

T
631.535
568

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE CINCO
VARIETADES COMERCIALES DE HELICONIAS A PARTIR DE
PROPÁGULOS VEGETATIVOS CON FINES DE PRODUCCION
MASIVA EN LA REGIÓN LORETO

TESIS

Para optar el título profesional de:

BIÓLOGO

Presentado por:

Kenny Tairon Gómez Vela

Jack Antony Moncada Lauriano



373

DONADO POR:

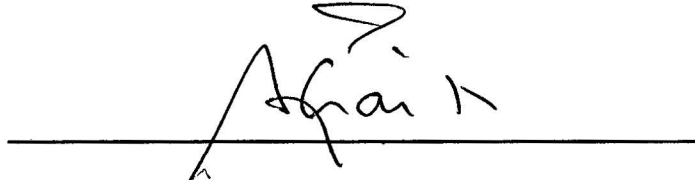
JACK ANTONY MONCADA LAURIANO

IQUITOS, 14-10-2013

IQUITOS - PERÚ

2011

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR




Blgo. M.Sc. Alberto García Ruíz

Presidente



Blga. M.Sc. Felicia Díaz Jarama

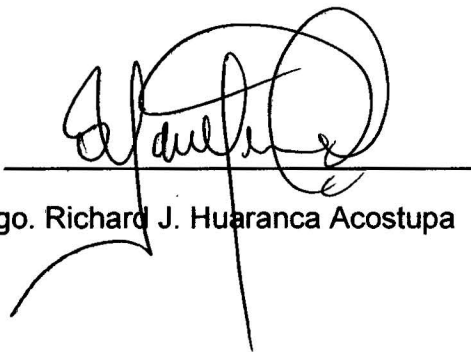
Miembro



Blga. Mery Nancy Arévalo García

Miembro

ASESORES



Blgo. Richard J. Huaranca Acostupa



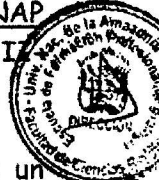
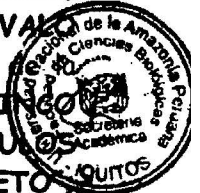
Ing. M.Sc. Sergio F. Pinedo Freyre



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Iquitos, 09 de setiembre de 2011

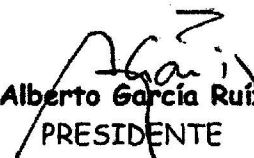
En la ciudad de Iquitos, a los nueve días del mes de setiembre de 2011 y siendo las _____ horas, se reunió en el Auditorio de la Facultad de Agronomía, el Jurado Calificador y Dictaminador de Tesis que suscribe, designado con R.D. N° 018-2010-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por: **Blgo. ALBERTO GARCÍA RUIZ, M.Sc., Presidente;** **Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA, M.Sc., Miembro;** **Blga. MERI NANCY ARÉVALO GARCÍA, Miembro;** para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de tesis titulada: **"DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE CINCO VARIEDADES COMERCIALES DE HELICONIAS A PARTIR DE PROPÁGULOS VEGETATIVOS CON FINES DE PRODUCCIÓN MASIVA EN LA REGIÓN LORETO,** realizado por los Brs. en Ciencias Biológicas de la FCB-Escuela de Biología, **Kenny Tairon Gómez Vela** de la Promoción II-2008, graduado de Bachiller con R.R. N° 2413-2010-UNAP de fecha 25 de octubre del 2010 y **Jack Antony Moncada Lauriano** de la Promoción I-2008, graduado de Bachiller con R.R. N° 0970-2010-UNAP de fecha 09 de abril del 2010.



Luego de realizada la sustentación de la Tesis, los bachilleres fueron sometidos a un interrogatorio sobre el tema en cuestión, habiendo absuelto de manera **SATISFACTORIA** las observaciones y objeciones que fueron formuladas por los integrantes del Jurado Calificador y Dictaminador.

Después de la deliberación y votación del caso, el Jurado Calificador y Dictaminador dió como veredicto **APROBAR** la Tesis por **UNANIMIDAD**, quedando los candidatos aptos para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalizado el acto, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las **17:55** horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación por triplicado.


Alberto García Ruiz
 PRESIDENTE


Felicia Díaz Jarama
 MIEMBRO


Meri Nancy Arevalo Garcia
 MIEMBRO

DEDICATORIAS

A mis padres Roger y Martha principalmente por el apoyo incondicional a pesar de los problemas por enseñarme que cuando se presentan problemas tenemos que ser más fuertes y sobreponerse por lo pasado durante mis años de estudios universitarios y realización del proyecto, por la confianza depositada en mí para convertirme en un gran profesional y desenvolverme en un mundo competitivo. A mis hermanas Vanessa, Martha, Jessica; por el aliento y las lecciones de vida y por dar a mi familia las dos primeras esperanzas de vida mis sobrinos Bryan y Katixa.

A mis amigos con quienes pasamos momentos de cóleras, alegrías, entre otros que hicieron fortalecer los lazos de amistad por siempre, a Priscila por estar ahí en los momentos más conmemorativos de este ciclo de mi vida.

Jack Moncada

A DIOS, de la fortaleza espiritual depositada en mí para seguir adelante frente a las adversidades. A mis PADRES por el inmenso amor fraterno que me brindan, comprensión y el soporte absoluto durante ésta etapa de preparación profesional.

A mis HERMANOS por apoyarme en seguir adelante y ser siempre persistente en las cosas que uno ama; y a FIOBB quien es uno de los motivos a seguir adelante, por brindarme su compañía, comprensión y exhortarme que en la vida no hay imposibles.

Kenny Gómez

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestra gratitud y estima personal:

- A nuestro señor Jesucristo por darnos la vida y enseñarnos los caminos de Fe y el amor a nuestras familias y amigos.
- A nuestro Asesor y amigo Blgo. Richard Huaranca Acostupa, por las lecciones, la confianza, asesoramiento y por resolver las preguntas que surgieron durante la elaboración del proyecto de tesis.
- A nuestro Asesor y amigo Ing. M.Sc. Sergio F. Pinedo Freyre, por los consejos y asesoramiento, especialmente por confiar en nosotros brindándonos las facilidades dentro de un prestigioso laboratorio como en este caso el INIA.
- A la Blga. M.Sc. Felicia Díaz Jarama, por la cordialidad y paciencia desde al momento que iniciamos el rumbo de aprendizaje, pues todo esto, el resultado del empeño que nos inculco.
- A José Manuel Reyna, Julio Grandez, Gabriel Hidalgo, por el trabajo físico apoyando las colectas o elaboración de parcelas experimental.
- Al Dr. Eloy López de la Universidad Nacional de Trujillo por la capacitación personal en temas específicos de cultivo *in vitro* de tejidos.
- Al Instituto Nacional de Innovación Agraria – EEA “San Roque” Iquitos, por brindar las facilidades correspondientes para la ejecución de la tesis y así forjar el desarrollo académico y humanista de los estudiantes, futuros profesionales como nosotros.
- Y a todas las personas, que de una u otra manera contribuyeron en la ejecución de la presente investigación.
- Si omitimos agradecer y reconocer la contribución de alguien, les pedimos nos perdone.

CONTENIDO

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR	II
ASESORES	II
AGRADECIMIENTO	IV
CONTENIDO	V
LISTA DE GRAFICOS	VII
LISTA DE TABLAS	IX
I. INTRODUCCION	- 1 -
II. ANTECEDENTES	- 4 -
2.1 PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS:	- 11 -
III. OBJETIVOS	- 12 -
3.1. GENERAL	- 12 -
3.2. ESPECÍFICOS	- 12 -
IV. MATERIALES Y METODOS	- 13 -
4.1. LUGAR DE ESTUDIO	- 13 -
4.2. MATERIAL VEGETAL	- 13 -
4.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO HELICONIA	- 14 -
4.4. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	- 14 -
4.5. INSTALACIÓN DE UNA PARCELA EXPERIMENTAL	- 15 -
4.6. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	- 16 -
4.7. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	- 19 -
4.7.1. Desinfección de Yemas del Rizoma extraídas de la parcela Experimental "EEA" San Roque	- 19 -
4.7.2. Desinfección de Ápices florales	- 20 -
4.8. SIEMBRA DEL MATERIAL VEGETAL	- 22 -
4.9. ENSAYOS EXPERIMENTALES	- 22 -
4.10. EVALUACIONES	- 28 -
4.11. DISEÑO ESTADISTICO	- 30 -
V. RESULTADOS	- 31 -
5.1. DESINFECCIÓN DE PROPÁGULOS DE CINCO VARIEDADES DE HELICONIA	- 31 -
5.1.1. Yemas del rizoma <i>Heliconia</i> sp.	- 31 -
5.1.2. Ápice Floral de <i>Heliconia</i> sp.	- 39 -
5.2. ESTABLECIMIENTO DE YEMAS DEL RIZOMA DE CINCO VARIEDADES DE HELICONIA POR EL TIPO DE MEDIO	- 42 -
5.2.1. Supervivencia de yemas de rizoma en el Establecimiento de cinco Variedades de heliconias en diferentes tipos de medios.	- 43 -
VI. DISCUSIÓN	- 48 -

VII. CONCLUSIONES	- 50 -
VIII. RECOMENDACIONES	- 51 -
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	- 52 -
X. ANEXOS	-54 -

LISTA DE GRAFICOS

Grafico 1: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de <i>Heliconia orthotricha</i> var. "Bicolor"	- 33 -
Gráfico 2: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de <i>Heliconia orthotricha</i> var. "Edge Of Nite"	- 34 -
Gráfico 3: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de <i>Heliconia orthotricha</i> var. "She"	- 35 -
Grafico 4: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de <i>Heliconia psittacorum</i> var. "Golden Torch"	- 36 -
Grafico 5: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de <i>Heliconia psittacorum</i> var. "Fire Opal"	- 37 -
Grafico 6: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de <i>Heliconia orthotricha</i> var. "Bicolor"	- 39 -
Grafico 7: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de <i>Heliconia orthotricha</i> var. "Edge Of Nite"	- 40 -
Grafico 8: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de <i>Heliconia orthotricha</i> var. "She"	- 40 -
Grafico 9: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de <i>Heliconia psittacorum</i> var. "Golden Torch"	- 41 -
Grafico 10: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de <i>Heliconia psittacorum</i> var. "Fire Opal"	- 41 -
Grafico 11: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de <i>Heliconia orthotricha</i> var. "Bicolor"	- 44 -

Grafico 12: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de
Heliconia orthotricha var. "Edge Of Nite" - 44 -

Grafico 13: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de
Heliconia orthotricha var. "She" - 45 -

Grafico 14: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de
Heliconia psittacorum var. "Golden Torch"..... - 45 -

Grafico 15: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de
Heliconia psittacorum var. "Fire Opal"..... - 46 -

LISTA DE TABLAS

Tabla 1:	Características comerciales de cada Variedad de Heliconia.....	- 9 -
Tabla 2:	Análisis de varianza para la variable contaminación en Yemas del rizoma	- 31 -
Tabla 3:	Pruebas de contraste para la variable contaminación según variedades en Yemas del rizoma	- 32 -
Tabla 4:	Pruebas de contraste para la variable contaminación según tratamiento en Yemas del rizoma	- 32 -
Tabla 5:	Análisis de varianza para la variable oxidación en Yemas del rizoma.....	- 38 -
Tabla 6:	Pruebas de contraste para la variable oxidación según la variedad de Heliconia en Yemas del rizoma	- 38 -
Tabla 7:	Pruebas de contraste para la variable oxidación en Yemas del rizoma ..	- 39 -
Tabla 8:	Análisis de varianza para la variable supervivencia en Yemas del rizoma según el tipo de medio de cultivo	- 42 -
Tabla 9:	Análisis de varianza para la variable oxidación en Yemas del rizoma según el tipo de medio de cultivo.....	- 43 -

I. INTRODUCCION

La vasta biodiversidad que se muestra en la selva amazónica, es y ha sido aprovechada desde hace cientos de años por los pobladores de la región, quienes muchas veces hacen uso de estos recursos de manera irracional, lo que trae consigo la pérdida de valiosa información genética, muchas veces no estudiada y más aún algunos no conocidas.

Las plantas ornamentales representan uno de los ingresos económicos más resaltantes. La función básica de la horticultura ornamental radica en la satisfacción de las necesidades estéticas del hombre. Hoy ésta se considera uno de los negocios más atractivos ya que puede proporcionar elevados ingresos por unidad de superficie **(Borris, 1995; citado por Sosa, 2004)**.

Las heliconias son plantas asombrosas, no solo por la belleza de sus flores sino por el hecho de lo poco que se sabe acerca de ellas. Cualquier persona que viaja por los trópicos no puede dejar de notar estas largas y conspicuas plantas cuando están floreciendo. En general son un recurso importante, debido a su aprovechamiento como planta ornamental. **(Agrotropical, 2008)**

Un aspecto relevante de las heliconias es que pueden ser utilizadas tanto para el ornato de parques y jardines, como flores de corte, así como cultivos para producir semillas certificadas con fines de exportación. **(Jerez, 2007)**

Actualmente las exportaciones de flores exóticas, en particular de heliconias son de alrededor de 24.000 a 30.000 tallos por año, dependiendo de las variedades. El destino de estas exportaciones son Estados Unidos, Canadá, Holanda y Alemania. **(PROEXPORT, 2004; citado por Turriago y Flores, 2004)**.

El sistema de propagación por rizomas en plantas del género *Heliconia* es extremadamente lento y requiere deshijar las plantas madres para poder establecer un nuevo clon de planta, por otro lado las semillas tardan de tres meses a tres años en germinar; esta dificultad de las semillas se presenta por un bajo porcentaje de germinación y larga latencia, además las plántulas resultantes son de lento crecimiento. **(Montgomery, 1986; citado por Turriago y Flores, 2004).**

*En la actualidad se han desarrollado nuevas técnicas que permitan solucionar problemas básicos y aplicados a la biología de las plantas. Una de ellas es la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, parte de biotecnología que tiene mayor aplicación práctica en la agricultura, y se define como un método que consiste en aislar cualquier parte de la planta (explante) sea esta una célula, un tejido o un órgano para cultivarlo en un medio nutritivo, artificial y aséptico. (Roca y Mroginski, 1991)*

*Las condiciones de esterilidad del cultivo *in vitro* son de fundamental importancia porque todos los medios empleados contienen nutrientes, los cuales facilitan el crecimiento de muchas bacterias y hongos; el crecimiento abundante de ellos destruiría el crecimiento de los tejidos vegetales. Aun los contaminantes con crecimiento lento son indeseables, pues pueden producir toxinas que afectan el crecimiento de las células vegetales, razón por la que el material vegetativo se desinfecta superficialmente antes de iniciar el cultivo *in vitro* y todo el manejo de los tejidos se hace en condiciones asépticas. (Hurtado, D. y Merino, M. 1994)*

Mediante este método es posible cultivar heliconias en medio de cultivo con la finalidad de preservar el germoplasma, obtener mayor cantidad de plántulas en un tiempo más corto y realizar una rápida multiplicación vegetativa, de esta manera atender la demanda de mercado externo de este recurso.

