

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS



Tesis en opción al título académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal

**Título: Propagación *in vitro* del Lirio antorcha
(*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm.).**

Autora: Ing. Odalys Rivera Fernández

**Tutores: Dr. Manuel de Feria Silva
MSc. Pablo Machado Armas**

SANTA CLARA, CUBA

2006

SINTESIS

En Cuba, el volumen y calidad de la producción de flores frescas ha mejorado en los últimos años y tiene grandes perspectivas. Sin embargo, los métodos tradicionales para la propagación de Lirio antorcha no garantizan los volúmenes necesarios de plantas para sembrar las áreas dedicadas a este cultivo y se mantiene como deficiencia la transmisión de enfermedades sistémicas. Todo lo anterior hace pensar que la propagación *in vitro* podría ser una herramienta a utilizar en la búsqueda de posibles soluciones a estos problemas. Es por ello, que el presente trabajo tuvo como objetivos, lograr la desinfección y establecimiento *in vitro* de meristemos apicales de Lirio antorcha obtenidos de rizomas, evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento, del estado físico de los medios de cultivo y el manejo de los explantes durante las fases de multiplicación y enraizamiento y evaluar en condiciones de aclimatización el comportamiento de las plantas obtenidas *in vitro*. Los resultados obtenidos permitieron lograr 6.9 % de contaminación y 92.2 % de meristemos brotados al combinar una concentración de hipoclorito de sodio del 2.0% con un tiempo de desinfección de 20 minutos y utilizar medio de cultivo en estado líquido para el establecimiento *in vitro*. En la fase de multiplicación, los mayores coeficientes de multiplicación (4.8 y 4.7) se lograron al suplementar medio de cultivo en estado semisólido tanto con 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y que con 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP más 0.65 mg.l⁻¹ de AIA respectivamente, se demostró además, que para alcanzar estos coeficientes de multiplicación, es mejor colocar ocho explantes más de 1.0 cm de altura y sin eliminarles el área foliar en 30 ml de medio de cultivo. En la fase de enraizamiento se alcanzo un 100 % de supervivencia de las plantas *in vitro* al colocar explantes mayores de 3.0 cm e individualizados en medio de cultivo líquido, suplementado con 0.65 mg.l⁻¹ de AIA y 3.0% de sacarosa, mientras que el mejor porcentaje de supervivencia en la fase de climatización (99.6%) se logró cuando se transfirieron plantas enraizadas *in vitro* con más de 5.0 cm de altura a condiciones *ex vitro*, lo que permitió disponer de plantas listas para su siembra en condiciones de campo en sólo 30 días de cultivo.

1. INTRODUCCION

La floricultura se puede definir, como la rama especializada de la agronomía consagrada a la producción de flores cortadas tanto para la floristería (confección de arreglos florales) como para la obtención de materia prima destinada a la industria extractiva de aceites esenciales, alcaloides y otros productos de amplias aplicaciones en la elaboración de medicamentos, cosméticos, etc (Flowers, 2004).

Por las más variadas características y usos; se incluye además, el cultivo de aquellas especies que aún sin flores, constituyen un elemento ornamental directo y poseen por sus variadas, exóticas y atractivas formas y colores, calidades decorativas de amplio valor y utilización.

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

Para la economía de muchos países, la floricultura se ha convertido en un negocio rentable dentro del sector agropecuario y cumple un papel muy importante en la solución de necesidades básicas de cualquier país, como son la generación de empleos y el aporte de divisa a la economía.

En décadas recientes se originó un gran aumento en el número de cultivos de flores de corte, y en las diversas maneras de producirlas. Nueva Zelanda por ejemplo, fue especialmente innovadora en estos aspectos (Cronquist, 1981).

En Cuba, el volumen y la calidad de la producción han mejorado en los últimos años y se tienen grandes perspectivas en cuanto a la obtención de calidades y volúmenes que aseguren una sólida producción con destino al mercado nacional de flores frescas.

La propagación por métodos tradicionales de *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Sm. (Lirio antorcha) se realiza en nuestro país utilizando los rizomas. Fracciones de éstos rizomas, provistos de yemas vegetativas son colocados en condiciones adecuadas para su brotación (Álvarez, 1987).

En ocasiones, cuando el número de plantas resulta limitado (como ocurre en algunas áreas jardinerías) además de fraccionarse el rizoma principal, se extraen los brotes nuevos que ya han formado plantas y son manejados como un nuevo individuo.

A pesar de estas alternativas, no se garantizan los volúmenes necesarios de plantas para sembrar grandes áreas dedicadas a este cultivo y además, se mantiene como deficiencia la transmisión de enfermedades sistémicas tales como virus, hongos y bacterias.

Todo lo anterior hace pensar que la propagación *in vitro* podría ser una herramienta a utilizar en la búsqueda de soluciones a estos problemas. Entre las diferentes técnicas de cultivo aséptico de plantas, la propagación *in vitro* vía organogénesis es el método de regeneración de plantas que ha permitido llevar con mayor éxito los resultados investigativos a la aplicación práctica.

En Cuba, este método de propagación se ha practicado con éxito en diferentes especies hortícolas, ornamentales, incluso en especies leñosas. Sin embargo, no existe en la literatura consultada ningún trabajo o resultado investigativo que aborde el tema en Lirio antorcha.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

“Es posible lograr la propagación *in vitro* del Lirio antorcha (*Etilingera elatior*, Jack R.M. Sm.), vía organogénesis a partir de meristemos apicales y su desarrollo en condiciones *ex vitro*”.

En función de dar cumplimiento a dicha hipótesis se trazaron los siguientes objetivos de trabajo:

☛ **Objetivos:**

1. Lograr la desinfección y establecimiento *in vitro* de meristemos apicales obtenidos de rizomas.
2. Evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento, del estado físico de los medios de cultivo y el manejo de los explantes durante las fases de multiplicación y enraizamiento.
3. Evaluar en condiciones de aclimatización, el comportamiento de las plantas obtenidas *in vitro*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Clasificación taxonómica. Características botánicas

La clasificación sistemática más reciente de *Etlingera elatior* es la dada por Burt, B. L. y R. M. Smith (1986) quien lo ubica dentro del orden Zingiberales junto a siete familias más (figura 1).

Familias afines al Lirio antorcha.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Superorden: Zingiberanae

Orden: Zingiberales

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

El Lirio antorcha (*Etlingera elatior*) es un miembro de un gran orden botánico llamado orden de los Zingiberales. Hay varias características que hacen de éste, un orden de fácil reconocimiento, entre esas características se puede incluir las hojas largas y grandes inflorescencias de vistosos colores. La mayoría de los taxónomos reconocen ocho familias en el orden de los Zingiberales, a saber: Musácea (los bananos y plátanos), Strelitziaceae (aves del paraíso), Lowiaceae, Heliconiaceae (heliconias), Zingiberaceae (los gingers); Costaceae (Costus), Cannaceae (las cannas y chirillas) y Marantaceae (las calateas).

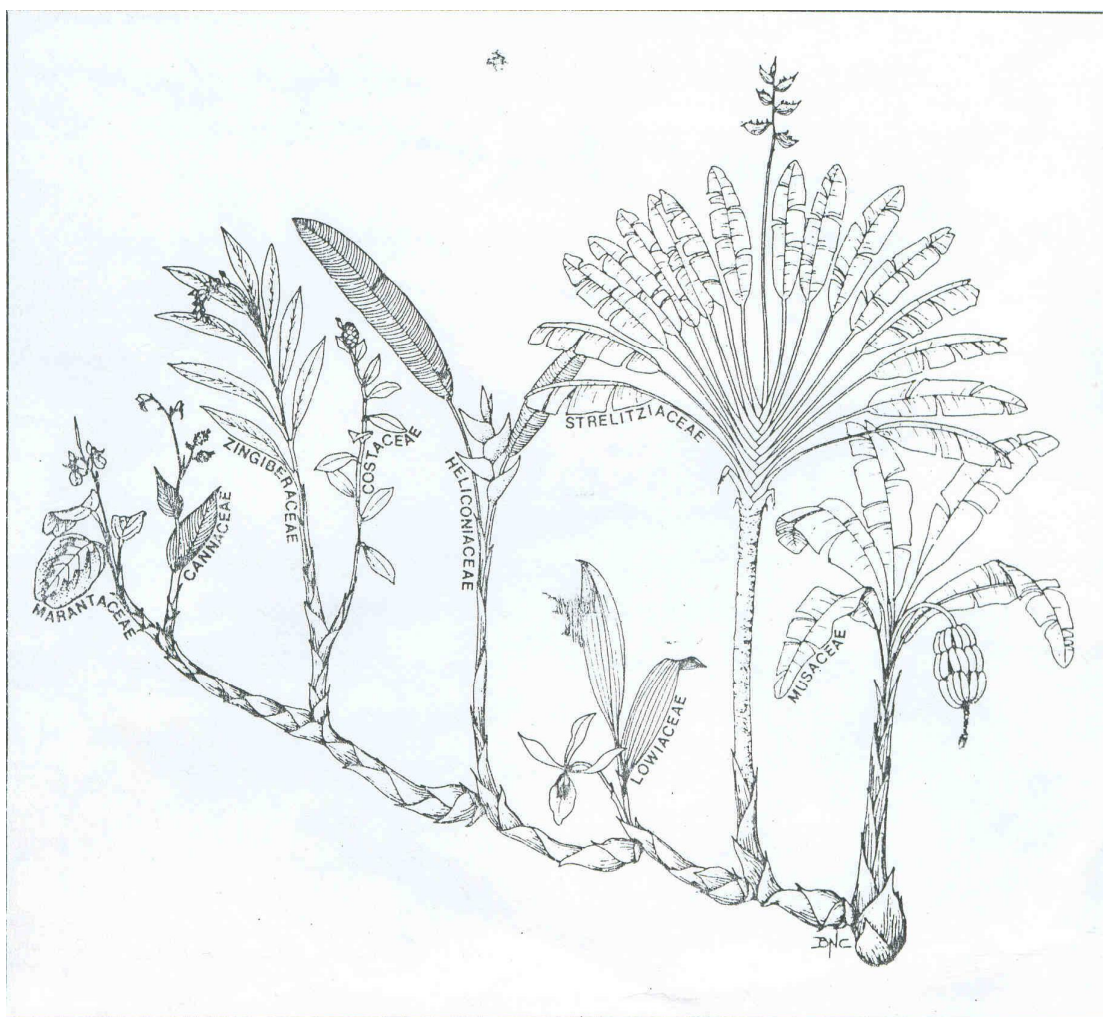


FIGURA 1.-Diagrama representativo de las familias afines al Lirio antorcha.

