pueden generalizar a todas las especies micropropagadas, si ofrecen opciones que pudieran adecuarse para mejorar las condiciones específicas para las heliconias. La información generada en la presente investigación sienta las bases para el establecimiento del proceso de aclimatación de heliconias en un sistema de micropropagación a escala comercial. Además, este proceso de aclimatación pudiera adecuarse para especies ornamentales similares de los géneros *Alpinia*, *Etilingera*, *Musa*, *Strelitzia*, *Zingiber*, entre otras.

## 2.4 Conclusiones

- La aclimatación de plántulas micropropagadas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' a condiciones de invernadero es factible después de 75 días de trasplantadas usando la mezcla de turba y perlita (1:1) como sustrato y aplicando riegos con 50% de solución nutritiva Steiner (1961).
- La mezcla de turba y perlita como sustrato y riegos con 50% de solución nutritiva Steiner (1961) a los 75 días después del trasplante favorecen la supervivencia del 100% de las plántulas, así como los mayores valores de altura de planta, número de hojas y diámetro de pseudotallo.
- Las hojas de plántulas de heliconia diferenciadas bajo condiciones *in vitro* son 28% más delgadas que las de plantas de 75 días de aclimatadas.
- Los estomas de plántulas de heliconia regeneradas bajo condiciones *in vitro* son más pequeños, se presentan en mayor cantidad  $\text{mm}^{-2}$  y están más abiertos en comparación con los de plantas de 75 días de aclimatadas.
- Los estomas de las hojas de plántulas de heliconia *in vitro* son incapaces de responder al cierre estomático inducido por ácido abscísico comparados con los de plantas de 75 días de aclimatadas. Este funcionamiento anormal sugiere ser la causa de la baja tasa de supervivencia en plántulas de 35 y 55 días después del trasplante.

## 2.5 Literatura citada

- Abad, B. M., Noguera, P., y Carrión, B. C. 2004. Los Sustratos en los cultivos sin suelo. En: M. G. Urrestarazu, (Ed). Tratado de cultivo sin suelo. 2nd ed. Mundi-Prensa. Almería, España. pp. 113-158.
- Adams, P. 2004. Aspectos del manejo de los diferentes sustratos, su comparación, elección y factores medioambientales a considerar. En: M. G. Urrestarazu, (Ed). Tratado de cultivo sin suelo. 2nd ed. Mundi-Prensa. Almería, España. pp. 239-262.
- Assmann, S. M. 2010. Abscisic acid signal transduction in stomatal responses. *In*: Davies, P. J. (ed). Plant Hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!. Springer. N. Y., U. S. A. Pp 399-420.
- Benton, J. J. 2005. Hydroponics a practical guide for the soilless grower. 2nd. Ed. CRC PRESS. Boca Raton, Florida, USA. 409 p.
- Chandra, S., R. Bandopadhyay, V. Kumar, and R. Chandra. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett* 32: 1199–1205.
- Estrada-Luna, A. A. and Davies, F. T. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and postacclimatization. *J. Plant Physiol.* 160: 1073–1083.
- Estrada-Luna, A. A., Davies, F. T., and Ejilla, J. N. 2001. Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 17–24.
- George, E. F. and P. C. Debergh. 2008. Micropropagation: Uses and methods. *In*: Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (Eds.). Plant propagation by tissue culture 3rd Edition Volume 1. The Background. Springer, The Netherlands. Pp 29-62.
- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108: 105–120.
- Hernández, M. E. 2008. Regeneración *in vitro* de *Heliconia* spp vía organogénesis directa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 96 p.
- Hronkova, M., H. Zahradnickova, M. Simkova, P. Simek P., and A. Heydova. 2003. The role of abscisic acid in acclimation of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions. *Biol Plant* 46: 535–541.
- López, C. M. A., Márquez, G. J. y Murguía, S. G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2 ed. 177 p.
- Maher, M., M. Prasad, and M. Raviv. 2008. Organic soilless media components. *In*: Michael Raviv and Heiner Lieth (eds). Soilless culture: Theory and practice. Elsevier. USA. Pp 459-504.
- Martins, A. 2008. *In vitro* mycorrhization of micropropagated plants: Studies on *Castanea sativa* Mill. *In*: Zaki Anwar Siddiqui, Mohd. Sayeed Akhtar and Kazuyoshi Futai (eds). Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer Netherlands. Pp 321-336.