Aunque el cultivo de tejidos es una técnica ampliamente utilizada para la propagación de especies ornamentales, este no ha sido el caso para especies de éste género a juzgar por los reportes científicos disponibles (**Natnan *et al*, 1992; Osorio, 1993; citado por Turriago, K. y Flores, V., 2004**).

Priorizando el interés, por lo cual realizamos este proyecto, con el propósito de generar una metodología que minimice los problemas básicos en el establecimiento *in vitro* de Heliconias y poner a disponibilidad la información generada a aquellos interesados en la producción *in vitro* de plántulas de este género.

II. ANTECEDENTES

Nakai, 1941; (citado por Turriago y Flores, 2004). Agrupadas botánicamente en el orden Zingiberales. Se compone de 8 familias: Heliconiaceae, Strelitziaceae, Musácea, Costaceae, Lowiaceae, Marantaceae, Zingiberaceae y Cannaceae. Anteriormente, el grupo de plantas pertenecientes a la familia Heliconiaceae se ubicaban en la familia Musaceae; sin embargo, en adelante se las separó como Heliconiaceae. Posteriormente, determinaron un nuevo sistema de clasificación en subgéneros y secciones, basado en características morfológicas, ecológicas y genéticas.

Kress, 1994 (citado por Maza y Builes, 2000, Flores, 2004). La familia Heliconiaceae sólo está representada por el género *Heliconia*, cuenta con 200 a 400 especies y el 98% de éstas se encuentran distribuidas en el centro y sur de América y en el Caribe.

Maza y Builes, 2000 (citado por Turriago y Flores, 2004). Las heliconias son plantas herbáceas perennes cuya altura varía desde 70 cm. hasta 3 m. Presentan raíces adventicias y fasciculadas; El pseudotallo está formado por la superposición de las vainas de las hojas y se origina desde el sitio de crecimiento del rizoma hasta donde brotan los peciolo de las hojas, dándole sostén a las mismas, el cual asciende por su interior en épocas reproductivas. La inflorescencia puede ser erecta, con brácteas dispuestas hacia arriba o péndula, con brácteas dispuestas hacia abajo. La inflorescencia generalmente brota en forma terminal, al final del pseudotallo, en algunas especies ocasionalmente brota del rizoma en un tallo sin hojas, como en *Heliconia metallica* y en *Heliconia hirsuta*.

Maza y Builes, 2000; (citado por Turriago y Flores, 2004). Teniendo en cuenta la distribución de las hojas en el pseudotallo y la longitud del peciolo, se diferencian tres hábitos de crecimiento: Musoide, con peciolos largos y hojas en posición vertical u oblicuas similar a Musaceae; Canoide, con peciolos cortos y hojas en posición oblicua similar a Cannaceae; y Zingiberoide, con hojas sin peciolos o con peciolos cortos en posición horizontal.

Kress, et al. (1999). *Heliconia orthotricha* L. Anderson, sus características es la siguiente: Musoide de 2.5 – 3.5 m de altura, hoja con peciolo de 42 – 93 cm de largo y lamina de 110 – 180 por 18 – 20 cm. Inflorescencia erecta, hasta de 45 cm de largo, raquis recto a débilmente flexuoso, amarillo a rojo y glabro a hirsuto. Espatas dísticas 5 – 10 por inflorescencia sobrelapadas orientadas 40 – 60, algunas veces amarillas hacia la base y la quilla, márgenes verde – oscuro, algunas veces con negro o purpura, hirsutas o velutinas y de 12 – 15.5 por 8.5 – 15.5 cm flores blancas a crema hacia la base y verdes hacia el ápice, glabras a densamente pubescentes a lo largo de los márgenes de los sépalos y parabólicas a sigmoides. Se distribuye por Colombia, Ecuador y Perú. En Colombia está en la vertiente oriental andina y en la planicie amazónica (Caquetá y Putumayo). Piso tropical.

Kress, et al. (1999). *Heliconia psittacorum* L.F; Pertenece a la categoría de las vivaz de rizoma serpenteante, de porte mata erecto, en el cual el follaje es persistente, verde oscuro brillante más claro que el envés, largos peciolos envainantes, grandes hojas alternas, estrechas, lanceoladas (1 m x 20 cm) con nerviación marcada. Las flores masculinas están situadas en el extremo de las espigas, frutos: drupas azules en la madurez. En lo colorido resalta el rojo escarlata de las brácteas. Flores naranja con el extremo de los pétalos manchados de verde, cultivares e híbridos; brácteas rojo anaranjado, amarillo o

naranja. Generalmente son de crecimiento rápido con una altura aproximada de 1.50 m, inflorescencia en espiga erecta formada por algunas brácteas alternas con forma de pico de loro, muy afiladas y largas flores tubulares. Su emplazamiento se muestra en sol o semisombra. Con condiciones físicas como una temperatura mínimo de 15°, es más tolerante a las variaciones bruscas de temperatura que otras Heliconias. Se encuentran naturalmente en zonas tropicales húmedas de centro y Suramérica, Caribe y Florida. Su floración es durante todo el año si las condiciones son adecuadas. La polinización es hecha por los colibríes. Su multiplicación se basa principalmente en trabajos con semillas o separación de vástago en primavera puede florecer desde el primer año.

Alejandro, et al. (2008); Menciona que la micropropagación de *Heliconia collinsiana* y *Heliconia wagneriana* es complejo por la presencia de patógenos que impiden el desarrollo de los explantes, para lo cual el uso de antibiótico cefotaxime a 20 mg/l permitió el establecimiento adecuado de tales especies.

Isaza, (2004); Menciona que la combinación de dos desinfectantes como el hipoclorito de sodio y alcohol al 70% presentaron una gran influencia en la desinfección de los explantes de heliconia y que las condiciones de oscuridad impidieron la fenolización de los explantes pero al mismo tiempo se presenta clorosis y retraso en el crecimiento de la planta; además el tamaño final del explante es decisivo para prevenir la fenolización de los mismos.

Merino, (1987); Reporta que aunque la mayoría de los microorganismos se encuentran en la superficie de los órganos vegetales, existe la presencia de microorganismos en la parte interna de las plantas, como los encontrados en sus estudios de cultivo *in vitro* la presencia de estos en los espacios intercelulares de las hojas de Petunia; lo que traduce en una serie de problemas durante el cultivo, debido a que no pueden ser eliminadas por la desinfección superficial del tejido,

sin embargo este problema puede controlarse por la adición de antibióticos al medio de cultivo.

Martínez, (2009), Sus investigaciones en el establecimiento *in vitro* de yemas del rizoma de *Heliconia psittacorum*, demostraron que, con la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% y el tiempo de desinfección de 20 minutos logro un porcentaje de desinfección del 73%.

Martínez, (2009), En combinación de Fitoreguladores de crecimiento de 6-bencilaminopurina (6-BAP) a 2 mg/l y ácido 3-indolacético (AIA) a 0.5 mg/l logró obtener el mayor número de brotes en el cultivo *in vitro* de yemas del rizoma de *Heliconia psittacorum*.

Roca y Mroginski, (1991); Los antibióticos aplicados al medio de cultivo pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes, solo si, su empleo se justifica en casos de excepción debido a que tales componentes modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes.

Kress, 1998 (Citado por Sosa, 2004), La importancia principal de este grupo taxonómico está en su popularidad como plantas ornamentales, por lo llamativo de sus inflorescencias, siendo a la vez, una característica importante para distinguirlas en el campo, dado su colorido y su forma. Su crecimiento aglomerado las hace una especie apta para la protección de laderas erosionadas y nacimientos de quebradas. También se aprovechan con arte y gracia en los jardines modernos, utilizándose para formar senderos laterales a las entradas de las haciendas y fincas de recreo.

Berry & Kress, 1998 (Citado por Sosa, 2004); *Heliconia psittacorum* es una de las especies más comerciales, con mayor número de variedades y tal vez la más estudiada por presentar inflorescencias pequeñas y de fácil manejo.

Krikorian, 1991 (Citado por Sosa, 2004), Las ventajas de la técnica de cultivo *in vitro* es que permite obtener altos volúmenes de plantas en un periodo de tiempo relativamente corto, se logra una alta homogeneidad en las características fenotípicas y genéticas de la plantación, además, se eliminan la mayoría de los patógenos que afectan el cultivo en las condiciones naturales.

Pedersen, et al 1992 (citado por Isaza, 2004), en la propagación *in vitro* de heliconias, los rizomas subterráneos son la única fuente de brotes axilares, los cuales son más susceptibles a contaminarse por el contacto directo con el suelo, razón por la cual la desinfección de estos explantes es un gran problema.

Pinedo, et al 2010; Las heliconias, son plantas conocidas en la Región Loreto como "platanillos" o "situlli". Las comunidades locales han usado sus hojas desde tiempos inmemoriales para envolver y conservar alimentos como quesos, carnes, tamales, fiambres, etc. Ciertas partes de la planta: los rizomas por ejemplo, son utilizadas en ocasiones con fines alimenticios, medicinales y hasta mágicos o como colorantes. En tiempos recientes, se ha despertado un inusitado interés por conocer más acerca de estas plantas, sobre todo porque son un recurso horticultural promisorio, tanto para la producción de flores de corte por sus características comerciales (Tabla 1), como por su valor decorativo como plantas de jardín. Este interés se vio reflejado en la creación, en 1985, de la Sociedad Internacional de Heliconias-HSI, Heliconia Society Internacional), dentro de la cual se agrupan todos los entusiastas, científicos y cultivadores de las heliconias y plantas afines (**Kress, Betancur y Echeverry 1,999.**)

Tabla 1: Características comerciales de cada Variedad.

características variedad	Long. del tallo (cm)	Peso de flor (g)	Duración post corte (días)	Peso del rizoma (g)	Inflorescencia comercial (brácteas)	Numero de flores por planta
She	77	500	14	400	2 - 4	2
Edge of Nite	67	850	18	200	3 - 4	3
Bicolor	75					2
Fire Opal	117	129	17	151	1 - 3	5
Golden Torch	73	87	14	41	2 - 3	19

Pinedo, et al. 2010; La actividad de las flores y plantas ornamentales está considerada como un rubro muy interesante para potenciar la economía, mediante la exportación a lugares nacionales e internacionales. Se tiene los ejemplos de desarrollo de esta actividad países como Holanda, primer productor y exportador de flores, seguido de Colombia y últimamente Ecuador que ha repuntado a nivel de Latinoamérica, exportando flores a Estados Unidos.

Pinzón G, Y. D. 2003. (Citado por Pinedo, et al. 2010), Los principales productores y exportadores de Heliconias son Costa Rica, Hawaii, Puerto Rico, Jamaica, Colombia, entre los principales. El precio en el mercado internacional está entre 0.3 y 2 dólares dependiendo la variedad, así mismo el precio de venta en las floristerías de estados unidos, puede estar entre 4 y 8 dólares por tallo o flor.

Pinedo, et al. (2010); Las heliconias desempeñan un papel ecológico importante dentro de los ecosistemas, en algunos ecosistemas actúan como plantas pioneras en el proceso de regeneración natural de la vegetación y restauración del suelo

degradado. Además mantienen importantes relaciones coevolutivas con otras especies animales y vegetales.

Castro, 1993; Meza, V. K. 2003 (Citado por Pinedo, et al. 2010); La importancia económica de las heliconias radica en la exuberancia y belleza de sus inflorescencias que son utilizadas como plantas de jardines, así como flores de corte, observándose un incremento en su comercialización en los mercados locales, nacionales e internacionales. Las características que favorecen la aceptación en los consumidores, es la belleza y exotividad de las brácteas que envuelven las flores muy vistosas y de colores llamativos, muchas veces con tonalidades contrastantes, además de presentar rusticidad, resistencia al transporte y una larga durabilidad post cosecha.

Sosa, (2004). Menciona que en la desinfección de ápices de *Heliconia standleyi* macbride existe una tendencia a la disminución de la contaminación, en la medida que se aumenta la concentración del desinfectante (NaOCl) y el tiempo de exposición de los explantes; y con relación a la necrosis, al aumentar la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición de los explantes, se incrementa los explantes necrosados. Por lo tanto demostró que existe una alta eficiencia en la desinfección de los ápices con el empleo de hipoclorito de sodio al 2%, durante 15 minutos.

Sosa, 2004. Los ápices de *Heliconia standleyi* macbride cultivados en el medio semisólido mostraron fenolización alrededor de los mismos, lo que provoca intoxicación del explante y retardo del crecimiento ya que se inhibe la actividad enzimática. Pero con el uso del medio líquido se disminuye este problema ya que permite diluir con mayor facilidad los metabolitos tóxicos que afectan el desarrollo de los explantes.

Atehortua, 1997 (Citado por **Viegas, 2005**) Los métodos Biotecnológicos como el cultivo *in vitro* puede contribuir a solucionar algunas restricciones para el cultivo de heliconia como la larga temporada requerida para la germinación de la semilla y la multiplicación subterránea del rizoma que toma un tiempo largo (de tres meses para un año).

Atehortua, 1997 y **Días & Viegas, 2001** (Citado por **Viegas, 2005**), En sus estudios de cultivo *in vitro* de Heliconias reportan la presencia de bacterias endófitas del genero *Pseudomonas*. Para lo cual recomiendan el uso de antibióticos en el medio de cultivo sin que se altere el explante.

Viegas, 2005, El empleo del antibiótico cefotaxime a concentración de 500 mg/l fue eficiente en el control de bacterias endófitas del genero *Pseudomonas* y *Klebsiella*, en el establecimiento *in vitro* de *Heliconia rauliniana*.