El Lirio antorcha (*Etlingera elatior*), es una especie nativa del nordeste de las Indias orientales, extensamente distribuido en Malasia, como consecuencia se ha introducido en las Filipinas; existe un tipo de color rojo o rojo vino, proveniente del Asia, y una variedad rosado claro que se encuentra cultivada en Haití, en el Chalet des Fleurs.

Es una hierba robusta de 4.0-6.0 m de altura, que crece en macollas. Posee lígula 8.0-20.0 mm y hojas oblongo lanceoladas de 90.0×20.0 cm, estrechamente elípticas; pecíolo 1.0-4.0 cm. La inflorescencia sale de la tierra de 10.0-15.0×7.0-20.0 cm, siendo más fácil su recolección como flor cortada, la cual es una espiga globosa a cónica, terminal de un tallo sin hojas; constituida por un robusto escapo de 50.0-225.0cm de altura; brácteas 7.0-35.0cm, las exteriores son estériles, como cera, extendidas a reflejas, rojas con margen rosado, las interiores son fértiles, más pequeñas hacia el centro de la inflorescencia; bractéolas de 1.5-2.0 cm. La cápsula es globosa de 2.0-3.0cm de color roja a amarilla (MOBOT, 2006).

Cuando las brácteas abren, las más bajas revelan un cono formando una antorcha. Este es un lirio excepcional con una mirada muy exótica, que se adaptan bien en jardines e invernaderos pero necesitan espacio suficiente para crecer (Liogier y Martorell, 1982).

Los rizomas presentan extensas y gruesas raíces y un definido número de tallos aéreos en diferentes estadios de crecimiento, mostrando además las cicatrices de los escapos florales de estaciones anteriores, así como yemas vegetativas latentes y en movimiento.

Resulta una especie francamente tropical y muy poco modificada por el cultivo, por lo que al igual que otras especies de igual origen (*Strelitzia*, *Alpinias*, *Heliconias*) mantienen muy definidas sus exigencias ecológicas.

Etlingera elatior es una especie bastante impresionante, es cultivada en Costa Rica a menor escala como adorno, y aparentemente para marcar linderos de propiedad. Se reconoce fácilmente por su escapo robusto, sin hojas, la inflorescencia globosa y las brácteas de color rojo a rosado ceroso. Es conocida como bastón del emperador o bastón del obispo y como rosa de porcelana

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

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

2.2 Importancia del Lirio antorcha.

El lirio antorcha es una flor poco conocida, cuyas extraordinarias características la convierten, junto a la *Strelitzia*, *Heliconias*, *Anthurium*, *Alpinias*, *Orquídeas*, etc., en un bello exponente de la flora tropical, agrupadas por nuestros jardineros y floricultores en las denominadas flores especiales o exóticas.

Caracterizan a esta especie, sobresalientes condiciones artísticas y comerciales, entre las que se destacan una gran durabilidad, después de cortada, impresionante porte y bello color, sugestiva forma y suave textura, etc. Asimismo, reúne características agrotécnicas que la convierten en un renglón productivo de amplias y positivas posibilidades, como son la gran adaptación a las condiciones climáticas del país, la alta rusticidad, su resistencia al ataque de las plagas y enfermedades, su fácil propagación, el poco nivel de exigencias en cuanto a atenciones culturales se refiere, etc., además de constituir una línea de cultivo en áreas marginales y medianamente sombreadas.

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

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

2.3 Hábitat y Distribución

Requiere para su normal desarrollo y floración, altas temperaturas que pueden fluctuar entre una mínima de 18°C y una máxima de 34°C, siempre que la mínima absoluta no permanezca durante un período prolongado, por debajo de 2°C ó 3°C; asimismo, requiere una exposición semiumbría y protegida de la acción de los vientos y una alta precipitación bien distribuida a lo largo del año. Sufrir intensamente cualquier déficit hídrico y los efectos desecantes del aire, por lo que resulta necesario efectuar aportes de agua a través del riego, cuando se presentan prolongadas sequías o cuando la acción del aire seco resulta intensa.

Como todas las especies de las Zingiberáceas y familias a fines, el Lirio antorcha exige suelos profundos, fértiles, de un alto nivel de materia orgánica y textura media (franca), así como un subsuelo friable, que garantice un adecuado drenaje. El agua estancada perjudica profundamente el crecimiento y desarrollo de esta especie.

Aunque vegeta en suelos de diferentes pH, la reacción más conveniente para el lirio antorcha parece ser entre 6 y 8 (ligera y ácida a alcalina).

Esta especie es utilizada en el aprovechamiento de zonas o áreas marginales; no se cultiva en lotes a campo abierto, debido a su exigencia de abrigo por los efectos del aire y sus requerimientos de media sombra (Álvarez, 1987)

El carácter higrófilo se puede encontrar en las altitudes medias en donde la precipitación es mayor de 2 000 mm anuales en los ecosistemas de montaña y es precisamente ese carácter el factor más importante que se considera como punto de partida, para adelantar estudios en Colombia sobre el orden **Zingiberales**, ya que el desarrollo de rizomas, tamaño, número y coloración de las inflorescencias depende dentro de un ecosistema a los parámetros climáticos, entre ellos la luz. En Cuba se ven algunas especies en las zonas montañosas aunque hay en lugares llanos, y pequeñas plantaciones en jardines particulares (Fuentes, 2003).

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

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

A plena exposición del sol necesitan más agua y fertilizantes además de ser más susceptibles a deficiencias por elementos menores; bajo estas condiciones de iluminación crecen en forma más vigorosa y producen mayor número de inflorescencias. Estas se comportan mejor en la luz brillante pero no a pleno sol.

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

Es importante saber que por presentar un rizoma, característico propio de las monocotiledóneas o liliópsidas, este órgano vegetativo requiere de unos suelos con buena porosidad, una estructura granular, texturas de tipo franco arenoso, franco arcilloso o franco arenoso arcillosos y buen contenido de materia orgánica, además acompañados de una buena capa de humus para que dicho rizoma pueda tener un buen desarrollo y pueda acumular nutrientes los que resultan en una buena confección de la planta; así los suelos que ellas prefieren o están adaptadas a los de tipo ácido (pH 4-6-8) características de las zonas muy húmedas. Al aplicar el factor de reemplazabilidad, las enmiendas o abonos tenderán a lograr básicamente el mejoramiento de las propiedades físicas de los suelos (Edgar Jardinería, 2000), comportándose de forma similar en Cuba (Términos Taínos-B, 2001).

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

El exceso de humedad puede reducir el número de inflorescencias producidas por la planta. Edgar Jardinería (2000) recomienda que en sitios con buen drenaje deben ser regadas cada dos

o tres días, pero las áreas densamente plantadas necesitan agua diariamente. En macetas deben regarse con más frecuencia, especialmente cuando tienen muchas raíces.

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

Propagación

La propagación de esta especie es llevada a cabo en producción, utilizando la estructura vegetativa naturalmente adaptada para tal fin, o sea, los rizomas. Fracciones de éstos, provistos de yemas vegetativas estimulan su desarrollo una vez que separados del plantón madre se les coloca en apropiadas condiciones de brotamiento.

En ocasiones, cuando el número de plantas resulta limitado (como ocurre en algunas áreas jardineras) se recurre al método de división, o sea, se divide un plantón que muestre brotes de nuevo crecimiento, extrayendo éstos y manejándolos como pequeñas plantas o hijos.

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

Al utilizar rizomas de áreas de cultivos espontáneos o de viveros, deben lavarse bien con agua y jabón, sumergidos o fumigados con un pesticida y posteriormente se hace lo mismo con un fungicida sistémico. Esto reducirá los riesgos de presencia de bacterias y hongos, los que afectarían la brotación de los rizomas; los mismos se entierran a unos centímetros y entre cuatro a ocho semanas en dependencia de la época del año brotarán (Vargas, 2002).

2.4 Estado actual de la floricultura en el mundo

La floricultura a nivel mundial es un negocio de grandes proporciones. El avance de las comunicaciones y el desarrollo de los tráficos han impulsado fuertemente esta actividad en el último decenio. Según Mercados verdes (2003) la importancia económica que alcanza la floricultura en el mundo es verdaderamente incalculable, pues la producción de flores se ha convertido en un negocio rentable dentro del sector agropecuario, dicha actividad cumple un papel muy importante en la solución de necesidades básicas de cualquier país, como es la generación de empleos.

El cultivo de flores cortadas y bulbos de flores se da en 145 países, ocupando un área de 190.000 hectáreas aproximadamente. Los principales productores de flores son Holanda, con una producción de US\$ 4 billones de flores por año, seguido por Alemania, Francia, España, Japón, Colombia, Ecuador y Estados Unidos, donde la producción fue de aproximadamente

US\$ 20 mil millones para el año 2002 (Centre for the promotion of developing countries, 2002).

Colombia ocupa el segundo lugar como exportador mundial por la calidad de sus flores, sus exportaciones son del 14% después de Holanda, país que exporta el 50%. Colombia y Ecuador son los principales países suramericanos exportadores de flores.

Dentro de las flores de bulbos Holanda ocupa un lugar importante (84%) seguido por Chile. Dentro de los follajes el principal exportador es Estados Unidos seguido por Costa Rica, Italia, Holanda, Alemania, Chile, Kenya, Israel y Japón (Florvertical, 2004).

Las exportaciones de flores colombianas se iniciaron en 1965 con un valor de US\$ 20.000 y en el año 2002 alcanzaron un valor de US\$ 665 millones de dólares, presentando un crecimiento promedio anual de 6,9% durante el período comprendido entre 2000 y 2002. Las exportaciones de flores a Estados Unidos fueron de 82% en el 2000 y de 89,1% en el 2002, presentando un incremento del 7% con respecto al año 2000. El segundo destino de exportaciones colombianas es la Unión Europea con 9,8% de participación en sus ventas. En 1987 los exportadores de flores Colombianas, establecieron en Miami el COLOMBIA FLOWER COUNCIL (CFC) cuyo objetivo es promover el consumo de flores colombianas, sin embargo, otros organismos que han incidido en la promoción son PROEXPORT y BANCOLDEX (Dataflowers, 2004). El principal producto de exportación de Colombia es la rosa con un 29% seguida por el clavel con el 28,5%, el miniclavel con el 9%, y los crisantemos con 1,8%. Las heliconias y otras flores tropicales se encuentran agrupadas dentro de la clasificación de otras flores, las cuales representan el 31,7% del total de exportaciones de flores (PROEXPORT, 2002).