- Mohamed, M. A. and A. A. Alsdon. 2010. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Sci. Hortic.* 123: 295-300.
- Mohamed, M. A. and A. A. Alsdon. 2011. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum*. *Biol. Plant.* 55: 370-374.
- Moreno I., T. 2004. Cultivo en perlita. En: M. G. Urrestarazu, (Ed). *Tratado de cultivo sin suelo*. 2nd Ed. Mundi-Prensa. Almería, España. pp. 587-602.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-493.
- Pospisilova, J., I. Ticha, S. Kadlecěk, D. Haisel, and S. Pizakova. 1999. Acclimatization of micropropagated plants in *ex vitro* conditions. *Biol. Plant.* 42: 481-497.
- Pospíšilová, J., Synková, H., Haisel, D. Baťková, P. 2009. Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during *ex vitro* transfer of micropropagated tobacco plantlets. *Biol. Plant.* 53: 11-20.
- Preece, J. E., and E. G. Sutter. 1993. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Eds.) Micropropagation: Technology and application.* Kluwer The Netherlands, pp. 71-93.
- Rout, G.R., A. Mohapatra, and J. S. Mohan. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 24: 531-560.
- SAS Institute. 2003. *SAS/STAT User's Guide*. (Release 9.1). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Sonneveld, C., and W. Voogt. 2009. *Plant nutrition of greenhouse crops*. Springer. Netherlands. 431 p.
- Steiner, A. A. 1961. A method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and soil.* 15: 134-154.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Se logró inducir el fenómeno de embriogénesis somática indirecta y por consiguiente el establecimiento de un nuevo sistema de propagación en la especie *Heliconia collinsiana*. La embriogénesis somática se indujo con el cultivo de secciones transversales basales disectadas de pseudotallos de plántulas regeneradas *in vitro*. *H. nickeriensis* y variedad Golde Torch no mostraron capacidad morfogénica para la embriogénesis somática. La inducción de callo embriogénico se obtuvo con las sales minerales totales del medio de cultivo MS (1962) suplementado con 81.4  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D; 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado durante 12 semanas en oscuridad. La etapa de proliferación de callos, inducción de etapas embriogénicas y maduración de embriones somáticos se logró con el mismo medio de cultivo adicionado con 4.5 y 9.0  $\mu\text{M}$  de 2, 4-D en condiciones de fotoperiodo de 16 horas e intensidad luminosa de 45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 16 semanas de cultivo. La etapa de maduración de los embriones somáticos se obtuvo con 2.2  $\mu\text{M}$  de BA y el alargamiento de las plantas fue efectivo usando el medio de cultivo a la mitad de concentración de sales minerales totales, durante ocho semanas en cada etapa.
- Con el análisis histológico, se observaron los primeros embriones en callos conformados por tejido parenquimatoso altamente irrigado por tejido vascular. Estos embriones tenían estructura circular y estaban constituidos por células pequeñas, con núcleos prominentes y citoplasma denso. En los embriones de estado coleoptilar se observó la protodermis y procambium, que posteriormente dio origen al tejido vascular embrionario.
- La aclimatación de plántulas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y variedad 'Golden Torch', obtenidas por organogénesis directa, a condiciones de invernadero es factible (100% de supervivencia) después de 75 días de trasplantadas a la mezcla de turba y perlita (1:1) como sustrato y aplicando riegos con 50% de solución nutritiva Steiner. Los estomas de las hojas de plántulas *in vitro* son incapaces de responder al cierre estomático inducido por ácido abscísico comparados con los de plantas de 75 días de aclimatadas. Su funcionamiento anormal sugiere ser la causa de la baja tasa de supervivencia en plántulas de 35 y 55 días después del trasplante.