2.1 PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS:

Ho: La exposición a tiempos prolongados de altas concentraciones de hipoclorito de sodio, sin la utilización de un compuesto Tensoactivo controla de manera significativa la contaminación de los explantes en el cultivo *in vitro* de Heliconias

Ha: La exposición a tiempos prolongados de bajas concentraciones de hipoclorito de sodio, utilizando un compuesto Tensoactivo controla de manera significativa la contaminación de los explantes en el cultivo *in vitro* de Heliconias

III. OBJETIVOS

3.1. General

Determinar un protocolo de desinfección y establecimiento *in vitro* de cinco variedades comerciales de heliconias a partir de diferentes propágulos vegetativos con fines de producción masiva en la Región Loreto.

3.2. Específicos

1. Determinar una metodología de desinfección para el establecimiento *in vitro* de dos tipos de propágulos en cinco variedades comerciales de heliconias.
2. Determinar el propágulo adecuado resistente para el cultivo *in vitro* en cinco variedades comerciales de heliconias.
3. Determinar el medio de cultivo adecuado para el cultivo *in vitro* de dos tipos de propágulos en cinco variedades comerciales de heliconias.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. LUGAR DE ESTUDIO

El trabajo de investigación, se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Estación Experimental Agraria "San Roque"- Iquitos, del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), cuyas coordenadas geográficas es la siguiente: Latitud 3° 47' 15" S y Longitud 073° 17' 42" O.

4.2. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado para el cultivo *in vitro* fueron 2 tipos diferentes de propágulos, extraídos de plantas de Heliconias morfológicamente típicas de su género; para esto se utilizó cinco variedades dentro de dos especies botánicamente identificados que son: *Heliconia orthotricha* L. Anderson; con las variedades "Bicolor", "She" y, "Edge of nite", y la especie *Heliconia psittacorum* L.F, con las variedades "Golden torch" y "Fire opal".

En consecuencia, de cada variedad, se utilizaron como propágulos de trabajo: Yemas del rizoma (Anexo3 - Foto 06) y Ápices florales (Anexo 3 - Foto 10), haciendo de cada uno de ellos un ensayo diferente, para los experimentos de desinfección y establecimiento respectivamente.

4.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO HELICONIA.

TAXONOMIA: *Heliconia sp.* ; Angiosperm Phylogeny Group

III_(APG III - 2009)

Reino	: Plantae.
División	: Angiospermas
Grupo informal	: Monocots
Grupo Informal	: Commelinids
Orden	: Zingiberales Griseb. (1854)
Familia	: Heliconiaceae Vines (1895)
Género	: Heliconia
Especie	: <i>Heliconia orthotricha</i> L. Anderson <i>Heliconia psittacorum</i> L.F,

4.4. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Obtención del material vegetal en el campo

Las muestras de campo fueron colectadas de parcelas experimentales de Heliconias, ubicada por la carretera Iquitos – Zungarococha – King Kong, localizado en el distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, departamento de Loreto; con las siguientes coordenadas geográficas: 18 681524 UTM 9573636 altitud 118 msnm.

Primero se identificó taxonómicamente cada una de las variedades para luego ser seleccionados aquellos plantones que presenten características adecuadas (fisiológicas, morfológicas y fitopatológicas); ya que aquellas plantas jóvenes tienen mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas, debido a que cuanto más joven y menos diferenciado sea el

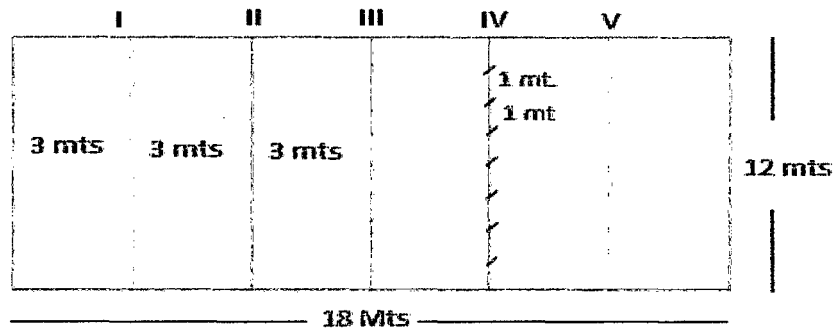
tejido que se va implantar, mejor será la respuesta al establecimiento "*in vitro*". Sosa, 2004

Se procedió a realizar deshierbo a través de un plateo alrededor de las plantas seleccionadas, y con la ayuda de una pala recta, fueron retirados las plantas.

Una vez extraída la planta, se limpió de la tierra circundante en el rizoma, se envolvieron con papel periódico húmedo para no sufrir deshidratación de tejidos, hasta su transporte al invernadero de la Estación Experimental Agraria "San Roque" para su desinfección superficial.

4.5. INSTALACIÓN DE UNA PARCELA EXPERIMENTAL

Los plantas provenientes de las parcelas experimentales, fueron cortados hasta una altura de 15 cm. desde el rizoma y se descartó aquellas envolturas foliares secas y deterioradas, para luego ser lavadas con abundante agua limpia, seguidamente estas muestras cortadas se sumergieron en una solución antifúngica de Vitavax al 5% por 10 minutos (Anexo 3 – Foto 2), para su respectiva siembra en una parcela de 216 m² que fue instalada dentro de la Estación Experimental "San Roque" – INIA (Anexo 3 – foto 3). En dicha parcela la siembra fue sistemática, según las variedades de Heliconias acopiadas, de esta manera ayudar al brotamiento respectivo de los hijuelos a experimentar (Anexo 3 - Foto 4).



Dónde:

- I. Especie: *Heliconia orthotricha* var. She
- II. Especie: *Heliconia psittacorum* var. Fire Opal
- III. Especie: *Heliconia psittacorum* var. Golden Torch
- IV. Especie: *Heliconia orthotricha* var. Bicolor
- V. Especie: *Heliconia orthotricha* var. Edge of Nite

Las plántulas de dicha parcela fueron sometidas a un tratamiento fitosanitario con Bayfolan a razón de 2 ml/L y Tamarón 2 ml/L cada 2 semanas hasta obtener plantas apropiadas para el inicio en el desarrollo de los experimentos.

4.6. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo se preparó de acuerdo al tipo de experimento, en lo cual, la desinfección se realizó en Medio de Cultivo M&S 100% de consistencia líquida sostenida con papel filtro, con diferentes concentraciones de desinfectantes para cada tipo de propágulo; cambiando esto en el establecimiento, pues aquí se añadieron Fitoreguladores y el phytigel como gelificante al medio, obedeciendo los objetivos de la investigación.

El medio de cultivo utilizado, es conformado por las sales inorgánicas del medio propuesto por Murashige y Skoog M&S (1962) dosis completa. El pH de los medios se ajustó a 5.7-5.8 previo a la esterilización y como gelificante se utilizó Phytigel a razón de 2 g/L. solo en el caso del experimento de Establecimiento.

Para la preparación del medio de cultivo, fue necesario las sales minerales (macro y micro elementos) preparados previamente en soluciones stock o madre: Para preparar un litro de medio de cultivo de Murashige & Skoog es necesario los siguientes volúmenes de cada solución stock. Según el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, EEA – INIA: (Anexo 1)

Stock A	: 40 ml. / litro
Stock B	: 10 ml. / litro
Stock C	: 10 ml. / litro
Stock D	: 10 ml. / litro
Stock E	: 10 ml. / litro

Primero, en un matraz de Erlenmeyer se añadió el volumen total de medio a preparar para ser marcado y tener en cuenta en el momento de enraizar, luego se depositó en otro recipiente la mitad de mencionado volumen. Inmediatamente con la ayuda de un agitador magnético se completó y mezclaron de la manera más homogénea posible las soluciones stock (A, B, C, D, E) que fueron agregados en orden, pues ya estuvieron diluidos según el volumen del medio.

Una vez puestos las soluciones stock en el matraz de Erlenmeyer, se añadieron los compuestos sólidos, tanto Sacarosa que es utilizado como fuente carbono a razón 30 g/l. y el Phytigel como gelificante a razón de 2 g/l. Con los insumos completos ya colocados en el matraz y a una

constante agitación para la dilución completa se enrasó con agua destilada hasta el volumen total de medio de cultivo destinado.

Con el medio ya homogenizado se ajustó el pH en 5.7-5.8; con Hidróxido de Sodio (NaOH) para virar a alcalinidad y Ácido Clorhídrico (HCl) para la acides, proceso que es previo a la esterilización. Después de preparar el medio se llevó al punto de ebullición con la ayuda de una cocina; para distribuirlos ya en los tubos de ensayo, aproximadamente de 5 ml de medio por cada tubo.

Con el medio de cultivo en los tubos, se procedió a su respectiva esterilización en el autoclave a una temperatura de 121 °C a 15 Lb de presión durante 15 minutos, con lo cual el medio de cultivo ya estuvo listo para los trabajos de desinfección de los 2 tipos de Propágulos a trabajar.

Cabe mencionar que el medio de cultivo detallado es el M&S 100% básico para la desinfección solo se omitió el Phytigel y para el establecimiento se añadieron las Fitoreguladores que son de consistencia solida con lo cual solo pesamos lo correspondiente y de no poder tener los decimales exactos se procedieron a preparar soluciones stock con estos compuestos para así añadir la cantidad correspondiente.

Preparación del Hipoclorito de Sodio

Para la preparación de las concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) primero se diluyó la concentración del producto comercial (cuya concentración es de 5.25% de cloro activo), según la metodología planteada para cada propágulo con la fórmula analítica para los trabajos de insumos líquidos:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Dónde: V = Volumen (ml)

C = Concentración (%)

Una vez diluidos las concentraciones de NaOCl para los procesos de desinfección de los Propágulos, fueron colocados en 3 recipientes constituidos de tres concentraciones diferentes con 10 repeticiones en cada una de ellas durante 45 minutos en agitación.

Con la desinfección buscamos determinar concentraciones adecuadas que mantengan al explante en el medio libre de microorganismos patógenos, ya que el mejor resultado obtenido en la sobrevivencia del explante en las evaluaciones de los 6 tratamientos será usada en el proceso de desinfección del segundo experimento de Establecimiento *in vitro*.

4.7. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

4.7.1. Desinfección de Yemas del Rizoma extraídas de la parcela Experimental "EEA" San Roque.

Dichas plantas jóvenes fueron extraídas de la parcela experimental instalada en la EEA – INIA; y sometidas a un primer lavado con abundante agua limpia, para así librarlos de contaminantes. Luego, fueron cortados a una altura aproximadamente de 10 cm. dejando el rizoma y parte de las envolturas foliares. (Anexo 3 - Foto 07)

A continuación con la ayuda de un cepillo, se lavó con abundante agua limpia y detergente para minimizar contaminantes. Una vez lavados superficialmente, fueron sometidos a una solución desinfectante con PINESOL (cuya principio activo es Cloruro de Benzalconio 0.16 %) durante 24 horas (Anexo 3 - Foto 08). Transcurrido este tiempo fueron

lavados con abundante agua limpia y trasladados al laboratorio para su posterior procedimiento de desinfección de profundidad y obtención del explante adecuado.

Desinfección de Yemas del Rizoma en el laboratorio.

Los segmentos de plántulas de 10 centímetros, en el laboratorio fueron cortados a una altura de 4 cm y 1.5 cm de base aproximadamente, para luego ser sometidos a una solución de TWEEN 80 (tensoactivo) a 3 ml/L durante 10 minutos, con la finalidad de disociar las moléculas de agua, desestabilizando la tensión superficial que rodea al explante y de esta manera tener una mejor acción del desinfectante.

En la cámara de flujo laminar y transcurrido el tiempo con el tensoactivo, el material vegetal se sumergió en una solución de NaOCl (hipoclorito de sodio) a concentraciones de 3%, 4% y 5% durante 45 minutos. Esperando saber cuál de estas concentraciones son adecuadas para el cultivo *in vitro* de heliconias. (Anexo 3 – Foto 9)

Seguidamente se lavaron con agua destilada estéril y los tres enjuagues consecutivos durante 10 minutos con una solución de Ácido Cítrico y Ácido Ascórbico a una concentración de 1 g/L respectivamente, con la finalidad de minimizar la fenolización de los explantes.

A continuación los explantes se cortaron a una altura de 1 cm y 0.5 cm de base aproximadamente y sembrados en el medio de cultivo.

4.7.2. Desinfección de Ápices florales

Se colectaron flores de las parcelas experimentales en “King Kong”.

Para la colección del material vegetal fueron extraídos aquellas flores cuyo extremo apical que aún contengan las brácteas cerradas. (Anexo 3 - Foto 10) pues estas poseen una protección natural contra agentes patógenos, estas colectas fueron envueltas con papel absorbente y codificadas, con esto se colocaron en un recipiente y humedecidas con agua de lluvia para contrarrestar la deshidratación de las mismas.

En el laboratorio, Los segmentos de flores (ápice floral), fueron lavados con agua limpia y detergente, para luego ser cortados en su extremo apical, con la finalidad de que, los desinfectantes penetren y actúen en el interior de las muestras florales.

Fueron sumergidas en una solución de TWEEN 80 (Tensoactivo) a 3 ml/L durante 10 minutos, con la finalidad de disociar las moléculas de agua desestabilizando la tensión superficial que rodea al explante y de esta manera tener una mejor acción del desinfectante (NaOCl).

En la cámara de flujo laminar y transcurrido el tiempo con el tensoactivo, el material vegetal fue sumergido en una solución de NaOCl (hipoclorito de sodio) a concentraciones de 1%, 2% y 3% durante 15 minutos asumiendo estas concentraciones ya que los ápices florales están menos expuestos a sustratos contaminantes como los rizomas.

Seguidamente se lavaron con agua destilada estéril y los tres enjuagues con una solución de Ácido Cítrico y Ácido Ascórbico a una concentración de 1 g/L respectivamente, con la finalidad de minimizar la fenolización de los explantes.

A continuación, con la ayuda del bisturí y pinza estériles se procedió a liberar las brácteas que envolvían al ápice floral, Luego se sembraron con

la ayuda de pinzas en los tubos conteniendo el Medio de Cultivo Líquido M&S (1962), al cual se adicionaron 3 gotas de un antibiótico de amplio espectro **Rifampicina** a una concentración de 300 mg/L, según el tratamiento. Se cerraron los tubos y se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de 23 ± 1 con luz constante.