Las flores tropicales han venido ocupando en los últimos tres años un renglón importante dentro del total de las importaciones de flores cortadas a Estados Unidos, con un 3,2% de participación de acuerdo con la información proporcionada por USDA Path Publishing, Prochile y Dataflowers, entre otros. Muchas variedades tropicales han sido comercializadas como flor de corte durante los últimos 20 años, entre ellas se encuentran las heliconias y otras especies como son platanillos de otras familias tales como: *Musa coccinia*, *Alpinia purpurata*, *Zingiber spectabilis*, *Etlingera elatior*, *Tapeinochilos ananassae*, *Calathea crotalifera*, *Calathea lutea*, pero las que se encontraron más familiarizadas con la mente de los actores de la cadena fueron: *H. Psittacorum* y *H. Caribbea* (PROEXPORT, 2002).

A pesar de la crisis en la economía mundial después del 11 de septiembre de 2001 y después de la guerra de Irak, las flores mantuvieron un nivel de ventas con crecimiento. Sin embargo, en el año 2003 las empresas importadoras en Miami experimentaron un descenso en las ventas del 8% durante el primer trimestre (PROEXPORT, 2002). Estados Unidos tiene un consumo

pe cápita de US\$ 30 por año en flores. A nivel de consumo en Estados Unidos, las flores tienen unas características específicas, pues son un bien imprescindible, con una demanda elástica, y con una alta estacionalidad según las principales fiestas: San Valentín, madres y navidad. Sin embargo, hay algunos floristas que afirman que las flores tropicales se venden mejor en primavera y verano mientras otros afirman que se venden mejor en invierno (Florvertical, 2004).

Los principales consumidores de las especies tropicales en Estados Unidos forman parte de los sectores hoteleros, quienes compran semanalmente arreglos de flores tropicales que oscilan entre los US \$150 y los US \$ 1000, dependiendo del tamaño y la sencillez (Floricultura Andina, 2006).

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

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

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

Las flores, que luego serán rematadas en la subasta, son examinadas por los inspectores de la misma y clasificadas en cuatro grupos: A1, A2, B1 y B2. El grupo B2, de menor calidad, no es aceptado para la subasta desde 1992 y todos los productos de esta clasificación son destruidos. Conjuntamente con las subastas holandesas, otros importadores de flores de la Unión Europea también tienen sus estándares de calidad “no escritos” para la importación de flores (COEXPORT 2001).

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

Canales de distribución

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

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

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

Las subastas son mercados generalmente creados por los productores de la Unión Europea para comercializar sus productos. Existen 15 subastas de flores en Europa, nueve de las cuales están en Holanda. De las 15 subastas Europeas, cinco son también importadoras de flores para completar su volumen de comercialización. Cabe mencionar que las subastas holandesas en particular, funcionan como un pivote alrededor del cual se resuelven las transacciones internacionales de flores. A través de la concentración de la oferta y la demanda, ellas actúan como mecanismo de definición del precio de comercialización y tiene desarrollado el mayor centro para la distribución de la producción nacional y extranjera hacia los mercados de europeos.

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

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

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

2.5 La floricultura en Cuba

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

El empleo de flores y plantas decorativas en centros de trabajo, viviendas y lugares públicos ha aumentado considerablemente en el mundo, porque se asegura que el color verde del follaje de las plantas y el colorido de las flores actúan como estimulantes del sistema nervioso, atenúan

el ruido, purifican el aire, perfuman el ambiente mejorando las condiciones higiénico ambientales, además de ser una fuente de ingreso para productores y comercializadores (Edición electrónica del periódico Guerrillero 4 de julio de 2006).

Lamentablemente en nuestro país no existe una producción continua y variada de especies de flores, a pesar de tener las condiciones climáticas idóneas y una variedad de suelos aptos para el cultivo de las mismas. El período de mayor volumen de producción se concentra en los llamados meses fríos que van de octubre a marzo.

Otro aspecto que ha limitado la producción de flores en el país ha sido la insuficiente demanda de este producto por la población y el sector empresarial pues los cubanos no somos adictos a regalar flores, creemos que ellas son para honrar a nuestros muertos el día de las madres, de los padres o el día de los fieles difuntos ignorando que las flores pueden ser también para los que están vivos.

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

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

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

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

Por otro lado es conocido por todos que existen fechas señaladas en las que el consumo se eleva notablemente. Sin embargo; nuestro clima permite producir flores durante todo el año, y con costos bajos de producción. Posibilidad poco explotada, por lo que se pierde la oportunidad de ofertar a nuestros clientes especies de calidad de sello tropical.

2.6 Multiplicación *in vitro*.

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

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

Con la micropropagación se obtiene de una planta un gran número de plántulas anualmente frente a las menos de 100 que permiten obtener los métodos clásicos de propagación vegetativa. Se cultiva primero en tubos de ensayos y luego en frascos o cajas de polietileno, fragmentos de capítulos muy jóvenes o meristemos. Se obtiene plantas a los tres o cuatro meses. Según la experiencia, en la propagación comercial pueden identificarse cinco etapas definidas con su objetivo específico:

- Fase 0: Preparativa. En esta etapa se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*.
- Fase I: Establecimiento o iniciación de los cultivos. El objetivo de esta fase es establecer cultivos axénicos y viables con los cuales iniciar el proceso de propagación.
- Fase II: Multiplicación. Es considerada la etapa más importante del proceso donde debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas.
- Fase III: Enraizamiento. Su objetivo es preparar las plántulas para su re-establecimiento en condiciones de suelo.
- Fase IV: Aclimatización. Es la fase final del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción, casas de vidrio o invernaderos (Jiménez, 1995).

Fase 0. Preparativa

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

Selección de las plantas donadoras

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

Por el propio desarrollo de los sistemas de propagación *in vitro*, especialmente en ornamentales, es común que la selección se realice sobre plantas micropropagadas, las cuales

son cultivadas en condiciones controladas (invernaderos) o áreas aisladas (bancos de semillas) lo cual evita una serie de riesgos, facilita la reimplantación *in vitro* y además mejora el proceso de selección.

El estado fisiológico de la planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas. Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestren un desarrollo vigoroso y sano (Jiménez, 1998).

Pre- tratamiento a las plantas donantes

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

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

Crecimiento de las plantas en ambientes controlados e higiénicos:

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

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

Fase I. Establecimiento o Iniciación de los cultivos

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

El explante

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

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

Desinfección del explante

La contaminación en los cultivos *in vitro* es uno de los principales problemas a resolver en la industria de la micropropagación. Los contaminantes pueden originarse de dos fuentes distintas, primeramente aquellos que vienen en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y en segundo lugar los que aparecen como resultado de fallas en los procedimientos de laboratorios.

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

Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. Generalmente se cortan los explantes de un tamaño algo superior y son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones estériles son reducidos a su tamaño final (Hu y Wang, 1983).

Los desinfectantes mas comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl₂). Los tres primeros se emplean en concentraciones de uno a tres por ciento en tiempo de 10 a 20 minutos; el alcohol se usa generalmente al 70% y se emplea en combinación con otros desinfectantes. El bicloruro de mercurio es el de mayor toxicidad y se emplea en dosis bajas y corto tiempo (0.1% durante uno a tres minutos).

El uso de antibióticos en el medio de cultivo durante esta fase también es frecuente, aunque no siempre surte el efecto deseado.

Medios de cultivo y reguladores del crecimiento

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

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

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

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

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

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

Fase II Multiplicación

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

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

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

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

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

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

Medios de cultivo

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

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

No obstante el papel determinante de la citoquinina en esta fase en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes (Wang y Hu, 1998). Uno de

los posibles efectos de las auxinas en a fase II es anular el efecto depresivo de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos.

El balance auxinas-citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de ploriferación con lo cual aumenta la efectividad del método. Sin embargo es necesario tener cuidado en el manejo de los reguladores del crecimiento en esta fase, ya que con el empleo continuado de altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo se puede inducir la formación de yemas adventicias según Evans y Bravo (1985) lo cual representa un inconveniente dentro del proceso de propagación.

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

Fase III. Enraizamiento

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

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

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

Reguladores del crecimiento

Normalmente para la inducción del enraizamiento no es necesaria la adición de citoquininas al medio de cultivo, debido al efecto residual de las citoquininas adicionadas durante la propagación, la cual ejerce un efecto inhibitorio en la formación de raíces según Sauvaire y

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

Concentración de las sales minerales

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

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

Concentración de sacarosa

También se recomienda elevar la concentración de sacarosas en el medio de cultivo para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. Señalándose que en caña de azúcar se observa un abundante enraizamiento en medios que contengan entre 5.0 y 9.0% de sacarosa (Mareztki y Hiraki, 1980; Ballester y González, 1983).

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

Estado físico del medio de cultivo

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

sustancias tóxicas liberadas por el tejido en crecimiento, la aireación y la disponibilidad de nutrientes.

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

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

Fase IV- Aclimatación:

Esta fase es trascendental para la propagación comercial, ya que influye directamente en la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proyecto. En esta fase se garantiza un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales (Agramante *et al.*, 1998).

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

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

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

1. **Hojas:** anatomía interna mal estructurada, estomas que no cierran normalmente y desarrollo deficiente de la cutícula. Esto hace que las plantas sean más susceptibles al stress por pérdida de agua y por lo tanto pueden desarrollar nuevas hojas adaptadas a las nuevas condiciones.
2. **Tallo:** Menor contenido de tejido de soporte (colénquima y esclerénquima).
3. **Raíces:** raíces poco funcionales, ausencia de raíces secundarias. En ocasiones existe una conexión vascular incompleta entre tallo y raíces que impide el transporte eficiente de agua y nutrientes. Como resultado de esto prácticamente las plantas deben desarrollar todo el sistema radical nuevo durante la etapa de aclimatización.