## APÉNDICE

### 1. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de callos *in vitro* (%) en diferentes explantes de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' cultivados en varias concentraciones de 2,4-D y carbón activado después de 12 semanas en oscuridad.

Fuente de variación	<i>H. collinsiana</i>	<i>H. nickeriensis</i>	Golden Torch
Explante	0.80 *	0 -	0 -
2,4-D + C. A.	0.19 *	0 -	0 -
Explante*2,4-D+C.A.	0.24 *	0 -	0 -
Error	0.01	0	0
C.V.	293.45	0	0
R <sup>2</sup>	0.73	0	0
Media	3.33	0	0

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.A. = Carbón activado; C.V. = Coeficiente de variación.

### 2. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de callos *in vitro* (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en medio MS (1962) suplementado con varias fuentes y dosis de auxinas y carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>) durante 4, 8 y 12 semanas en oscuridad.

Fuente de variación	4 semanas	8 semanas	12 semanas
Auxina	0.23 *	1.37 *	2.46 *
Dosis	0.11 NS	0.63 *	1.14 *
Auxina*Dosis	0.20 *	0.76 *	1.23 *
Error	0.05	0.08	0.07
C.V.	317.16	162.57	112.68
R <sup>2</sup>	0.29	0.50	0.65
Media	7.22	17.22	23.33

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

### 3. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de callos *in vitro* (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en diferentes condiciones de luz durante 4, 8 y 12 semanas.

Fuente de variación	4 semanas	8 semanas	12 semanas
Condición de luz	0.18 NS	0.61 *	1.15 *
Error	0.06	0.09	0.09
C.V.	111.87	64.81	56.96
R <sup>2</sup>	0.71	0.70	0.70
Media	23.33	48.33	55.00

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**4. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de callos *in vitro* (%) en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana* cultivadas en diferentes concentraciones de sales minerales y sacarosa durante 12 semanas en oscuridad.**

Fuente de variación	Inducción de callo (%)
Sales minerales	3.35 *
Sacarosa	1.63 *
Sales minerales*Sacarosa	1.15 *
Error	0.16
C.V.	78.73
R <sup>2</sup>	0.42
Media	50.83

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**5. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la proliferación de callos embriogénicos (g) de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) suplementado con dos concentraciones de 2, 4-D y carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>) durante 4, 8, 12 y 16 semanas en fotoperiodo 16 h.**

Fuente de variación	4 semanas	8 semanas	12 semanas	16 semanas
Dosis 2, 4-D	0.07 NS	19.59 *	45.18 *	99.08 *
Error	0.06	0.22	0.41	0.54
C.V.	35.12	29.67	26.16	20.36
R <sup>2</sup>	0.36	0.91	0.93	0.95
Media	0.72	1.60	2.45	3.63

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**6. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza del número de embriones globulares y escutelares obtenidos en la etapa de proliferación de callos embriogénicos de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) suplementado con 2, 4-D y carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>) durante 16 semanas en fotoperiodo 16 h.**

Fuente de variación	Globular	Escutelar
Dosis 2, 4-D	29103.63 *	2269.43 *
Error	322.55	50.50
C.V.	28.93	41.23
R <sup>2</sup>	0.91	0.84
Media	62.06	17.23

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**7. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza del peso de callo fresco (g) y número de embriones (globulares, escutelares, coleoptilares) obtenidos en la etapa de maduración y regeneración de plántulas de la embrionogénesis somática de *Heliconia collinsiana* a las ocho semanas en fotoperiodo 16 h.**

Fuente de variación	Callo embrionogénico	Globular	Escutelar	Coleoptilar
Fitohormona	17.48 *	67.39 *	168.09 *	208.33 *
Error	0.52	11.03	101.14	5.36
C.V.	28.19	50.66	17.41	60.95
R <sup>2</sup>	0.79	0.43	0.91	0.82
Media	2.57	6.55	7.85	3.80