4.8. SIEMBRA DEL MATERIAL VEGETAL

En la cámara de flujo laminar los explantes desinfectados, fueron sacados de los frascos uno a uno con una pinza y colocados sobre el papel estéril; donde, con la ayuda de pinzas y bisturíes, se procedió a separar los primordios foliares (yemas de rizoma) que cubren al meristemo hasta una altura de 1 cm y 0.5 cm de base aproximadamente y las brácteas (ápices florales). Una vez obtenido el tamaño adecuado del explante, se sembraron con la ayuda de una pinza en los tubos de ensayo conteniendo el medio basal M&S (1962) sin hormonas, al cual se adiciono 3 gotas de antibiótico Rifampicina a una concentración de 300 mg/L (Anexo 3 – Foto 11). Se sellaron los tubos conteniendo los explantes y se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de 23 ± 1 con luz constante.

4.9. ENSAYOS EXPERIMENTALES

ENSAYO 01. Establecimiento de yemas del rizoma de *Heliconia* sp.

A. Desinfección:

Medio de cultivo

El medio que se utilizo en este experimento fue de consistencia líquida utilizando como soporte papel filtro, compuesto por las sales inorgánicas del medio propuesto por Murashige y Skoog (1962), a

dosis completa. El pH del medio fue ajustado a 5.7 - 5.8 previo a la esterilización

Fuente de Variación. Yemas del rizoma de *Heliconia* Sp.

- *Heliconia orthotricha* var. "Bicolor"
- *Heliconia orthotricha* var. "She"
- *Heliconia orthotricha* var. "Edge of nite"
- *Heliconia psittacorum* var. "Golden torch"
- *Heliconia psittacorum* var. "Fire opal"

Diseño Metodológico

1. Factor A: Rifampicina (300 mg/L 3gotas.)

A₁ = No Rifampicina

A₂ = Si Rifampicina

2. Factor B: Concentración de NaOCl /45 minutos

B₁ = 3%

B₂ = 4%

B₃ = 5%

Acopio de variable durante evaluación

Tto 1	:	No Rifampicina	+	3 % NaOCl
Tto 2	:	Si Rifampicina	+	3 % NaOCl
Tto 3	:	No Rifampicina	+	4 % NaOCl
Tto 4	:	Si Rifampicina	+	4 % NaOCl
Tto 5	:	No Rifampicina	+	5 % NaOCl
Tto 6	:	Si Rifampicina	+	5 % NaOCl

Todo esto con la finalidad de seleccionar una concentración adecuada de desinfección, la cual se utilizó para la etapa de establecimiento de los nuevos explantes.

B. Establecimiento:

Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó en este experimento fue de consistencia sólida, que estuvieron compuestos por las sales inorgánicas del medio propuesto por Murashige y Skoog (1962), a dosis completa; además se usaron la fitohormona Bencil Amino Purina a 2mg/l; Acido Indol Butírico a 10 mg/l y Tiamina 1g/L. El pH de los medios fue ajustado a 5.7 - 5.8 previo a la esterilización y como gelificante se utilizó Phytigel a razón de 2g/L. para su desinfección se utilizó la concentración de NaOCl y el uso del antibiótico que dio como mejor resultado del ensayo anterior, incluyendo en este experimento las dos metodologías que primero se estableció en medio de cultivo M&S líquido para luego ser transferido a los tres días de la siembra al medio de cultivo enriquecido mencionado.

Fuente de variación: Yemas de *Heliconia* sp.

- *Heliconia orthotricha* var. "bicolor"
- *Heliconia orthotricha* var. "She"
- *Heliconia orthotricha* var. "Edge of nite"
- *Heliconia psittacorum* var. "Golden torch"
- *Heliconia psittacorum* var. "Fire opal"

Diseño Metodológico

1. Factor A: Bencil Amino Purine

A₁ = BAP 2 mg/l

A₂ = BAP 5 mg/l

Factores constantes:

- pH
- Sacarosa : fuente de carbono
- Explante por tubo: 60 YEMAS
- Ac. Ascórbico y Ac. Cítrico (1g/L) : Antioxidante
- Tween 80: tensoactivo

ENSAYO 02. Establecimiento de ápice floral de *Heliconia sp.*

A. Desinfección:

Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó en este experimento fue de consistencia líquida utilizando como soporte papel filtro. Compuesto por las sales inorgánicas del medio propuesto por Murashige y Skoog (1962), a dosis completa. El pH del medio fue ajustado a 5.7 - 5.8

Fuente de Variación. Ápice floral de *Heliconia Sp.*

- *Heliconia orthotricha* var. "Bicolor"
- *Heliconia orthotricha* var. "She"
- *Heliconia orthotricha* var. "Edge of nite"
- *Heliconia psittacorum* var. "Golden torch"
- *Heliconia psittacorum* var. "Fire opal"

Diseño Metodológico

1. Factor A: Rifampicina (300 mg/L / 3gotas.)

A₁ = Si Rifampicina

A₂ = No Rifampicina

2. Factor B: Concentración de NaOCl /15 minutos

B₁ = 1%

B₂ = 2%

B₃ = 3%

Acopio de variable durante evaluación

Tto 1	:	No Rifampicina	+	1 % NaOCl
Tto 2	:	Si Rifampicina	+	1 % NaOCl
Tto 3	:	No Rifampicina	+	2 % NaOCl
Tto 4	:	Si Rifampicina	+	2 % NaOCl
Tto 5	:	No Rifampicina	+	3 % NaOCl
Tto 6	:	Si Rifampicina	+	3 % NaOCl

B. Establecimiento:

Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó en este experimento será de consistencia sólida, que estuvieron compuestos por las sales inorgánicas del medio propuesto por Murashige y Skoog (1962), a dosis completa; además se usaron la hormona BAP a 2mg/L; AIB a 10 mg/L y Tiamina 1g/L. El pH de los medios fue ajustado a 5.7 - 5.8 previo a la esterilización y como gelificante se utilizó Phytigel a razón de 2g/L; para su desinfección se utilizó la concentración de NaOCl y el uso del antibiótico que dio como mejor resultado del ensayo anterior,

incluyendo en este experimento las dos metodologías que primero se estableció en medio de cultivo M&S líquido para luego ser transferido a los tres días de la siembra al medio de cultivo enriquecido mencionado.

Fuente de Variación: Yemas de *Heliconia* sp.

- *Heliconia orthotricha* var. "bicolor"
- *Heliconia orthotricha* var. "She"
- *Heliconia orthotricha* var. "Edge of nite"
- *Heliconia psittacorum* var. "Golden torch"
- *Heliconia psittacorum* var. "Fire opal"

Diseño Metodológico

1. Factor A: Bencil Amino Purine

A₁ = BAP 2 mg/l

A₂ = BAP 5 mg/l

Factores constantes:

- pH
- Sacarosa: fuente de carbono
- Explante por tubo: Ápice floral
- Ac. Ascórbico y Ac. Cítrico (1g/l) : Antioxidante
- Tween 80 : Tensoactivo

4.10. EVALUACIONES

Las evaluaciones se establecieron según el tipo ensayo. En cuanto a la desinfección de los explantes en general se evaluaron cada tres días durante 15 días, previendo las actividades reproductivas de los microorganismos patógenos para luego ser transferidos a otros medios estériles. Se retiraron aquellos tubos que presentaron contaminación y los no contaminados continuaron en las evaluaciones posteriores del tratamiento en estudio (Anexo, Foto 12). Para el ensayo de establecimiento las evaluaciones también se llevaron a cabo cada tres días por el mismo principio. Cada evaluación tendrá apunte según las variables indicadas:

Experimento 01: Desinfección

FACTOR A: TIPOS DE PROPAGULOS

A₁: Yemas del rizoma

A₂: ápices florales

FACTOR B: DESINFECTANTES

B₁: Hipoclorito de Sodio (Bactericida)

B₂: Rifampicina (antibiótico)

NUMERO DE REPETICIONES: 10 tubos por Tratamiento.

VARIABLES A EVALUAR:

- **CONTAMINACIÓN:**

0 = Contaminó

1 = No contaminó

- **OXIDACIÓN:**

0 = 0% propágulo

1 = 25% propágulo

2 = 50% propágulo

3 = 100% propágulo

Experimento 02: Establecimiento

FACTOR A: TIPOS DE PROPAGULOS

A₁: Yemas del rizoma

A₂: Ápices florales

FACTOR B: MEDIO DE CULTIVO M&S

B₁: M&S 100%

B₂: BAP (Bencil Amino Purina)

B₃: AIB (Ácido Indol Butílico)

B₄: Tiamina

NUMERO DE REPETICIONES: 10 tubos por tratamiento

- **VARIABLES A EVALUAR:**

- **CONTAMINACIÓN:**

0 = Contaminó

1 = No contaminó

- **OXIDACIÓN:**

0 = 0% propágulo

1= 25% propágulo

2= 50% propágulo

3=100%propágulo

- **FORMACIÓN DE BROTES**

0 = Formación

1 = No formación

- **CRECIMIENTO:**

Altura (mm)

Longitud de raíz (mm)

Numero de hojas

4.11. DISEÑO ESTADISTICO

Para el análisis de datos de las evaluaciones planteadas en los experimentos del proyecto durante la desinfección y el desarrollo del establecimiento de los dos propágulos de variedades de Heliconias es como sigue:

Mediante el muestreo simple directo de los tubos se pudo determinar el estado de infección para el caso de bacterias e infestación para hongos oportunistas en los propágulos que se encuentren en estudio y las respuestas que los explantes tengan al medio de cultivo al cual fueron sometidos en la fase de establecimiento; con ello expresar descriptivamente gráficos de barras según la variable supervivencia y el respectivo Análisis de sobrevivencia de los explantes en los tratamientos de desinfección con el fin de dar a conocer la latencia del material biológico y las proporciones de brote de los explantes. Este examen cuantitativo de la fase de establecimiento se completó con el respectivo **Análisis de Varianza (ANVA)** mediante un **Diseño Completamente al Azar (DCA)** de los factores y los efectos que causan en los explantes con las respectivas pruebas diferencia mínimas significativas honestas de Tukey con ordenamiento de datos en el programa estadístico SPSS v. 18.0.

V. RESULTADOS

5.1. Desinfección de Propágulos de Cinco Variedades de Heliconia.

5.1.1. Yemas del rizoma Heliconia sp.

A. Contaminación

En la Tabla 2 se observa los niveles de significancia de los factores variedad y tratamiento con relación a la variable dependiente de contaminación; de los cuales el factor tratamiento presenta significancia muy alta; el factor variedad presenta significancia moderada y la interacción de ambos factores es significativa.

Contrastando este resultado en la Tabla 3 y Tabla 4 con las pruebas de diferencia significativa mínima de Tukey y Duncan para los factores variedad y tratamiento respectivamente.

Tabla 1: Análisis de varianza para la variable contaminación en Yemas del rizoma

Origen	Suma de cuadrado	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	20,587 ^a	29	,710	3,758	,000
Intersección	46,413	1	46,413	245,718	,000
Variedad de Heliconia	3,120	4	,780	4,129	,003
Tratamiento	10,187	5	2,037	10,786	,000
Variedad de Heliconia* Tratamiento	7,280	20	,364	1,927	,011
Error	51,000	270	,189		
Total	118,000	300			
Total corregida	71,587	299			

En la Tabla 3 se observa las pruebas de contraste de tukey y Duncan para determinar cuál de las variedades presentan menores niveles de contaminación, mostrando así que para la prueba de tukey, las variedades Fire Opal y Golden Torch presentan niveles menores de

contaminación, y las demás variedades los niveles de contaminación son más elevados. Y para la prueba de Duncan las variedades Fire Opal, Golden Torch, She y Bicolor los niveles de contaminación son mínimos, difiriendo con la variedad Edge of Nite la contaminación es elevada.

Tabla 2: Pruebas de contraste para la variable contaminación según variedades en Yemas del rizoma

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

En la Tabla 4 se observa el contraste para la variable contaminación; las prueba de diferencia mínimas significativa (DMS) de tukey, indican que los tratamientos T2, T6 y T4 expresan niveles bajos en contaminación de los explantes; dando credibilidad a esto la prueba de Duncan que también expresa que los mejores tratamientos son T2, T6 y T4 para realizar ensayos de desinfección de heliconias.

Tabla 3: Pruebas de contraste para la variable contaminación según tratamiento en Yemas del rizoma

Tratamientos	Tukey	Duncan
T2: NaOCl 3% + Antib.	0,18 a	0,18 a
T6: NaOCl 5% + Antib.	0,22 ab	0,22 a
T4: NaOCl 4% + Antib.	0,26 ab	0,26 a
T1: NaOCl 3%	0,46 bc	0,46 b
T5: NaOCl 5%	0,58 c	0,58 bc
T3: NaOCl 4%	0,66 c	0,66 c

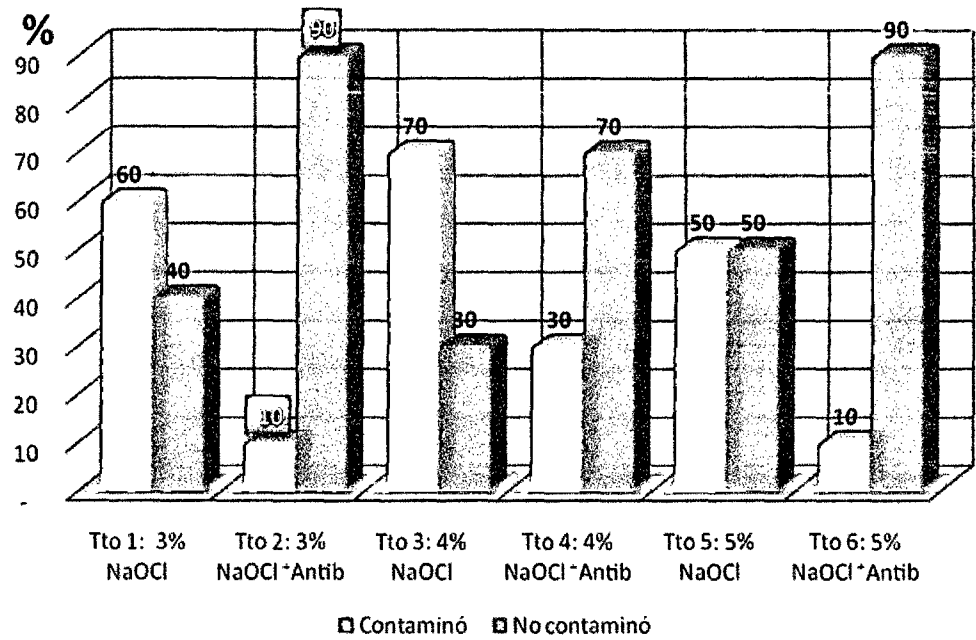


Gráfico 1: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de *Heliconia orthotricha* var. "Bicolor"

El Gráfico 01 expresa los porcentajes de contaminación comparados entre los tratamientos de desinfección aplicados a los yemas de rizoma de la especie *Heliconia orthotricha* var. Bicolor en los cuales se observa que los tratamientos 2 y 6 con 3% y 5% de NaOCl respectivamente, tienen niveles de desinfección elevados con 90 %. Los tratamientos 3 y 4 presentaron alto porcentaje de contaminación entre 60 % y 70 % respectivamente.