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

Manejo de las plantas producidas *in vitro*

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

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

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

Instalaciones utilizadas para la aclimatación

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

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

Sustrato

Este debe cumplir algunas características tales como:

- ❖ Estabilidad física. No debe perder sus cualidades físicas hasta transcurrido un tiempo razonable.
- ❖ Densidad. El sustrato debe ser ligero para facilitar el manejo y transporte de los contenedores.
- ❖ Aireación. Las raíces para desarrollarse necesitan una buena aireación. Cuando se riega, una parte del agua drena dejando un espacio que ocupa el aire. Este espacio debe ser como mínimo un 20% del volumen total y a veces más.
- ❖ Acidez. Para la gran mayoría de las plantas el pH óptimo se sitúa entre 5.5 y 6.5.
- ❖ Sanidad. Debe estar libre de patógenos de cualquier tipo que pueden dañar las plantas.
- ❖ Capacidad de retención de nutrientes. Los nutrientes se aportan generalmente por el agua de riego, el sustrato debe ser capaz de retenerlos. La medida de la capacidad de retención es la capacidad de intercambio iónico, que indica la facilidad con que el sustrato retiene y suelta iones. Un sustrato óptimo debe tener entre 15 y 50 meq/100cm³.
- ❖ Capacidad de retención del agua. El sustrato debe retener la mayor cantidad de agua posible sin poner en peligro la aireación.
- ❖ Mojabilidad. Si se seca el sustrato, este debe ser capaz de volverse a mojar con facilidad. A menudo cuando se utiliza turba debe añadirse otros productos que mejoren su mojabilidad.
- ❖ Fertilidad. La planta debe encontrar en el sustrato los nutrientes que necesita, aunque estos deben suministrarse externamente (Jiménez, 2000).

3. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en la Biofábrica de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara-Cienfuegos, en el período comprendido de Enero del 2003 a Junio del 2005.

Material vegetal

Como material vegetal de partida se utilizaron rizomas procedentes de plantas de Lirio antorcha de la Biofábrica de las Flores de Villa Clara, los cuales fueron sembrados en macetas usando como sustrato una mezcla de suelo (60%), estiércol vacuno con dos años de descomposición (30%) y zeolita (10%). Este sustrato bien mezclado fue esterilizado con vapor durante dos horas.

Las plantas obtenidas crecieron y se desarrollaron en condiciones controladas (casa de cultivo), entre otras razones para atenuar el efecto negativo de posibles plagas y enfermedades, en este sentido y según lo descrito por Machado (2002), se elaboró un programa de defensa con aspersiones foliares con una frecuencia semanal de una mezcla de fungicidas tales como: Zineb 75% PH, Maneb 80% PH, Mancoseb 80 % PH, Oxiclورو de cobre 50% PH, con una dosis de aspersión de 5.0 g.l⁻¹ durante cuatro semanas antes de la implantación de los meristemos apicales en condiciones *in vitro*, de esta forma se logró disponer de un material vegetal de partida para la fase de establecimiento *in vitro*, con menor probabilidad de sufrir pérdidas por la presencia de posibles microorganismos contaminantes.

Para la fase de establecimiento *in vitro* se utilizaron ápices de plantas con una edad entre seis y ocho meses de desarrollo en las macetas. A estos ápices se les eliminaron las hojas que envuelven al meristemo hasta llegar a la zona de tejido más joven, el explante así obtenido incluyó al meristemo apical con dos primordios foliares y un tamaño que osciló entre 0.5 – 0.8 mm

Para los estudios de la fase de multiplicación el material vegetal utilizado se encontraba en el tercer subcultivo. Todas las operaciones de disección y transferencia se realizaron en cabinas de flujo laminar horizontales.

- Instrumental utilizado en el laboratorio

Todos los instrumentos empleados en la manipulación del material vegetal fueron esterilizados en una estufa a una temperatura de 180°C, durante dos horas antes de cada sección de trabajo, además se colocaron en soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0%, según la metodología propuesta por Agramonte *et al.* (1993).

- Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado como base en los experimentos para cada una de las diferentes fases tanto en los medios de cultivos en estado líquido como semisólido, estuvieron compuestos por las

sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), a las cuales se hará mención en lo adelante como sales MS. El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.8 previo a la esterilización y como agente gelificante se empleó agar (Sigma Chemical, Co.) a razón de 4.0 g.l⁻¹.

La esterilización se realizó de forma química utilizando vitrofural en una dosis de 1.2 g.l⁻¹, para lo cual se calentó el medio de cultivo hasta su ebullición por tres minutos, luego se dejó que bajara la temperatura hasta 70°C y se aplicó el vitrofural.

- **Procedimientos generales**

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

La totalidad de los experimentos fueron incubados en cámaras con luz solar con una densidad de flujo fotosintético de 48.0 – 62.5 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 26±2°C.

La aclimatización de las plantas obtenidas *in vitro* se realizó en contenedores de polieturano de 70 alvéolos con una capacidad de 132 cm³ cada uno. El llenado de los orificios fue realizado de forma manual. El riego se efectuó mediante la técnica de riego localizado con microaspersores aéreos con una frecuencia de tres riegos diarios en los primeros 15 días con una duración de 10 minutos cada uno y dos riegos en los restantes 45 días de cultivo, con una duración de tres a cinco minutos cada uno. Las plantas crecieron en condiciones de luminosidad reducida al 70% lo cual se logró con una malla plástica de sombreo (zarán).

- **Procesamiento estadístico**

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

Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 8.1 para Windows. El procesamiento estadístico de los datos en las diferentes variables y fases experimentales consistió en un análisis de varianza de clasificación simple y unifactorial según los casos de variables continuas, previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.

Para detectar las diferencias significativas entre las medias a un nivel del 5.0% se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan.

El número de réplicas en la fase de establecimiento fue de 50 meristemos apicales, en los experimentos *in vitro* fue de 20 frascos y para la fase de aclimatización fue de 70 plantas.

3.1. Fase de establecimiento *in vitro*

Con el objetivo de eliminar los posibles microorganismos contaminantes los explantes fueron desinfectados superficialmente, como se describe a continuación.

1. Se cortaron todas las hojas de las plantas cultivadas y se tomaron los ápices, dejando los mismos con aproximadamente 3.0 cm de longitud.
2. Se lavaron con abundante agua corriente y se cepillaron ligeramente para eliminar los restos de sustrato.
3. Se mantuvieron durante cinco minutos en una solución de detergente al 1.0 %, y se enjuagaron tres veces con abundante agua corriente, según Villegas (1990) y Maribona *et al.* (1999) datos sin publicar.
4. Se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio.
5. Se enjuagaron con agua destilada estéril, tres veces y se mantuvieron en este tipo de agua hasta la implantación.

3.1.1. Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección del material vegetal

Con el objetivo de determinar la mejor concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición del material vegetal, para su posible desinfección superficial, se evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1.5, 2.0 y 2.5%) combinadas con tres tiempos de exposición (10, 20 y 30 min.), para un total de nueve tratamientos (Tabla 1).

Se utilizó un medio de cultivo en estado líquido con soporte de papel de filtro, este medio de cultivo estuvo compuesto por las sales MS, suplementado con 0.5 mg.l⁻¹ de tiamina, 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 0.3 mg.l⁻¹ de AIB y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.

Tabla 1. Tratamientos que combinan diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de exposición a los que fueron expuestos los explantes para su posible desinfección.

Tratamientos	Concentración de NaOCl (%)	Tiempo de exposición (minutos)
1	1.5	10
2	1.5	20
3	1.5	30
4	2.0	10
5	2.0	20
6	2.0	30
7	2.5	10
8	2.5	20

9	2.5	30
---	-----	----

Se evaluó semanalmente hasta los 28 días el número de ápices contaminados y brotados y posteriormente se calculó el porcentaje.

3.1.2. Efecto del estado físico del medio de cultivo

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto del estado físico del medio de cultivo sobre el establecimiento *in vitro* de los meristemos apicales, para lo cual se utilizó un medio de cultivo gelificado con 4.0 g.l⁻¹ de agar-agar y un medio de cultivo en estado líquido con un soporte de papel de filtro, ambos con similar composición del experimento anterior. Se realizaron evaluaciones semanales hasta los 28 días y como criterio de evaluación se tuvieron en cuenta el número de meristemos contaminados, muertos y brotados.

3.2. Fase de multiplicación

3.2.1. Efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento 6-BAP y AIA

A partir de resultados preliminares descritos por Malamug *et al.*, (1991) y Babu, *et al.*, (1992) y con el objetivo de evaluar el comportamiento de la multiplicación de los explantes en presencia de determinados reguladores del crecimiento, fueron adicionados al medio de cultivo compuestos como el 6-BAP y AIA solos y combinados para un total de 15 tratamientos como muestra la tabla 2. Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante 28 días y se evaluó la longitud de los brotes (cm), el número de hojas y el número de brotes por explantes y luego se calculó el coeficiente de multiplicación.

Tabla 2. Combinaciones de los reguladores del crecimiento (6-BAP y AIA) evaluadas en la fase de multiplicación de Lirio antorcha.

Tratamientos	Concentración de los reguladores del crecimiento	
	6-BAP (mg.l ⁻¹)	AIA(mg.l ⁻¹)
1	0	0
2	0	0.65
3	0	1.3
4	1	0
5	1	0.65
6	1	1.3
7	2	0
8	2	0.65
9	2	1.3
10	3	0
11	3	0.65

Tratamientos	Concentración de los reguladores del crecimiento	
	6-BAP (mg.l ⁻¹)	AIA(mg.l ⁻¹)
12	3	1.3
13	4	0
14	4	0.65
15	4	1.3

3.2.2. Influencia del estado físico del medio de cultivo

Con el objetivo de determinar la influencia del estado físico del medio de cultivo, en el comportamiento de los explantes en la fase de multiplicación sobre el coeficiente de multiplicación y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro*, se evaluó durante tres subcultivos dos tratamientos, uno con medio de cultivo en estado líquido y otro semisólido (4.0 g.l⁻¹ de agar).

La composición del medio de cultivo utilizado fue un MS modificado por Zárraga y Granada (1990), suplementando con 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.

Las evaluaciones realizadas semanalmente hasta los 28 días comprendieron la longitud de la planta (cm), el número de hojas, el número de brotes y posteriormente se calculó el coeficiente de multiplicación.