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**8. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de regeneración (%) y altura de plantas (cm) de *Heliconia collinsiana* obtenidas por embrionogénesis somática en varios porcentajes de sales minerales totales del medio MS (1962) a las ocho semanas.**

Fuente de variación	Tasa de regeneración	Altura de planta
Sales minerales	14503.33 *	22.85 *
Error	562.29	2.78
C.V.	40.43	39.88
R <sup>2</sup>	0.79	0.63
Media	58.66	4.18

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**9. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la supervivencia (%) de plántulas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt). Los valores se transformaron con  $\sqrt{Y + 0.5}$ .**

Fuente de variación	<i>H. collinsiana</i>		<i>H. nickeriensis</i>		Golden Torch	
	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt
Sustrato	1.95 *	2.83 *	2.07 *	2.95 *	2.07 *	2.75 *
Solución Steiner	1.26 *	2.53 *	0.93 *	2.23 *	0.50 NS	1.90 *
Sustrato*Steiner	0.36 *	1.56 *	0.83 *	1.45 *	0.67 *	1.31 *
Error	0.15	0.16	0.18	0.17	0.20	0.19
C.V.	149.83	115.22	140.57	112.15	133.40	108.07
R <sup>2</sup>	0.22	0.30	0.17	0.27	0.13	0.24
Media	57.10	62.60	59.30	64.30	61.50	66.40

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**10. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza del número de hojas de plántulas en *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).**

Fuente de variación	<i>H. collinsiana</i>		<i>H. nickeriensis</i>		Golden Torch	
	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt
Sustrato	70.34 *	119.07 *	16.94 *	36.40 *	39.14 *	68.40 *
Solución Steiner	13.61 NS	20.67 NS	8.71 NS	5.63 NS	11.67 NS	18.23 NS
Sustrato*Steiner	24.06 *	38.67 *	11.06 *	12.57 NS	15.91 *	24.80 *
Error	10.08	10.75	4.52	6.24	3.92	5.48
C.V.	106.22	80.87	89.47	78.09	75.89	66.26
R <sup>2</sup>	0.19	0.26	0.19	0.16	0.29	0.30
Media	2.98	4.05	2.37	3.20	2.61	3.53

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**11. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza del diámetro (cm) del pseudotallo de plántulas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).**

Fuente de variación	<i>H. collinsiana</i>		<i>H. nickeriensis</i>		Golden Torch	
	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt
Sustrato	1.89 *	3.30 *	1.00 *	1.90 *	1.13 *	2.20 *
Solución Steiner	0.69 *	1.04 *	0.33 *	0.48 *	0.42 *	0.71 *
Sustrato*Steiner	0.72 *	1.19 *	0.37 *	0.63 *	0.42 *	0.79 *
Error	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02
C.V.	33.26	34.88	35.86	33.68	37.42	35.76
R <sup>2</sup>	0.81	0.76	0.76	0.77	0.75	0.75
Media	0.38	0.53	0.31	0.41	0.32	0.45

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.

**12. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la altura (cm) de plántulas de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y var. 'Golden Torch' durante su aclimatación a condiciones de invernadero a los 55 y 75 días después del trasplante (ddt).**

Fuente de variación	<i>H. collinsiana</i>		<i>H. nickeriensis</i>		Golden Torch	
	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt	55 ddt	75 ddt
Sustrato	838.56 *	2187.59 *	690.47 *	1508.01 *	442.43 *	1252.80 *
Solución Steiner	271.60 *	324.79 *	178.21 *	482.56 *	185.03 *	366.59 *
Sustrato*Steiner	320.77 *	724.86 *	246.26 *	581.07 *	184.90 *	461.43 *
Error	58.98	51.13	36.44	37.77	35.41	31.45
C.V.	85.05	64.61	74.73	61.91	71.98	57.40
R <sup>2</sup>	0.34	0.58	0.40	0.60	0.34	0.59
Media	9.03	11.06	8.07	9.92	8.26	9.77

\*= Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS = No significativo; C.V. = Coeficiente de variación.