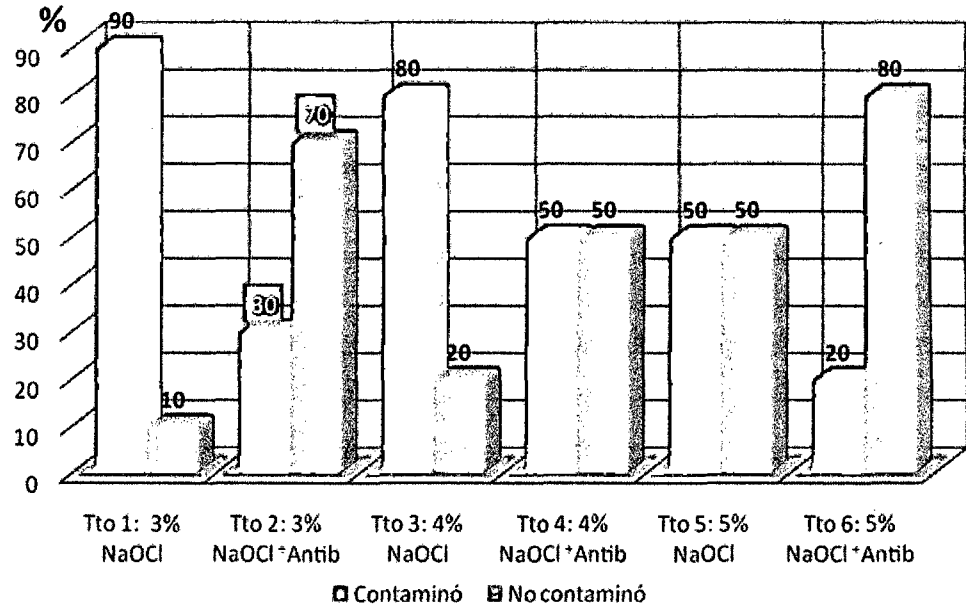


Gráfico 2: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de *Heliconia orthotricha* var. "Edge Of Nite"

El grafico 02 expresa los porcentajes de contaminación de los tratamientos aplicados a los ápices de rizoma de la especie *Heliconia orthotricha* var. "Edge Of Nite" en los cuales podemos observar que tanto los tratamientos 2 y 6 con 3% de NaOCl y 5% de NaOCl presentan altos niveles de desinfección con 70 % y 80 % respectivamente. Los tratamientos 1 y 3 presentaron alto porcentaje de contaminación con 90 % y 60 % respectivamente.

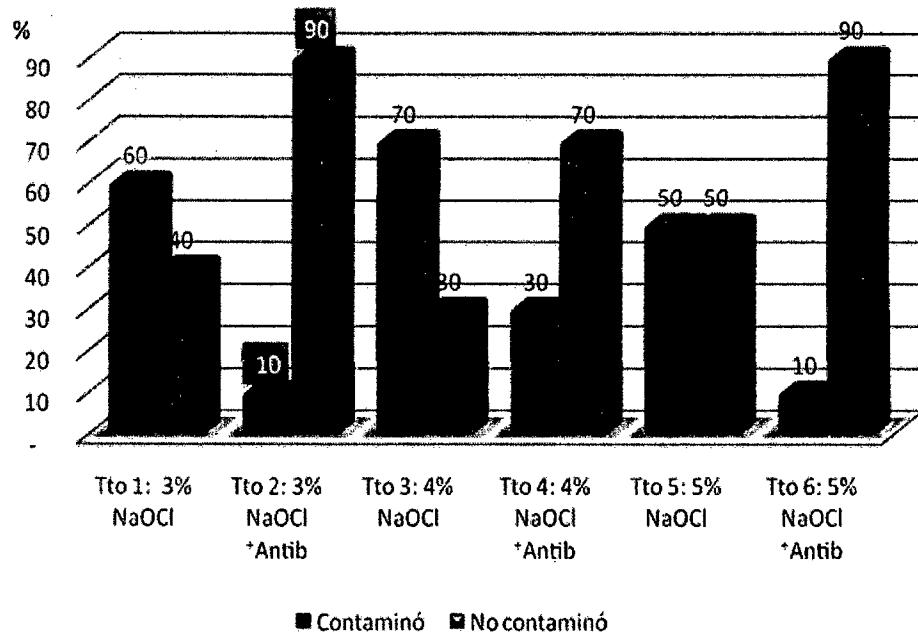


Gráfico 3: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de *Heliconia orthotricha* var. "She"

El Gráfico 3 expresa los porcentajes de contaminación comparados entre los tratamientos de desinfección aplicados a los yemas de rizoma de la especie *Heliconia orthotricha* var. She en los cuales se observa que los tratamientos 2 y 6 con 3% y 5% de NaOCl respectivamente, tienen niveles de desinfección elevados con 90%. Los tratamientos 1 y 3 presentaron alto porcentaje de contaminación entre 60% y 70% respectivamente.

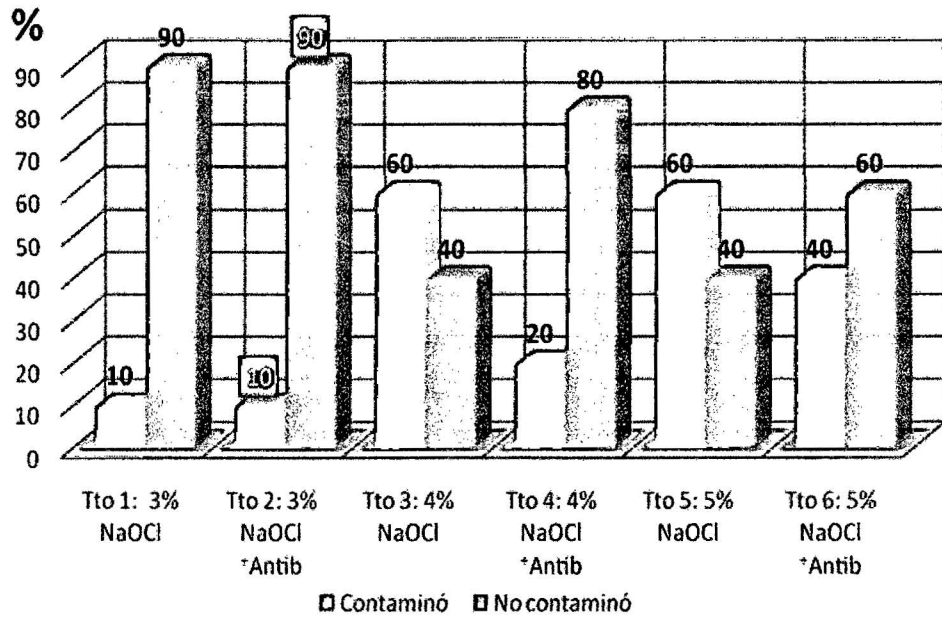


Grafico 4: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de *Heliconia psittacorum* var. "Golden Torch"

El grafico 4 expresa los porcentajes de contaminación de los tratamientos aplicados a los ápices de rizoma de la especie *Heliconia psittacorum* var. "Golden Torch" en los cuales podemos observar que tanto los tratamientos 1 y 2 con 3% de NaOCl y 3% NaOCl mas antibiótico presentan altos niveles de desinfección con 90% respectivamente. Los tratamientos 3 y 5 presentaron alto porcentaje de contaminación con 60 % respectivamente.

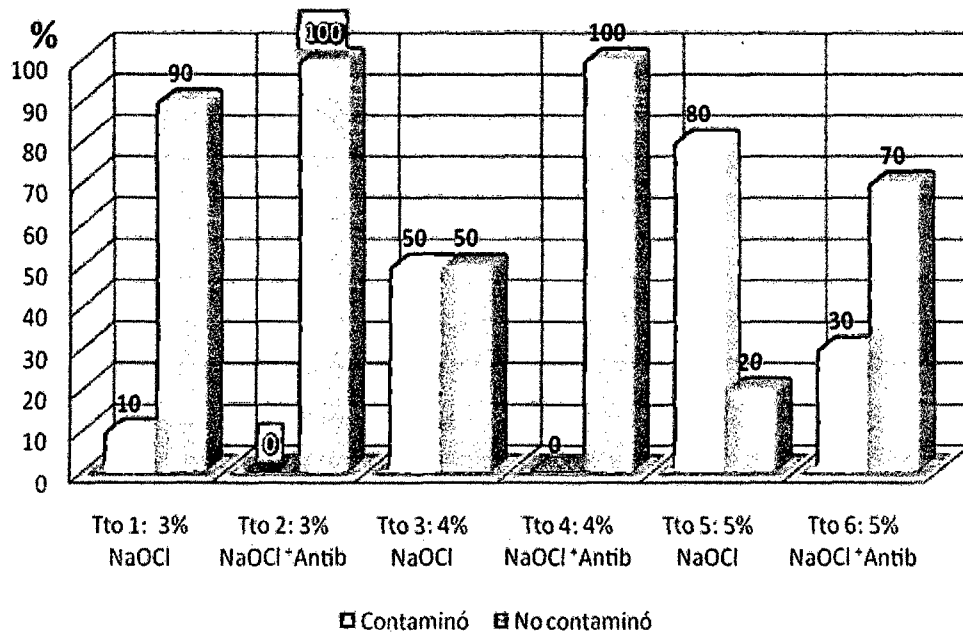


Gráfico 5: Porcentaje de Desinfección de Yemas del Rizoma de *Heliconia psittacorum* var. "Fire Opal"

El gráfico 5 expresa los porcentajes de contaminación de los tratamientos aplicados a los ápices de rizoma de la especie *Heliconia psittacorum* var. "Golden Torch" en los cuales podemos observar que tanto los tratamientos 1 y 2 con 3% de NaOCl y 3% NaOCl más antibiótico presentan altos niveles de desinfección con 90% y 100% respectivamente. Los tratamientos 3 y 5 presentaron alto porcentaje de contaminación con 50% y 80% respectivamente.

B. OXIDACION

En la Tabla 5 se observa los niveles de significancia de los factores variedad y tratamiento con relación a la variable dependiente de oxidación; expresando alta diferencia significativa en cuanto a la variedad de *Heliconia* y el tipo de tratamiento de desinfección y la interacción de ambos factores es significativa.

Contrastando este resultado en la Tabla 3 y Tabla 4 con las pruebas de diferencia significativa mínima de Tukey y Duncan para los factores variedad y tratamiento respectivamente.

Tabla 4: Análisis de varianza para la variable oxidación en Yemas del rizoma

Origen	Suma de cuadrado	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	292,350 ^a	29	10,081	11,737	,000
Intersección	1260,750	1	1260,750	1467,885	,000
Variedad de Heliconia	239,500	4	59,875	69,712	,000
Tratamiento	20,230	5	4,046	4,711	,000
Variedad de Heliconia * Tratamiento	32,620	20	1,631	1,899	,013
Error	231,900	270	,859		
Total	1785,000	300			
Total corregida	524,250	299			

En la Tabla 6 se observa las pruebas de contraste de tukey y Duncan para determinar cuál de las variedades presentan menores niveles de oxidación, mostrando así que para la prueba de tukey, la variedad Fire Opal presentan niveles menores de oxidación, difiriendo de las demás variedades que presentan niveles de oxidación más elevados. Contrastando el mismo resultado para la prueba de Duncan.

Tabla 5: Pruebas de contraste para la variable oxidación según la variedad de Heliconia en Yemas del rizoma

Variedad de Heliconia	Tukey	Duncan
Fire opal	0,45 a	0,45 a
Golden Torch	1,70 b	1,70 b
Edge of Nite	2,53 c	2,53 c
She	2,78 c	2,78 c
Bicolor	2,78 c	2,78 c

En la Tabla 7 de contraste de los efectos de oxidación se observa que la prueba de diferencia mínima significativa de Tukey, en el tratamiento 2 el efecto de la oxidación es menor a diferencia de los demás tratamientos que la oxidación es elevada y para la prueba de Duncan, el tratamiento 2 los niveles de oxidación son mínimos difiriendo del resto de los tratamientos cuya oxidación es elevada.

Tabla 6: Pruebas de contraste para la variable oxidación según el tratamiento en Yemas del rizoma

TRATAMIENTOS	Tukey	Duncan
T2: NaOCl 3% + Antib.	1,56 a	1,56 a
T6: NaOCl 5% + Antib.	2,00 ab	2,00 b
T1: NaOCl 3%	2,04 ab	2,04 b
T5: NaOCl 5%	2,04 ab	2,04 b
T4: NaOCl 4% + Antib.	2,28 b	2,28 b
T3: NaOCl 4%	2,38< b	2,38 b

5.1.2. Ápice Floral de *Heliconia* sp.