3.2.3. Influencia del manejo de los explantes

Este experimento tuvo el objetivo de incrementar el número de brotes por explante en esta fase del proceso, para lo cual se tomaron 20 frascos biotecnológicos con plantas cultivadas *in vitro* que tenían tres subcultivos en medio de cultivo semisólido (4.0 g.l⁻¹) y a los 28 días de cultivo se evaluó la respuesta de los brotes a los siguientes manejos realizados:

- Explantes mayores de 1.0 cm sin corte del área foliar.
- Explantes mayores de 1.0 cm y con corte del 50% del área foliar.
- Explantes mayores de 1.0 cm y con corte del 75% del área foliar.

3.2.4 Influencia del número de explantes por frasco de cultivo

Con el objetivo de definir la densidad de explantes por frasco de cultivo se evaluó el número de brotes obtenido por explante cuando estos fueron colocados a razón de seis, siete, ocho, nueve y diez explantes iniciales por frasco de cultivo. Se utilizaron frascos biotecnológicos de 250 ml de capacidad a los cuales se les añadió 30 ml de medio de cultivo.

El tamaño de la muestra fue de 20 frascos y solo se evaluó el número de brotes por explantes a los 28 días de subcultivados.

3.3. Fase de enraizamiento

3.3.1. Efecto del AIA, el AIB y la sacarosa

Este experimento se realizó con el objetivo de inducir la formación de raíces y el crecimiento de las plantas *in vitro* para su posterior transferencia a la fase de aclimatización. Se estudiaron dos auxinas con tres concentraciones cada una, combinadas con dos concentraciones de sacarosa (3.0 y 4.0 g.l⁻¹). Se utilizó un medio de cultivo en estado líquido compuesto por las MS, suplementado con 1.3 mg.l⁻¹ de tiamina y 100 mg.l⁻¹ de mioinositol.

Tabla 3. Concentraciones de AIA, AIB y sacarosa utilizadas durante la fase de enraizamiento *in vitro* de Lirio antorcha.

Tratamientos	AIA (mg.l ⁻¹)	AIB (mg.l ⁻¹)	Sacarosa (%)
1	0.65	0	3.0
2	0.65	0	4.0
3	1.3	0	3.0
4	1.3	0	4.0
5	2.6	0	3.0
6	2.6	0	4.0
7	0	1	3.0
8	0	1	4.0
9	0	2	3.0
10	0	2	4.0
11	0	3	3.0
12	0	3	4.0

A los 28 días de cultivo se evaluó la longitud de la planta (cm) y el número de raíces.

3.3.2. Influencia del manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo (Tabla 4) en el enraizamiento de los explantes. Para ello se transfirieron plantas cultivadas *in vitro* con seis subcultivos en la fase de multiplicación a medio de cultivo de enraizamiento, el cual estuvo compuesto por las sales MS suplementado con 1.3 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 0.65 mg.l⁻¹ de AIA y 3.0 % de sacarosa.

A los 28 días de cultivo se evaluó la altura de la planta (cm), el número de hojas, el número de raíces y la supervivencia.

Tabla 4. Manejo de los explantes y estado físico del medio de cultivo utilizado en la fase de enraizamiento de Lirio antorcha.

Tratamientos	Altura del explante y manejo	Estado Físico del medio de cultivo
1	Explantes entre 1.0 – 2.9 cm	Semisólido

Tratamientos	Altura del explante y manejo	Estado Físico del medio de cultivo
	individualizados	
2	Explantes entre 1.0 – 2.9 cm individualizados	Líquido
3	Explantes mayores de 3.0 cm individualizados	Semisólido
4	Explantes mayores de 3.0 cm individualizados	Líquido
5	Explantes mayores de 3.0 cm sin individualizar	Semisólido
6	Explantes mayores de 3.0 cm sin individualizar	Líquido

3.4. Fase de aclimatización

3.4.1. Comportamiento de las plantas obtenidas *in vitro* durante la fase de aclimatización

El siguiente experimento se diseñó con el objetivo de estudiar la influencia que tiene la altura de la planta cultivada *in vitro* procedente de la fase de enraizamiento en la aclimatización de las mismas. Los tratamientos quedaron conformados de la siguiente forma:

- Plantas mayores de 5.0 cm
- Plantas entre 3.0 – 5.0 cm
- Plantas menores de 3.0 cm

Las evaluaciones se realizaron a los 30, 45, 60 días de cultivo y se tuvo en cuenta la altura de la planta (cm), el número de hojas, la salida del cepellón y la supervivencia de las plantas.

La variable salida del cepellón se evaluó de la siguiente forma, se tomaron las muestras correspondientes para cada experimento y se pesó el volumen de sustrato extraído con la planta aclimatizada, determinando por la diferencia con el volumen total de cada alvéolo el porcentaje de sustrato que se adhirió firmemente a la zona radical de la planta.

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

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase de establecimiento *in vitro*

4.1.1. Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección del material vegetal

En la tabla 5 se puede observar que existió una tendencia a la disminución de la contaminación a la medida que aumentó la concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición de los explantes.

Tabla 5. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de duración de la desinfección sobre el número de meristemos contaminados y brotados de Lirio antorcha en la fase de establecimiento.

Trat.	Concent. NaOCl (%)	Tiempo de exposición (min)	Meristemos.			
			No. de cont.	% de cont.	No. De brotados	% de brotados
1	1.5	10	10.6 c	21.1	39.1 b	78.2
2	1.5	20	10.4 c	20.7	38.5 b	76.5
3	1.5	30	7.4 b	14.7	30.5 bc	74.1
4	2.0	10	6.25 b	12.5	39.8 b	79.6
5	2.0	20	3.6 a	7.2	44.7 a	89.4
6	2.0	30	3.6 a	7.2	39.5 b	79.1
7	2.5	10	3.8 a	7.5	40.5 ab	80.3
8	2.5	20	2.4 a	4.7	39.3 b	78.5
9	2.5	30	2.1 a	4.1	35.0 c	70.0

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

El mejor resultado se obtuvo cuando se trató el explante con hipoclorito de sodio al 2.0 % durante 20 minutos (tratamiento 5), porque fue donde se logró un bajo porcentaje de contaminación, sin diferencias significativas con los tratamientos 6, 7, 8 y 9 y en el que además se observó el más alto porcentaje de brotación, que mostró diferencias significativas con los demás tratamientos, excepto con el 7, coincidiendo con los resultados obtenidos por Isaza (2004) y por Sosa (2004) en cultivares de heliconia, género que pertenece a la familia del Lirio antorcha.

Como es conocido, la presencia de microorganismos contaminantes, es uno de los principales problemas durante el establecimiento *in vitro*, sobre todo cuando el material de siembra proviene de plantas adultas y cultivadas directamente en campo (Ramírez y Salazar, 1997) y Ramírez *et al.* (1999). En este caso, los bajos porcentajes de contaminación obtenidos pudieron estar influenciados positivamente por el manejo a que fueron sometidas de las plantas donantes en condiciones de casa de cultivo.

A pesar de que el hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes que con mayor frecuencia se utilizan para el tratamiento de los explantes en la fase de establecimiento (Enjalric *et al.* 1998), no deja de ser un compuesto que puede afectar a los explantes en esta fase del proceso en dependencia de la concentración y el tiempo de exposición a que estos son expuestos. Como se observa en la tabla 5, el resultado más pobre en cuanto a la brotación de los meristemos, se alcanzó en el tratamiento (9) con la mayor concentración de hipoclorito de sodio y el mayor tiempo de exposición a dicho desinfectante, resultados con comportamientos similares han sido descritos por diversos autores como Villalobos (1982) y Rodríguez *et al.* (1999) en el cultivo del Lirio y por Delgado (2000) en Eucalipto sp.

4.1.2. Efecto del estado físico del medio de cultivo

Como se aprecia en la tabla 6, la altura alcanzada por los meristemos implantados en medio de cultivo líquido mostró diferencias significativas a la de los meristemos implantados en medio de cultivo semisólido, así mismo ocurrió con el porcentaje de meristemos muertos y brotados, mientras que no se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de contaminación.

Tabla 6. Influencia del estado físico del medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de meristemos de Lirio antorcha a los 28 días de cultivo.

Trat.	Estado físico del medio de cultivo	Altura (cm)	Meristemos					
			No. de cont.	% de Cont.	No. de muertos	% de muertos	No. de brotados	% de Brotados
1	Líqu. Con Soporte	3.9 a	3.5 a	6.95	1.0 b	2.09	46.1 a	92.2
2	Semisólido	2.7 b	3.6 a	7.12	3.7 a	7.34	43.2 b	86.5

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

Resultados similares fueron obtenidos por González (2004) al implantar yemas axilares inactivas de *Spathiphyllum*.

Este comportamiento está determinado por la mayor facilidad con que los explantes toman los nutrientes del medio de cultivo en estado líquido en comparación con un medio de cultivo en estado semisólido (Grapin *et al.*, 2000).

Se observó que los meristemos en el medio de cultivo semisólido presentaban fenolización alrededor de los mismos en la zona de contacto con el medio de cultivo, lo que pudo provocar una limitante para la absorción normal de los nutrientes.

Como se conoce en el medio de cultivo en estado líquido se logran diluir con mayor facilidad los metabolitos tóxicos que afectan el desarrollo de los ápices.

A partir de los resultados obtenidos se decidió para el establecimiento *in vitro* de meristemas de Lirio antorcha, utilizar como material vegetal de partida, ápices de plantas cultivadas en condiciones controladas tal y como se describe en el acápite 3.1. de Materiales y Métodos; desinfectar los explantes durante 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 2.0% y colocarlos en un medio de cultivo en estado líquido, condiciones todas estas que garantizan una mejor respuesta de los meristemas en cuanto a su establecimiento *in vitro*, tal y como han quedado demostrado en los experimentos realizados.

4.2. Fase de Multiplicación

4.2.1. Efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento 6-BAP y AIA

En la tabla 7 se puede observar que los mejores tratamientos para la multiplicación de los explantes fue cuando se adicionó al medio de cultivo 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y no se adicionó AIA o solo se le añadió 0.65 mg.l⁻¹ de AIA (tratamientos 10 y 11), ambos tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto a los demás.

Tabla 7. Influencia de diferentes combinaciones de 6-BAP y AIA en la multiplicación *in vitro* de los explantes de Lirio antorcha a los 28 días de cultivo.

Trat	6-BAP (mg.l ⁻¹)	AIA (mg.l ⁻¹)	Altura (cm)	No. de hojas	No. de brotes	Coefficiente de multiplicación
1	0.0	0.0	2.0 e	3.2 c	1.3 e	0.9
2	0.0	0.65	2.6 d	3.6 b	2.9 cd	1.8
3	0.0	1.30	3.0 c	3.4 bc	2.6 d	1.7
4	1.0	0.0	2.5 d	3.3 c	2.5 d	2.0
5	1.0	0.65	2.8 c	3.4 bc	3.8 bc	2.5
6	1.0	1.30	3.0 c	3.3 c	3.9 bc	2.9
7	2.0	0.0	2.7 d	3.3 c	3.9 bc	2.3
8	2.0	0.65	3.2bc	3.2 c	4.3 b	3.6
9	2.0	1.30	3.0c	3.3 c	4.0 bc	3.7
10	3.0	0.0	4.9 a	4.5 a	5.1 a	4.8
11	3.0	0.65	4.5 ab	4.2 ab	4.9 a	4.7
12	3.0	1.30	3.3 bc	3.5 bc	3.8 c	3.5
13	4.0	0.0	3.6 b	3.6 b	4.0 bc	3.7
14	4.0	0.65	3.8 b	3.4 bc	3.6 bc	3.0
15	4.0	1.30	3.4bc	3.6b	4.3 b	3.5

Letras distintas dentro de cada columna diferente estadísticamente para el test de Duncan para p< 0.05

Como en el tratamiento (10) no se emplea AIA y en el tratamiento (11) se adiciona 0.65 mg.l⁻¹ de AIA, se decidió emplear para la multiplicación de Lirio antorcha el medio de cultivo suplementado

con solo 6-BAP como se describe en el tratamiento (10), por ser un medio de cultivo más simple sin la presencia de auxinas.

Resultados similares fueron obtenidos por Migueles (2000) en *Dieffenbachia picta*; Isaza (2004) en Heliconias y González, (2004) en *Spathiphyllum*, todos al adicionar 4.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP al medio de cultivo sin la presencia de AIA.

4.2.2. Influencia del estado físico del medio de cultivo

Como se puede observar en la tabla 8 las plantas cultivadas *in vitro* que fueron subcultivadas en medio de cultivo en estado semisólido mostraron valores significativamente superiores con respecto a las subcultivadas en medio de cultivo en estado líquido para todas las variables evaluadas.

Tabla 8. Efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación de Lirio antorcha a los 28 días de cultivo.

Tratamientos (Estado físico del medio de cultivo)	Altura de la planta (cm)	No. de hojas	No. de brotes	Coeficiente de multiplicación
Líquido	3.9 b	3.4 b	3.8 b	3.10
Semisólido	5.1 a	4.2 a	4.8 a	4.60

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

Según describen Grapin *et al.* (1998), al emplear medios de cultivo en estado líquido y en condiciones estáticas, se produce un efecto negativo sobre la multiplicación de muchas especies. Similares resultados han sido observados por otros autores como Orellana (1998b) en Plátanos y Bananos, Agramonte *et al.* (1998) en Papa, Machado (2002) en Gerbera y Sosa (2004) en Heliconias.

Algunos autores han estudiado el efecto de las características físicas y químicas del medio de cultivo en estado semisólido y han comprobado en diversos cultivos que las plantas se desarrollan mejor que en medios de cultivo en estado líquido (Debergh, 1983); (Leshem, 1993).

Según Bomman y Vogelmann (1998) y Kordan (1999) es factible emplear el medio de cultivo en estado semisólido para mejorar algunas de las fases de la propagación *in vitro* o solucionar problemas que pueden surgir en el transcurso del cultivo (necrosis apical, procesos de hiperhidratación y otros).

4.2.3 Influencia del manejo de los explantes

El tipo de manejo influyó en el comportamiento de las plantas cultivadas *in vitro* en la fase de multiplicación como se muestra en la tabla 9, el tratamiento en el cual se individualizaron los explantes mayores de 1.0 cm sin realizar corte del área foliar se obtuvieron los valores más altos en relación con todas las variables evaluadas, mostrando diferencias estadísticas con los demás tratamientos.

Tabla 9. Influencia del manejo realizado al subcultivar los explantes de Lirio antorcha en condiciones de multiplicación y después de 28 días de cultivo.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	No. de hojas	No. de brotes	Coeficiente de multiplicación
(Explantes > 1.0 cm sin corte del área foliar)	4.0 a	4.4 a	4.8 a	4.50
(Explantes > 1.0 cm y con corte 50% del área foliar)	3.2 b	3.6 b	2.7 b	2.50
(Explantes > 1.0 cm y con corte 75% del área foliar)	2.5 b	2.9 c	2.3 b	2.00

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

Estos resultados demuestran que el Lirio antorcha es una especie susceptible al manejo *in vitro*, por lo que no es preciso eliminar el área foliar a las plantas cultivadas *in vitro* para estimular la brotación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sosa (2004) en especies de Heliconias. Las plantas cultivadas *in vitro* presentaron como promedio tres hojas y un pseudotallo de 0.5 cm de grosor cuando eran subcultivadas en un medio de cultivo en estado semisólido.

4.2.4 Influencia del número de explantes por frasco de cultivo

En la figura 5 se observa como disminuye el número de brotes por explante en los tratamientos con nueve y diez explantes por frasco de cultivo, con diferencias estadísticas significativas respecto a los tratamientos con seis, siete y ocho explantes por frasco. Entre estos tres últimos tratamientos no se observan diferencias estadísticas, pero se propone emplear ocho explantes por frasco de cultivo (tratamiento 3) ya que dentro de los tratamientos que dan la mayor cantidad de brotes por explantes, es el tratamiento en que se aprovecha mejor el medio de cultivo, al disponer cada explante de solo 3.75 ml.

Según describió Orellana (1994), en plátanos y bananos la densidad de explantes por frascos depende de la variedad a utilizar, y esta cantidad oscila entre seis y ocho explantes por frascos de cultivo.

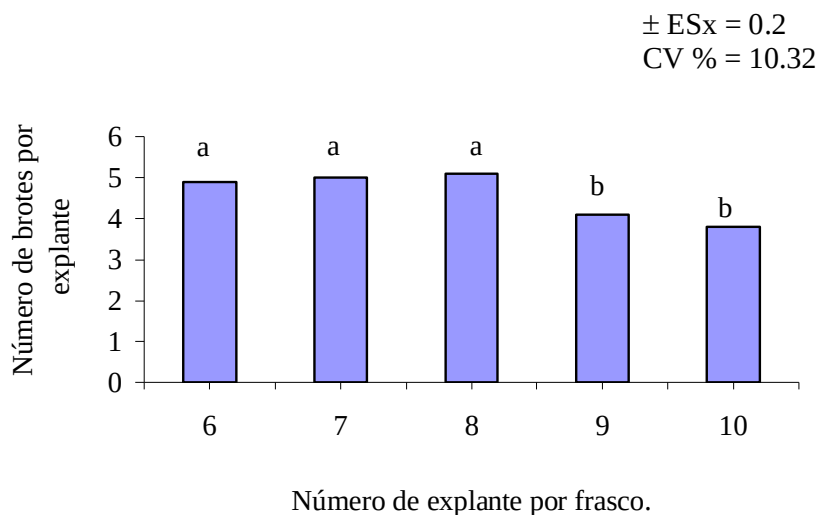


Figura 5. Comportamiento del número de brotes por explante que se alcanza en dependencia del número inicial de explantes que se colocan por frasco de cultivo.

A partir de los resultados obtenidos al evaluar el comportamiento de las plantas *in vitro* en la fase de multiplicación se decidió colocar ocho explantes por frasco de cultivo, los cuales deberán tener más de 1.0 cm de altura y no se les eliminará el área foliar, a su vez estos explantes se colocaran en un medio de cultivo en estado semisólido, suplementado con 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP, y de esta forma se garantizan resultados satisfactorios en la multiplicación de esta especie.

4.3. Fase de enraizamiento

4.3.1. Efecto del AIA, el AIB y la sacarosa

Los resultados de la tabla 10 muestran que existieron diferencias significativas en cuanto al número de raíces y la altura de la planta entre los tratamientos en los cuales se empleó AIA, con respecto a aquellos donde se utilizó el AIB.

A partir de estos resultados se decidió continuar utilizando el tratamiento (1), por ser el tratamiento en el cual se emplea la menor concentración de AIA y sacarosa, con lo cual se logra reducir costos en esta fase del proceso.

Tabla 10. Efecto de la concentración y combinación de AIA, AIB y sacarosa en la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes de Lirio antorcha después de 28 días de cultivo.

Tratamientos	AIA (mg.l ⁻¹)	AIB (mg.l ⁻¹)	Sacarosa (%)	No. de raíces	Altura de la planta (cm)
1	0.65	0.0	3.0	6.2 a	5.3 a
2	0.65	0.0	4.0	6.2 a	5.4 a

3	1.3	0.0	3.0	6.4 a	5.5 a
4	1.3	0.0	4.0	6.5 a	5.6 a
5	2.6	0.0	3.0	5.9 a	5.0 a
6	2.6	0.0	4.0	6.0 a	5.2 a
7	0.0	1.0	3.0	4.9 b	4.2 b
8	0.0	1.0	4.0	5.0 b	4.3 b
9	0.0	2.0	3.0	4.9 b	4.4 b
10	0.0	2.0	4.0	5.4 b	4.4 b
11	0.0	3.0	3.0	5.1 b	4.3 b
12	0.0	3.0	4.0	5.4 b	4.4 b

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

Se puede observar además, que entre los tratamientos que combinaron AIA con 3.0 o 4.0%, no hubo diferencias estadísticas significativas, lo mismo ocurrió al combinar AIB con ambas concentraciones de sacarosa.

Resultados similares obtuvo Villalobos (1982), en el cultivo del Crisantemo y Vuylsteke (1989), este último demostró la acción de las auxinas sobre el alargamiento celular lo cual provocó el crecimiento de raíces de plátano.