A. Contaminación

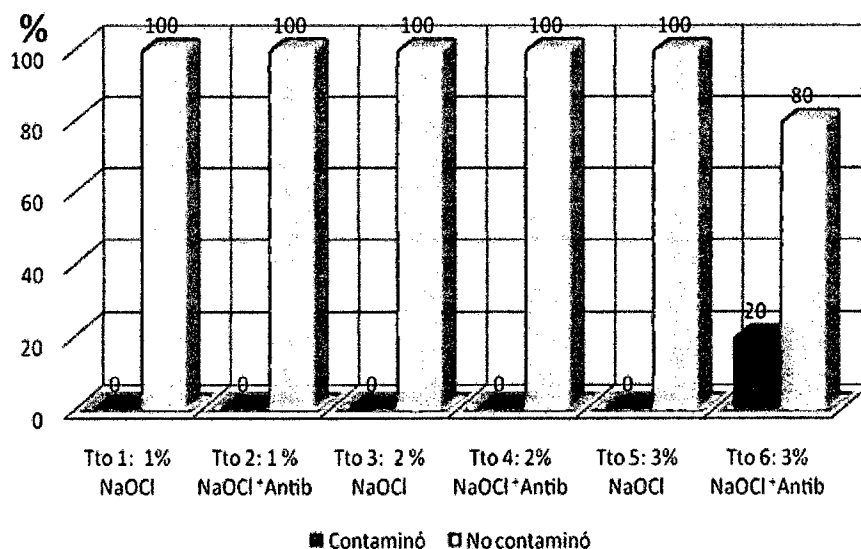


Grafico 6: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de *Heliconia* orthotricha var. "Bicolor"

En el grafico 06 se indica el nivel de asepsia es elevado en más del 80% en todos los tratamientos, observándose solo el 20% de contaminación en el tratamiento 06.

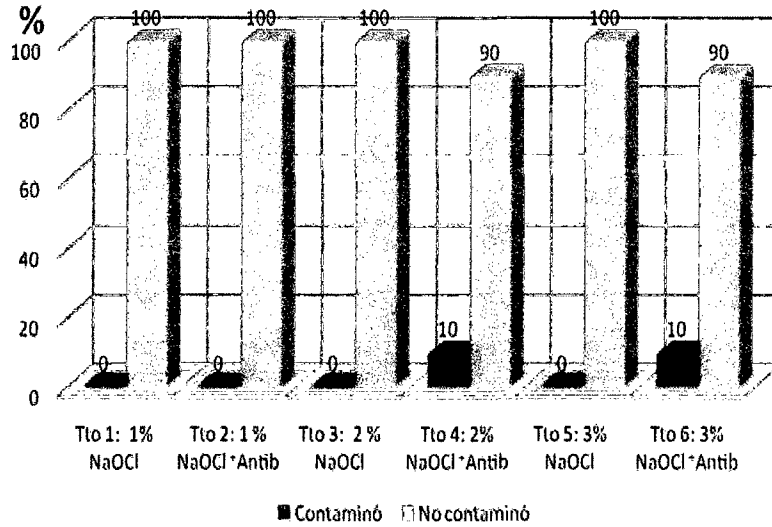


Grafico 7: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de *Heliconia orthotricha* var. "Edge Of Nite"

En el grafico 07 los tratamientos 04 y 06 presentan contaminación mínima del 10% respectivamente. El nivel de supervivencia se mantiene por encima del 90 % en todos los tratamientos

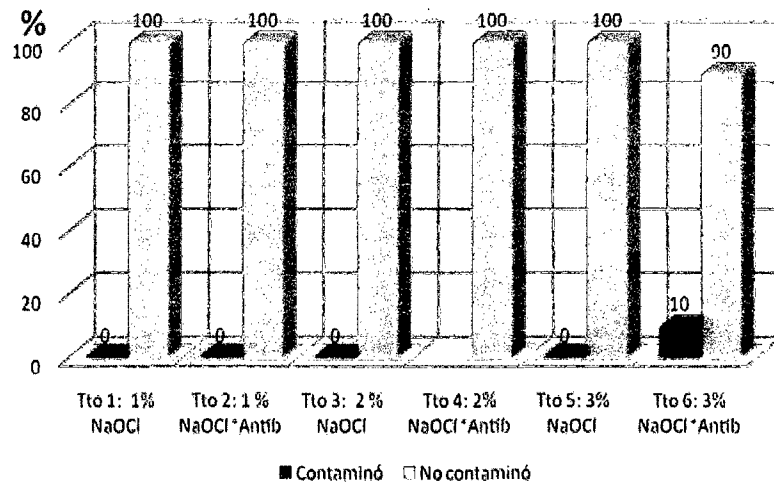


Grafico 8: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de *Heliconia orthotricha* var. "She"

En el grafico 08 se observa que el tratamiento 06 presenta el 10% de contaminación, a comparación con los otros tratamientos que el nivel de supervivencia es del 100%.

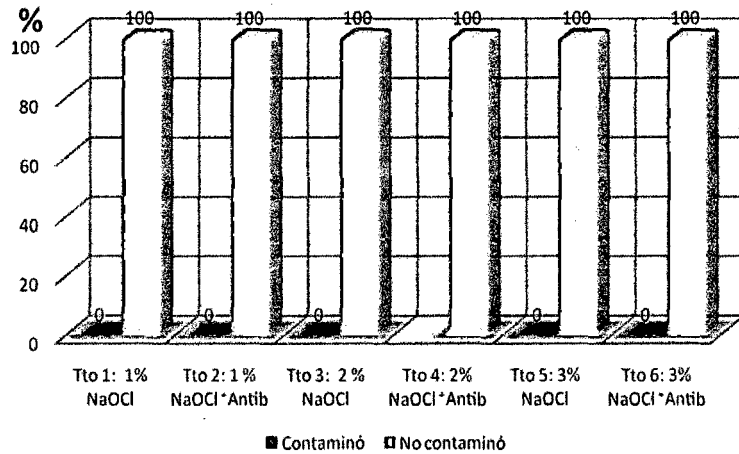


Grafico 9: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de *Heliconia psittacorum* var. "Golden Torch"

En el grafico 9 se observa que no existe diferencia entre los tratamientos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl), existiendo 100% de supervivencia.

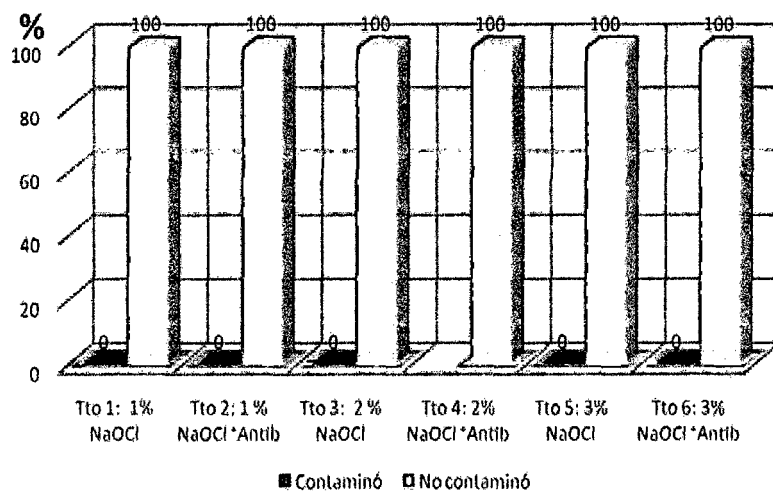


Grafico 10: Porcentaje de Desinfección de Ápices Florales de *Heliconia psittacorum* var. "Fire Opal"

Como podemos observar en el gráfico 10 de *Heliconia Psittacorum* var. **Fire opal**, los porcentajes de explantes establecidos libres de contaminantes expresan en cada uno de los tratamientos de desinfección el 100 % a las de evaluación, no existiendo diferencia entre las causas establecidas a concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) mayores ni menores.

5.2. Establecimiento de Yemas del Rizoma de Cinco Variedades de Heliconia por el Tipo de Medio

En la Tabla 8 se observa el nivel de significancia de factores de tipo de medio dentro del experimento de establecimiento con respecto a la variable latencia sometidos a los efectos del medio de cultivo; del cual el tipo de medio es significativo.

Tabla 7: Análisis de varianza para la variable supervivencia en Yemas del rizoma según el tipo de medio de cultivo

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2,250 ^a	1	2,250	10,756	,001
Intersección	42,250	1	42,250	201,976	,000
Medio de cultivo	2,250	1	2,250	10,756	,001
Error	20,500	98	,209		
Total	65,000	100			
Total corregida	22,750	99			

Se observa en la tabla 9 el análisis de varianza para el grado de significancia con respecto a la variable LATENCIA con los efectos de Oxidación de los explantes es altamente significativo pues se interpreta que la oxidación es un

proceso de liberación de radicales que causa la muerte celular de los explantes establecidos con el pasar de la evaluaciones. Con ellos podremos determinar cuál de los tratamientos evaluados mostro mayor contraste en cuanto a la oxidación.

Tabla 8: Análisis de varianza para la variable oxidación en Yemas del rizoma según el tipo de medio de cultivo

Origen	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	22,083 ^a	4	5,521	786,719	,000
Intersección	26,360	1	26,360	3756,314	,000
Oxidación	22,083	4	5,521	786,719	,000
Error	,667	95	,007		
Total	65,000	100			
Total corregida	22,750	99			

5.2.1. Supervivencia de yemas de rizoma en el Establecimiento de cinco Variedades de heliconias en diferentes tipos de medios.

Como podemos observar en los gráficos 11 – 15 de latencia durante la evaluación de los explantes establecidos según las variedades de Heliconias observamos que en el tratamiento con MS con Hormona BAP a 5 ppm de concentración, los explantes mostraron mayor porcentaje de viabilidad, pues las Necrotización y demás dependientes se expresan con el pasar del tiempo y las evaluaciones.

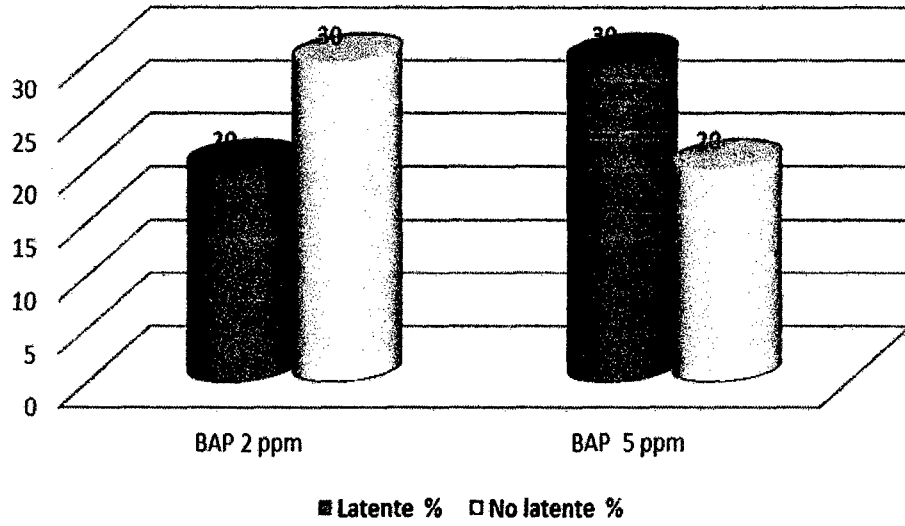


Grafico 11: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de *Heliconia orthotricha* var. "Bicolor"

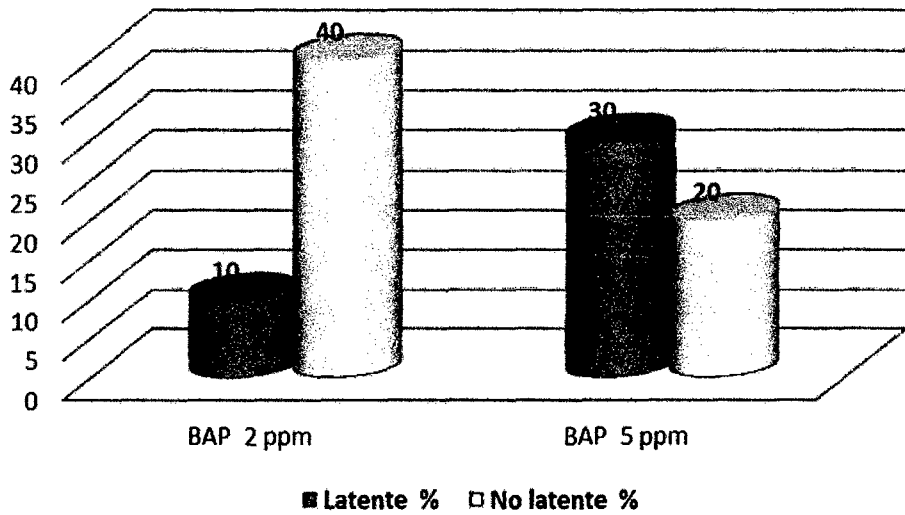


Grafico 12: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de *Heliconia orthotricha* var. "Edge Of Nite"

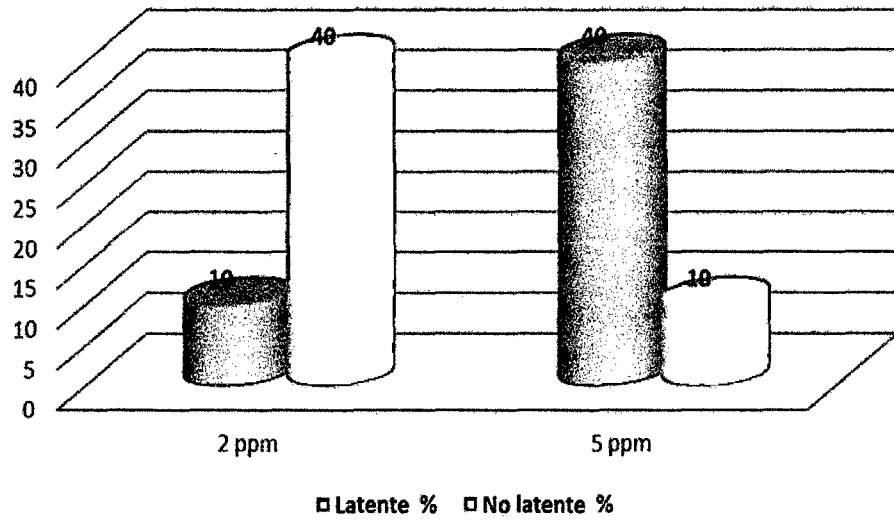


Grafico 13: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de *Heliconia orthotricha* var. "She"