Según Quintana (1995), el empleo precisamente de AIA es lo más recomendado para la mayoría de los medios de cultivo de enraizamiento descritos en la literatura en detrimento de otras auxinas.

Resultados similares han sido obtenidos además, por Machado (2002) en Gerbera, González (2004) en el cultivo del *Spathiphyllum* y Sosa (2004) en Heliconias.

4.3.2 Influencia del manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo

El estado físico del medio de cultivo y el manejo de los explantes influyeron en el desarrollo de las plantas *in vitro* en la fase de enraizamiento y en el porcentaje de supervivencia, los mejores resultados se obtuvieron con explantes mayores de 3.0 cm e individualizados (tratamientos 3 y 4), tanto en medio de cultivo en estado líquido como semisólido (Tabla 11), ambos tratamientos se comportaron estadísticamente superiores a los restantes, a partir de los resultados obtenidos se propone utilizar el tratamiento (4), lo cual permite incurrir en un menor gasto de reactivos y no utiliza agar, disminuyendo de esta forma los costos si tenemos en cuenta que esta fase del proceso es en la que se dispone de mayor cantidad de material vegetal.

Como se puede observar en la tabla 11, no hubo diferencias estadísticas significativas con respecto al estado físico del medio de cultivo siempre y cuando los explantes recibieron el mismo manejo, con lo cual se puede concluir que la influencia que ejerció el estado físico del medio de cultivo sobre el enraizamiento de las plantas fue menor que la que ejerció el manejo realizado a los explantes al colocarlos en esta fase del proceso.

Tabla 11. Efecto del manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo en el enraizamiento de los explantes de Lirio antorcha a los 28 días de ser subcultivados.

Tratamientos	No. de raíces	Altura de la planta (cm)	No. de hojas	No. de plantas vivas	% de supervivencia
1	4.3 b	4.6 b	3.2 b	153.8 b	96.1
2	4.6 b	4.8 b	3.3 b	154.1 b	96.3
3	5.5 a	5.5 a	3.7 a	160 a	100
4	5.8 a	5.8 a	3.9 a	160 a	100
5	3.6 c	4.0 c	3.0 c	124.5 c	77.8
6	3.9 c	4.2 c	2.9 c	127.4 c	79.6

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

Según Langford y Wainwright, (1997) al trabajar con el cultivo de Rosa, cuando se realiza un manejo adecuado de los explantes en el último subcultivo de multiplicación o en el momento de realizar el subcultivo de enraizamiento, se favorece la calidad de las plantas *in vitro* que se obtienen en esta fase del proceso y por consiguiente, el comportamiento de estas plantas en la fase de aclimatización.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta fase del proceso, se propone colocar explantes mayores de 3.0 cm e individualizados en medio de cultivo líquido, suplementado con 0.65 mg.l⁻¹ de AIA y 3.0% de sacarosa, con lo cual se garantiza un 100% de supervivencia.

4.4 Fase de aclimatización

4.4.1 Comportamiento de las plantas cultivadas *in vitro*

En la tabla 12 se puede observar que entre los tres tratamientos hubo diferencias significativas, en cuanto al porcentaje de supervivencia. El mayor valor de supervivencia (99.6 %) se alcanzó cuando se transfirieron plantas mayores de 5.0 cm.

Independientemente del tratamiento, la altura de las plantas se incrementó a medida que transcurrió el experimento (30, 45 y 60 días), el mayor valor se alcanzó cuando fueron transferidas a la fase de aclimatización plantas producidas *in vitro* mayores de 5.0 cm de altura, similar comportamiento se observó al evaluar el parámetro No. de hojas.

Tabla 12. Influencia de la altura de las plantas obtenidas *in vitro* sobre el comportamiento de estas en la fase de aclimatización durante 60 días de cultivo.

Trat.	Superviv. (%)	Altura (cm)			No. de hojas			Salida del cepellón		
		30 días	45 días	60 días	30 días	45 días	60 días	30 días	45 días	60 días
1	99.6 a	11.4 a	13.4 a	14.0 a	5.1 a	6.2 a	7.6 a	3.0 a	3.0 a	3.0 a
2	95.4 b	8.5 b	11.6 b	13.5 ab	3.8 b	5.1 b	7.3 a	2.7 b	3.0 a	3.0 a
3	76.3 c	5.1 c	7.2 c	11.4 b	2.9 b	4.4 c	6.5 b	2.1 c	2.7 b	3.0 a

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

Para la variable salida del cepellón, se pudo comprobar que en el caso de las plantas obtenidas *in vitro* con más de 5.0 cm de altura, a los 30 días de cultivo el resultado alcanzado fue similar al observado posteriormente a los 60 días. Este resultado a los 30 días presentó diferencias estadísticas significativas con los restantes tratamientos en los cuales las plantas tenían una altura menor a los 5.0 cm.

Según Pérez *et al.* (2001) en el cultivo de *Alpinia purpurata* L. (Ginger), el tamaño de la planta cultivada *in vitro* al ser transferidas a la fase de aclimatización es directamente proporcional con el porcentaje de supervivencia en condiciones *ex vitro* e inversamente proporcional con el tiempo de estancia de las plantas en las casas de cultivo.

Estas diferencias fueron observadas en la fase de aclimatización de plantas cultivadas *in vitro* de la Gerbera por Torres (1999) y Machado (2002), en plantas de *Solanum tuberosum* L. por Jiménez (2000) y en plantas de Heliconias por Sosa (2004).

También se observó que en el tratamiento (2) que corresponde a las plantas de 3.0 a 5.0 cm de altura y en el cual se logró una supervivencia de 95.4%, se alcanzaron resultados similares al tratamiento (1) (> 5.0 cm), pero ya a los 60 días de cultivo, o sea 30 días después.

El conocimiento de estas diferencias entre los grupos de plantas de acuerdo a la altura alcanzada en la fase de enraizamiento, permite establecer diferentes manejos en la estrategia de producción sobre la base del volumen de plantas que corresponda a cada grupo.

A partir de los resultados obtenidos se recomienda transferir a la fase de aclimatización plantas con más de 5.0 cm de altura, con lo cual se logra disponer de este material vegetal para su siembra en condiciones de campo con sólo 30 días de estancia en las casas de cultivo.

5. CONCLUSIONES

1. Los mejores resultados en la desinfección y establecimiento *in vitro* de meristemos apicales de Lirio antorcha, se alcanzaron al combinar una concentración de hipoclorito de sodio del 2.0% con un tiempo de desinfección de 20 minutos y utilizar medio de cultivo en estado líquido, con sólo 6.9% de contaminación y 92.2% de meristemos brotados.
2. Los mayores coeficientes de multiplicación (4.8 y 4.7) se lograron al suplementar medio de cultivo en estado semisólido con 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y con 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP más 0.65 mg.l⁻¹ de AIA respectivamente, se demostró además, que la multiplicación de los explantes fue mejor en medio de cultivo en estado semisólido, que en estado líquido.
3. En la fase de multiplicación se demostró además, que se logra un mejor coeficiente de multiplicación cuando se colocan ocho explantes en 30 ml de medio de cultivo y estos explantes tienen más de 1.0 cm de altura y no se les elimina el área foliar.
4. Se obtuvo 100% de supervivencia y enraizamiento de las plantas *in vitro* al colocar explantes mayores de 3.0 cm e individualizados en medio de cultivo líquido, suplementado con 0.65 mg.l⁻¹ de AIA y 3.0% de sacarosa.
5. El mejor porcentaje de supervivencia (99.6%) se logró cuando se transfirieron plantas enraizadas *in vitro* con más de 5.0 cm de altura a la fase de aclimatización, lo que además permitió disponer de plantas listas para su siembra en condiciones de campo en sólo 30 días de cultivo.

6. RECOMENDACIONES

1. Aplicar el protocolo de propagación *in vitro* descrito en el presente trabajo para la producción de plantas de Lirio antorcha.
2. Evaluar el comportamiento de las plantas obtenidas en plantaciones comerciales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D., Pérez, M. y Pérez, A. 1993. Empleo del hipoclorito de sodio NaOCl en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola 2pp 88-89.
- Agramante, D., **** En: Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Alvarez, Pinto, M. 1987. Floricultura. Editorial Pueblo y Educación. p 670-681
- Auerbach, M. J., Strong, D. R. 1991. Nutritional ecology of Heliconia herbivores: Experiments with plant fertilization and alternative hosts. Ecological Monographs 51: 63-84.
- Ballester, R. y González, A. 1983. Comprobación de la eficiencia de nuevos medios de cultivo en el enraizamiento de plantines de caña de azúcar (Saccharum sp. Híbrido) obtenidos por cultivo de tejidos. Trabajo de Diploma. Universidad Central de las Villas. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Bomman, Ch. Y Vogelmann, T. C. 1998. Effect of rigidity of gel medium on benziladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in Picea abies. Physiol. Plant 61: pp 502-512.
- Borris, P. 1995. Manual de Floricultura. pp 2-3.
- Burt, B. L. & R. M. Smith. 1986. *Etlingera*: the inclusive name for *Achasma*, *Geanthus* and *Nicolaia* (Zingiberaceae). Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh 43: 235-241.
http://www.agrotropical.andes.com/heliconia_ging_etlingerared_esp.htm3/7/06.
- Centre For the promotion of developing countries “cut flowers and foliage”, 2002. En: www.intracen.org.2002
- COEXPORT. 2001. Plantas ornamentales y flores. El Salvador. <http://www.agronegocios.gob.sv/t/c/news/docs>.
- Conger, B. and Carabia, J. 1978. Callus induction and planted regeneration in orchardgrass. Crop. Science. 18(1): 157.
- Criley, R. A. 1998. Propagation methods for Heliconias and Gingers. Bull. Heliconia Soc. Int. 3(2): 1-7.
- Dataflowers 2004. En: www.dataflowers.com/english/statistics.htm#usa
- Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant. 59:270-276.
- Delgado, L. A. 2000. Micropropagación de Eucalyptus grandis (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales de árboles seleccionados. Tesis presentada en opción al título académico