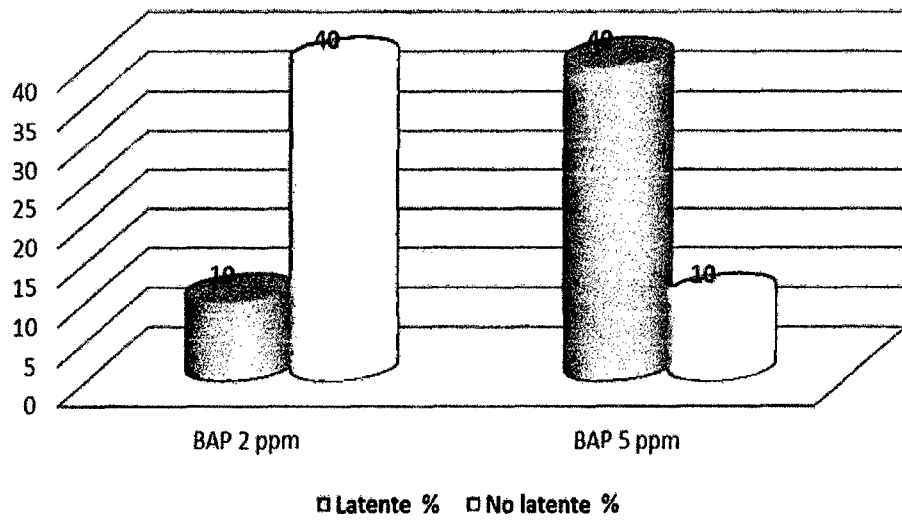


Grafico 14: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de *Heliconia psittacorum* var. "Golden Torch"

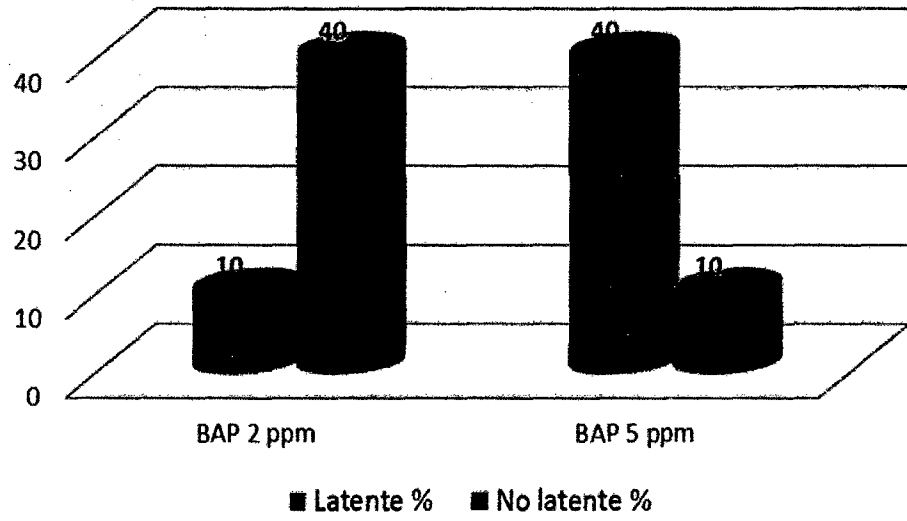


Grafico 15: Porcentaje de supervivencia según MS en explantes establecidos de *Heliconia psittacorum* var. "Fire Opal"

5.3. Establecimiento in vitro de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum*

- Tipo de explante: Yemas del rizoma
- Medio de cultivo para desinfección: Medio propuesto por Murashige & Skoog (1962) a dosis completa de consistencia liquido con soporte de papel filtro.
- Lavados previos a la desinfección con Tween 80 a 3 ml/L por 10 minutos.
- Desinfección: NaOCl 3% / 45 minutos
- Tres enjuagues consecutivos en solución de ácido cítrico y ácido ascórbico a 1 g/L respectivamente.
- Antibiótico: Adición en el medio de cultivo de 3 gotas de Rifampicina a 300 mg/L
- Medio de cultivo para establecimiento: Medio propuesto por Murashige & Skoog (1962) a dosis completa de consistencia solida con la adición de Bencil Amino Purina (BAP) a 5 mg/L.

VI. DISCUSIÓN

La desinfección de los ápices del rizoma de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum* en sus variedades están relacionadas al incremento de la concentración del hipoclorito de sodio (NaOCl), pero se presentaron problemas de necrosis de los explantes al incrementar la concentración, resultando óptimo la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3%; **Sosa, (2004)**, menciona que en la desinfección de ápices de *Heliconia standleyi macbride* existe una tendencia a la disminución de la contaminación, en la medida que se aumenta la concentración del desinfectante (NaOCl) y el tiempo de exposición de los explantes; y con relación a la necrosis, al aumentar la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición de los explantes, se incrementa los explantes necrosados.

La concentración adecuada de desinfección de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum* en sus variedades fue el hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% por 45 minutos al cual previamente se utilizó Tween 80 como tensoactivo; según **Martínez, (2009)**, en el establecimiento *In vitro* de yemas del rizoma de *Heliconia psittacorum*, demuestra que, con la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% y el tiempo de desinfección de 20 minutos logró un porcentaje de desinfección del 73%, y **Sosa, (2004)** demostró que existe una alta eficiencia en la desinfección de los ápices de *Heliconia standleyi macbride* con el empleo de hipoclorito de sodio al 2%, durante 15 minutos.

El aumento de concentración del hipoclorito de sodio y la presencia o ausencia del antibiótico no influyeron en la desinfección de ápices florales de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum* en sus variedades debido a que la contaminación es muy mínima, sustentado este resultado por la ubicación natural de los explantes en la planta pues está alejada de la zona con mayor riesgo de contaminación que es el suelo; además que se encuentra cubierta por brácteas florales que fortalecen su asepsia.

La propagación *in vitro* de heliconias a partir de ápices del rizoma presento problemas complejos de contaminación por la susceptibilidad del explante de estar en contacto directo con el suelo y de presentar contaminación sistémica, en tanto el uso del antibiótico Rifampicina a 300 mg/l fue optimo en la desinfección de estos explantes en las variedades de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum*; según **Atehortua, 1997** y **Días & Viegas, 2001** (Citado por **Viegas, 2005**), En el de cultivo *in vitro* de Heliconias reportan la presencia de bacterias endofíticas del genero *Pseudomonas*, por lo cual recomienda el uso de antibióticos en el medio de cultivo; así también como lo reporta **Merino, (1987)**; en sus estudios de cultivo *in vitro* de hojas de petunia, la presencia de microorganismos en los espacios intercelulares de la hoja y recomienda el uso de antibióticos; además **Alejandro, et al. (2008)**; La micropropagación de *Heliconia collinsiana* y *Heliconia wagneriana* es complejo por la presencia de patógenos que impiden el desarrollo de los explantes, para lo cual recomienda el uso de antibiótico cefotaxime para el establecimiento adecuado de tales especies y **Viegas, (2005)**, El empleo del antibiótico cefotaxime a concentración de 500 mg/l fue eficiente en el control de bacterias endofíticas del genero *Pseudomonas* y *Klebsiella*, en el establecimiento *in vitro* de *Heliconia rauliniana*.

Con la combinación de 6 bencilaminopurina a 5 mg/l y AIB a 10 mg/l en el medio cultivo MS (1962), fue optimo en la conservación de los explantes viables durante el establecimiento *in vitro* de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum* en sus variedades. Según **Sosa, (2004)**, Con la combinación de 6 bencilaminopurina (1.0 mg.l-1) y el AIA (0.1 mg.l-1) en el medio de cultivo fue posible lograr una alta regeneración y crecimiento de los ápices.

VII. CONCLUSIONES

- Para los procesos de desinfección y viabilidad de los explantes de *Heliconia orthotricha* y *Heliconia psittacorum* en sus variedades el tratamiento 2 es el adecuado, que consta de 3% NaOCl durante 45 minutos, adicionando 300mg/l de Rifampicina
- Se determinó que el propágulo viable para estudios de cultivo *in vitro* de heliconias son las yemas del rizomas o yemas basales de plantas jóvenes. Los ápices florales evaluados no mostraron índices de latencia prolongada después de los ensayos de desinfección.
- Se determinó que el medio de cultivo favorable para el establecimiento *in vitro* de Yemas del Rizoma de heliconias está conformado por MS 100% de consistencia sólida y adicionando 5 mg/l de BAP, esto después de las transferencias correspondientes a los resultados de los experimentos de desinfección de medio líquido de cada una de las variedades establecidas.

VIII. RECOMENDACIONES

- Los explantes a utilizarse en los experimentos de cultivo *in vitro* de Heliconias deben proceder de cultivos controlados, los cuales pasan por un proceso de desinfección a plagas y abonamiento constante.
- Durante el traslado de plantas del campo al laboratorio de cultivo *in vitro* se deben lavar los sustratos adheridos para eliminar potenciales patógenos a los explantes a extraer dentro de un invernadero.
- Se debe utilizar compuestos tensoactivos previo a los procesos de desinfección, ya que mejora la acción de los desinfectantes (bactericidas o fungicidas) en los tejidos de la planta.
- Durante los lavados con soluciones desinfectantes se debe de tener una agitación constante para homogenizar en todos los explantes los niveles de asepsia.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **Alejandro, S. 2008;** Control o Erradicación de Patógenos en explantes *In vitro* de dos Heliconias Ornamentales de Tabasco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco – México.
- **Agrotropical, 2008;** Heliconias. [Online] URL:
<http://www.Heliconias.net/Heliconiasinformaciongeneral.html>
- **Botanical Journal of the Linnean Society, 2009;** Una actualización de la clasificación Angiosperm Phylogeny Group para las órdenes y familias de plantas florecientes: APG III; Londres.
- **Hurtado, D. y Merino, M. 1994;** Cultivo de Tejidos Vegetales. Pág. 44. En: **Merino, M.,** Técnicas de Esterilización y Manipulaciones Asépticas. México, D.F.
- **Informe Final de Resultados del Proyecto Heliconias, 2011.** Determinación de conocimientos sobre distribución geográfica, ecología, fenología y manejo agronómico de heliconias en la Región Loreto. Contrato 014-FINCyT-PIBAP-2007. 24 pág.
- **Isaza, L. 2004.** Establecimiento *in vitro* de Heliconias con fines de producción Masiva. [Online] URL:
<http://www.utp.edu.co/php/revistas/ScientiaEtTechnica/docsFTP/115817193-197.pdf>.
- **Kress, J. W. Betancour, J. y Echaverry, B. 1999.** Heliconias. Llamadas de la selva colombiana. 1ª edición. Cristina Uribe editores. Colombia.
- **Maza, V. y Builes, J. 2000;** Heliconias de Antioquia; Guía de identificación y cultivo. Ed. Gráficas Ltda. Medellín.

- **Pinedo, et al. 2010;** Manual Técnico: Producción de Heliconias (*Heliconia* spp.) en la Región Loreto; INIA-EEA "San Roque" - Iquitos
- **Jerez, E., 2007;** Cultivos Tropicales: El cultivo de las Heliconias; [Online]
URL:
http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/pdf/2007/1/CT28115.pdf.
- **Roca, W. y Mroginski, L. 1991.** Principios Básicos, Metodologías y Técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales. pág. 3-16. En: **Roca, W. y Mroginski, 1991.** Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Cali (Colombia): Publicación CIAT.
- **Sosa, F. 2004.** Propagación *in vitro* de la *Heliconia standleyi* Macbride, Tesis maestrado en ciencias agrícolas, Universidad Agraria de La Habana, Cienfuegos-Cuba 2004. [Online] URL:
<http://revistas.mes.edu.cu/eduniv/maestria/maestria-en-ciencias-agricolas/año2004/Flora%20Margarita%20Sosa%20Rodriguez.pdf/view>
- **Turriago, K. y Flores, V., 2004;** Heliconias; [Online]
URL:http://www.encolombia.com/economia/floriculturandina_Heliconias.htm
- **Viegas, P., 2005;** *In vitro* Establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae), Brasil.

X. ANEXOS

Anexo 01: Concentraciones De Compuestos Químicos De Soluciones Stock

SOLUCIÓN A: MACRONUTRIENTES, CONCENTRACIONES 25 X

Compuestos químicos	mg/l	Para preparar soluciones de:		
		250 ml	500 ml	1000 ml
NH ₄ NO ₃	1650	10.31 g	20.63 g	41.25 g
KNO ₃	1900	11.88 g	23.75 g	47.50 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	2.31 g	4.63 g	9.25 g
KH ₂ PO ₄	170	1.06 g	2.13 g	4.25 g
Usar o Tomar		10 ml/l	20 ml/l	40 ml/l

SOLUCIÓN B: MICRONUTRIENTES, CONCENTRACIONES 100 X

Compuestos químicos	mg/l	Para preparar soluciones de:		
		250 ml	500 ml	1000 ml
KI	0.83	20.75 mg	41.50 mg	83.00 mg
H ₃ BO ₃	6.2	155.00 mg	310.00 mg	620.00 mg
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	557.50 mg	1115.00 mg	2230.00 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	215.00 mg	430.00 mg	860.00 mg
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25	6.25 mg	12.50 mg	25.00 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.63 mg	1.25 mg	2.50 mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.63 mg	1.25 mg	2.50 mg
Usar o Tomar		2.5 ml/l	5 ml/l	10 ml/l

SOLUCIÓN C: MACRONUTRIENTES, CONCENTRACIONES 100 X

Compuestos químicos	mg/l	Para preparar soluciones de:		
		250 ml	500 ml	1000 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	11 g	22 g	44 g
Usar o Tomar		2.5 ml/l	5 ml/l	10 ml/l

SOLUCIÓN D: EDTA-HIERRO, CONCENTRACIONES 100 X

Compuestos químicos	mg/l	Para preparar soluciones de:		
		250 ml	500 ml	1000 ml
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27.8	0.70 g	1.39 g	2.78 g
Na-EDTA 2 H ₂ O	37.3	0.93 g	1.87 g	3.73 g
Usar o Tomar		2.5 ml/l	5 ml/l	10 ml/l

SOLUCIÓN E: VITAMINAS, CONCENTRACIONES 100 X

Compuestos químicos	mg/l	Para preparar soluciones de:		
		250 ml	500 ml	1000 ml
Mio-inositol	100	2500.00 mg	5000.00 mg.	10000.00 mg
Tiamina HCl	0.1	2.50 mg	5.00 mg	10.00 mg
Glicina	2	50.00 mg	100.00 mg	200.00 mg.
Piridoxina HCl	0.5	12.50 mg	25.00 mg	50.00 mg
Acido nicotínico	0.5	12.50 mg	25.00 mg	50.00 mg
Usar o Tomar		2.5 ml/l	5 ml/l	10 ml/l

Anexo 02: FICHA DE EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Estación Experimental Agraria “San Roque”, del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA)

Nombre del proyecto:

Nombre del experimento:

Ejecutores:

Tipo de explante:

Número de repeticiones:

Fecha de siembra:

Fecha de evaluación:

Condiciones del experimento:

- Tratamiento:
- Medio de cultivo:
- Condición del cultivo:

Evaluaciones

Nº de tubos	Contaminación	Oxidación	Brote	Altura (mm.)	Longitud Raíz (mm)	Nº de Hojas	Formación de Callo
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

Observaciones:



UNAP

Herbarium Amazonense - AMAZ

Centro de Investigación de Recursos Naturales

CONSTANCIA 17

LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACE CONSTAR:

Que, las muestras botánicas de interés comercial colectadas por los bachilleres de la Facultad de Ciencias Biológicas: Kenny Tairon Gómez Vela y Jack Antony Moncada Lauriano, pertenecen a la tesis titulada: "DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE CINCO VARIEDADES COMERCIALES DE HELICONIAS A PARTIR DE PROPÁGULOS VEGETATIVOS CON FINES DE PRODUCCIÓN MASIVA EN LA REGIÓN LORETO", los cuales fueron verificados e identificados en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Familia	Nombre Científico	Variedad
1. Heliconiaceae	<i>Heliconia orthotricha</i>	var. bicolor
	<i>Heliconia orthotricha</i>	var. she
	<i>Heliconia orthotricha</i>	var. edge of nite
2. Heliconiaceae	<i>Heliconia psittacorum</i>	var. fire opal
	<i>Heliconia psittacorum</i>	var. golden torch.

Se expide la presente constancia, a solicitud de los interesados para los fines que estime conveniente.

Iquitos, 19 de Septiembre del 2011

Atentamente,

Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA
Coordinadora AMAZ-CIRNA-UNAP



Anexo 03, Fotos:

Foto1: Obtención y lavado de las Muestras de Heliconias de las parcelas experimentales de King Kong.

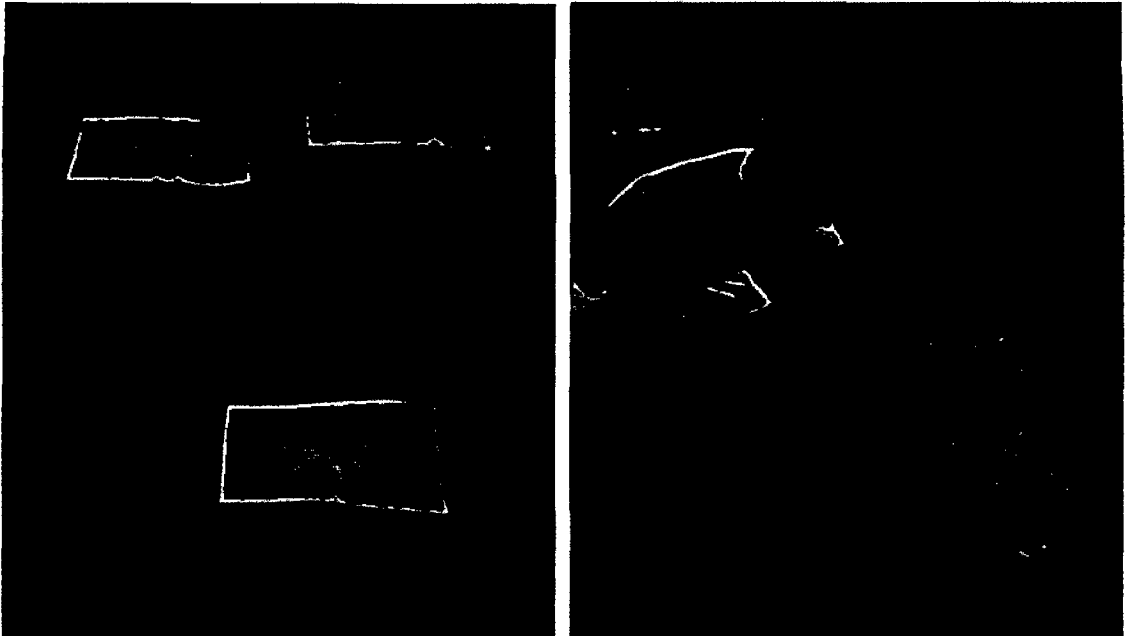


Foto 2: Desinfección con Vitavax 5% de las Muestras de Heliconias de las parcelas experimentales de King Kong.

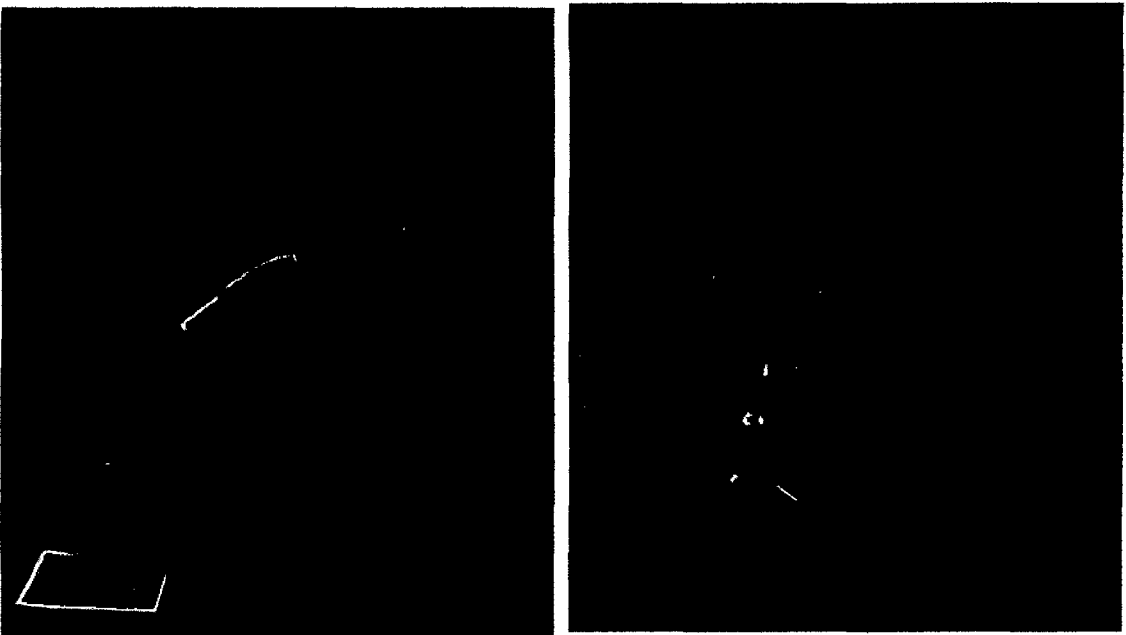


Foto 3: Establecimiento de la Parcela Experimental en el INIA-EEA "San Roque"



Foto 4: Ordenamiento de Variedades Heliconias en la parcela experimental

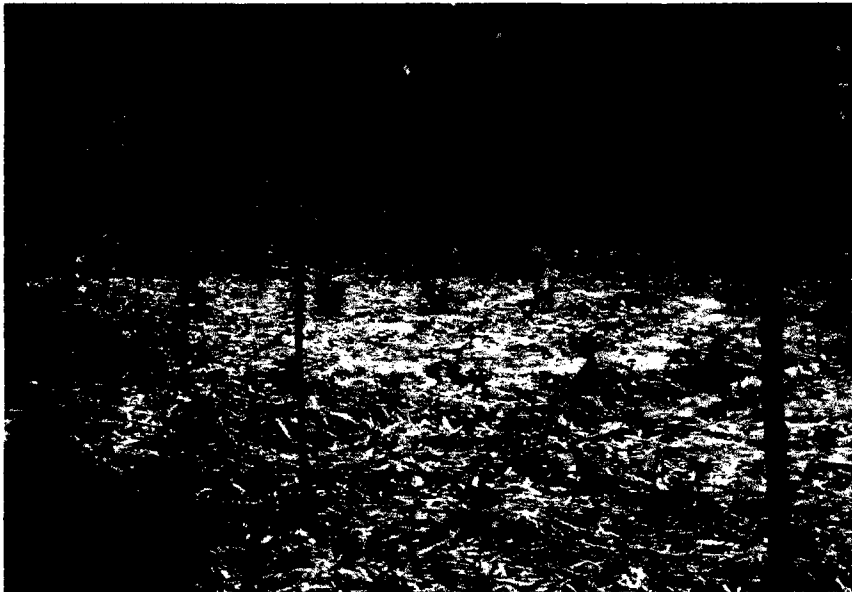


Foto 5: Plantones de Heliconias Óptimos para los ensayos experimentales obtenidos de la parcela experimental.

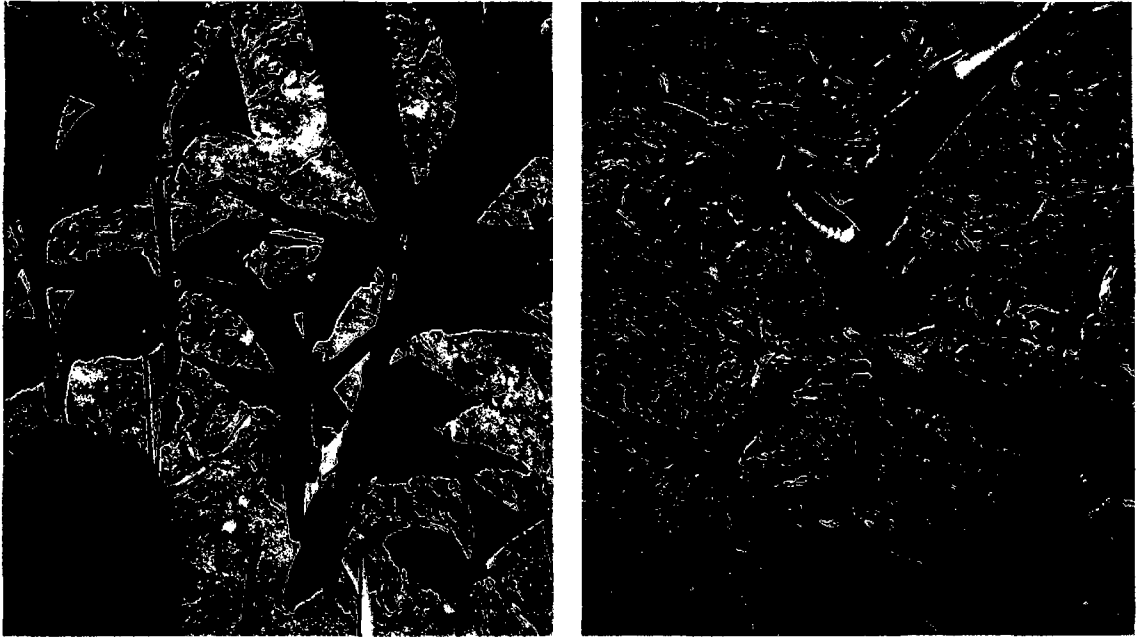


Foto 6: Extracción de Yemas del Rizoma de la parcela experimental

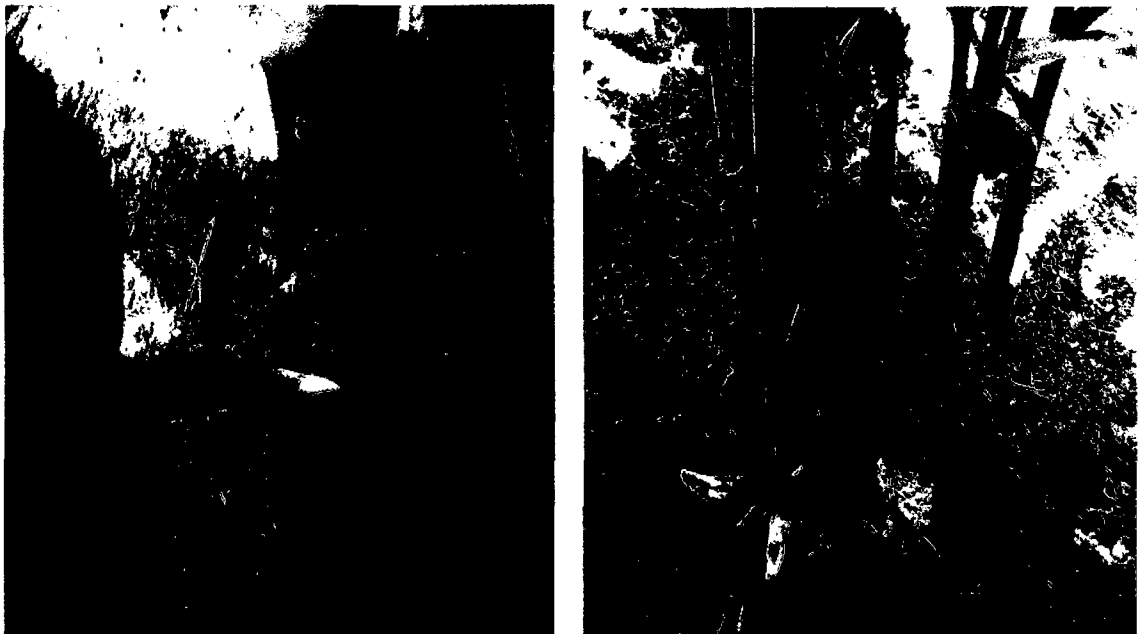


Foto 07: Extracción de muestra de la parcela experimental: Plantones cortados a 10 cm. De la base del rizoma y lavados con abundante agua.



Foto 08: Desinfección previa con Pinesol (24 Horas)



Foto 9: Desinfección y Siembra *in vitro* de Yemas de Rizoma de Heliconia



Foto 10: Extracción de Ápices Florales



Foto 11: Adición de antibiótico a los explantes sembrados *in vitro*



Foto 12: Evaluaciones de los explantes establecidos *in vitro*





373