- de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Martha Abreu” de las Villas. Cuba.
- Devia, W. 1995. Heliconias del Valle del Cauca. Instituto Vallecaucano de Investigaciones Científicas. Cali, Colombia. 129 p.
 - Edgarjardinerías-Heliconias. Plantas tropicales, 2000.
<http://www.grancanariaweb.com/edgar/botánica>.
 - Enjalric, F., Carron, P. P. y Lardet, L. 1998. Contamination of primary cultura bin tropical áreas: The case of Heveabra siliensis. Acta Hort 225: pp 57-66.
 - Evans, D. A. and Bravo, J. E. 1985. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. In: Zimmerman, R. H. et al.(Eds), Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops: 73-92.
 - Fralkiner, F. R. 1998. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue. Ind. Soc Plant Tiss. Cult. Newsletter 60: pp 13-23.
 - Fuentes, R. 2003. Taller con pétalos y aroma. El habanero, periódico.
<http://www.elhabanero.cubaweb.cu>.
 - ***George, E.F. 1999. Plant propagation by tissue culture. The Technology Exegetics Limited. pp. 130 – 192.
 - Grapin, A., Michaux Ferriere, N., Etienne H. and M. Carron. 1998. Effects of hypoxia on induction and development of somatic embryos in Hevea brasiliensis. In: *in vitro* culture of tropical plants. Ed by Claude Teisson. CIRAD. Pp 23-25.
 - Gilbert, L. y Pierik, R. 1991. Propagación y composición del medio de cultivo. In: Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. 3ª. ed. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid, España pp 45-86.
 - González, A. 2004. Tecnología para la micropropagación *in vitro* del Spathiphyllum stanlai. Tesis presentada en opción al título académico de Master en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de la Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez”. Facultad de Ciencias Agrarias. Cienfuegos. Cuba.
 - ****Grout, B. y Millan, S. 1985. Photosynthetic developmet of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Ann. Bot. 55: pp 129-131.
 - Hernández, R. 1997. Obtención de plantas libres de patógenos. Curso Teórico- Práctico de Propagación Masiva de Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Pp 31-43.
 - Hu, C. V. and J. P. Wang. 1983. Meristem. Shoot tip and bud culture. In: Handbook of Plant Cell, Ed By Evans, D. A., Ammirato, P. V., Yameda, Y. pp 256-290.

- Hu, C. y Wang, P. 1993. “*in vitro*” cloning of the deciduous timber trees *Sassafras randaiense*. *Zpflanzenphysiol.* pp 214-220.
- Isaza, L. Establecimiento *in vitro* con fines de producción masiva. [2004] Año 10 No. 26 pp193-198. <http://www.utp.edu.co/php/revistas/scienciaettecnica>.
- Jiménez, E. 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp Híbrido). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro* (capítulo 1) En: Propagación y mejora de plantas por Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. pp 13-22.
- Jiménez, F. 2000. Aclimatización de plantas *in vitro*” y producción de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casas de cultivos. Tesis para optar por el grado científico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- ***Kaetha, K. y Belcher, A. 1996. Elimination of viruses from cultura in presence of antiviral chemical. En withers LA, Alderson PG (Eds) *Plant tissue culture and its application*. Butterworth, London pp 219-238.
- Kartha, K. 1981. Meristem culture and cryopreservation. In *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in agriculture*. Ed. By T. A. Thorpe. Academic Press. Pp 321-325.
- Kress, W. J. 1998. Bat pollination of an old world *Heliconia*. *Biotropica* 17: 302-308.
- ***Krikorian, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Willians, M. Roca, Luis, Mroginski (Eds). Pp 95-96.
- Kordan, H. 1999. Inorganic ions present in comercial agar. *Physiol. Pflanz.* 183: 355-359.
- Lane, W. D. 1979. *Physiol. Plant.* 45: 260-264.
- Leshem, B. 1993. Growth of carnation meristem *in vitro*. *Anatomical Structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium of their formation.* *Ann. Bot.* 52: 413-415.
- Liogier, H. A. and Martorell, L. F. 1982. *Flora of Puerto Rico and Adjacent Islands: A Systematic Synopsis*.
- ***Maciel, N. 1999. Consideraciones sobre el genero *Heliconia* L. Características del crecimiento, desarrollo y floración de *Heliconia biahii* (L) L. y *H. latispatha* Benth. Bajo diferentes luminosidades. Tesis Mag. Sc. Barquisimetro, Venezuela. Universidad Centro occidental Lisandro Alvarado. Pp 207-208.

- Machado, P. 2002. Micropropagación *in vitro* de la Gerbera Jamenssonii H Bolus. Tesis presentada en opción al título académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- ***Madriz, R., Noguera, R. y Smits, G. 1989. Patógenos foliares en Heliconia psittacorum L. Fitopatol. Venez. 2: 61 Resumen.
- Maretzki, A. y Hiraki, P. 1980. Sucrose promotion of roots formation in plantlets regeneration from callus of Saccharum sp. Dyton 38 (1): 84-87.
- Maribona, R. H., S. Quintero, Marianela López, Dayami Pérez y Odalis Pérez. 1999. Cultivo axénico de la malanga. (En preparación).
- ***Martínez, S. J. 1995. Perfeccionamiento de la tecnología para la micropropagación *in vitro* de Plátanos y Bananos (Musa spp). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- Mercados Verdes. 2003. <http://www.cam.gov.co/planes/mercaverde.htm>.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology. 15: pp 473-479.
- Murashige, T. 1982. Regeneration of plants. California Agriculture 36 (8): 19-20.
- Noticias Finagro. 2000. Finagro apoya cultivo de flor tropical para exportación. <http://www.finagro.com.co/@noticias>.
- ***Olivera, Z., Gutiérrez, A., Gutiérrez, J. y Rodríguez, M. 2000. Cultivo *in vitro* de Gerbera (Gerbera Jamesonii H. Bolus) y su aclimatización en invernaderos. BIOAGRO: 12(3): 75-80.
- Orellana, P. 1994. Micropropagación *in vitro* de Plátanos y Bananos. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- Orellana, P. 1998-a. Introducción a la Propagación Masiva. (capítulo 7). En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. Pp 125-132.
- Orellana, P. 1998-b. Introducción a la Propagación Masiva (capítulo 9). En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. Pp 81-160.
- Pérez, M y Pastelón, C. 2001. Establecimiento aséptico a partir de ápices de ginger (Alpinia purpurata). Décimo cuarta reunión científica-tecnológica-forestal y agropecuaria. Veracruz-México.

- Pérez, P. J. N., Jiménez, E. y Agramonte, D. 1998. Propagación masiva en Biofábrica (capítulo 14). En: Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Quintana, M. R. 1995. Cultivo *in vitro* en *Vigna luteola* SC-123. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas.
- ***Ramírez, D. 2000. Introducción de Nuevos Frascos en el Proceso Productivo en las Biofábricas. Tesis para optar por el grado científico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Sauvaire, D., Galzy, H. 1981. Micropropagation de la canne a sucre par bouturage *in vitro*. Action d'une auxine et d'une cytokinine. L' Agronomic Tropicale. (1).
- Sosa, R, Flora Margarita. 2004. Propagación *in vitro* de la *Heliconia Standdley Macbride*. Tesis presentada en opción al título académico de Master en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de la Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez". Facultad de Ciencias Agrarias. Cienfuegos. Cuba.
- Términos Tainos-B. 2001. *Heliconia bihai* como planta ornamental. http://www.jmarcano.com/mipais/historia/terminos/taino_b.html.
- Torres, J. G. 1999. Micropropagation and acclimatization of *Hedera multiflorum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48 pp 213-217.
- Tropical Silk Plants, 2004. Condiciones agroclimáticas. <http://members.lycos.n/goolffen/index-74>.
- Vargas, W. 2002. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes Centrales. Manizales: Universidad de Caldas, Centro editorial.
- Vázquez, B. E., Torres, G. S. 1981. Fisiología Vegetal. Crecimiento y Desarrollo. Ed. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana. Pp 317-362.
- Villalobos, A. V. 1982. Tissue cultura applied to ornamental species in: Micropropagation of selected root crop, ornamental species. Rome pp 155-164.
- Villalobos, A., García, V. A. 1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y ápices vegetativos, Agrociencia. 48: 107-118.
- Villegas, M. A. 1990. Desinfección del material vegetativo. En: Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejido vegetal. FAO p 21.

- ***Wainwright, H y Scrace, J. 1998. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. Sci. Hort. 38 pp 261-267.
- Wang, P. J. 1981. Clonal Multiplication of *Cryptomeria japonica* D. Don *in vitro*. In: Studies and Essays in Commemoration of the Golden Jubilee of Academia Sinica, Taipei, Taiwan: pp 559-566.
- Wang, P. J. and Hu, C. 1998. Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In: Advances in Biochemical Engineering. Vol. 18, Plant Cell Cultures II. A. Fietchker (Eds) pp 61-99.
- Wang, P. J. and Charles. 1991. Clonal multiplication of *Cryptomeria japonica* D. Don *in vitro*. In: Studies and Essays in Commemoration of the Golden Jubilee of Academia Sinica, Taipei, Taiwan: 559-566.
- Zárraga de Galdeano, J. y Granada. 1990. Micropropagación *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii*) Boletín informativo de FIRA. 216 (22) pp 14-20.
- Zimmerman, J. L. y Currier, T. 1991. Somatic embryogenesis: A model for early development in Higher plants. The plant cell 5. pp 530-560.
- Florvertical 2004. En: www.florvertical.com.
- Flowers 2004. En: www.1800flowers.com
- PROEXPORT. Exportaciones de Colombia. 2002.
- Edición electrónica del Periódico Guerrillero. Órgano Oficial del Comité del Partido Provincial de Pinar del Río http://www.guerrillero.co.cu/ecosde/trabajos/laflori_1.htm
Consulta el 4/7/06
- MOBOT, 2006. En <http://www.mobot.org/MOBOT/research/treat/zingiber.shtml>
Consulta el 29/06/06
- Floricultura Andina. 2006 En: http://www.encolombia.com/economia/floriculturandina_heliconias2.htm Consulta el 3/7/06
- http://www.agrotropical.andes.com/heliconia_ging_etlingerared_esp.htm 3/7/06.
- http://www.aujardin.info/plantes/rose_de_porcelaine.php 3/7/06

8. ABREVIATURAS

AIA: Ácido 3 – indolacético

AIB: Ácido 3 – indolbutírico

6 – BAP: 6 bencilaminopurina

LCS: Líquido con soporte

MS: Murashige y Skoog (1962)

NaOCl: Solución de hipoclorito de sodio

SS: semisólido