



## Micropropagation of three heliconia species of commercial interest in Mexico via direct organogenesis

## Micropropagación de tres especies de heliconia de interés comercial en México vía organogénesis directa

Hernández-Meneses, E.<sup>1</sup>; López-Peralta, M. C. G.<sup>2\*</sup>; Estrada-Luna, A. A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad (PREGEP)-Fisiología Vegetal, Colegio de Postgraduados;

<sup>2</sup>PREGEP-Genética, Colegio de Postgraduados, 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México;

<sup>3</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados – Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Hernández-Meneses, E., López-Peralta, M. C. G., Estrada-Luna, A. A. (2018). Micropropagation of three heliconia species of commercial interest in Mexico via direct organogenesis. *Revista Bio Ciencias* 5:e487. doi:<https://doi.org/10.15741/revbio.05.e487>



### ABSTRACT

Heliconias are tropical ornamentals plants cultivated mainly as a cut flower. Its cultivation in Mexico has experienced limited growth due to some problems that include obtaining vegetative material of high phytosanitary quality. In this research, a protocol to obtain plants of *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* and cv. Golden Torch via direct organogenesis was developed. The lateral buds were disinfected with commercial detergent, sodium hypochlorite (30 % v/v), colloidal silver (3 % v/v) and Tween® 20. Benzylaminopurine concentrations (4.4-17.8 µM) were evaluated to induce and multiply shoots as well as auxins to promote rooting. Histological sections were performed to determine the anatomical origin of the shoots. In the acclimatization, three substrates and three

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: April 10<sup>th</sup> 2018.

Accepted/Aceptado: August 23<sup>rd</sup> 2018.

Available on line/Publicado: November 22<sup>nd</sup> 2018.

### RESUMEN

Las heliconias son ornamentales tropicales cultivadas principalmente como flor de corte; su cultivo en México ha experimentado un crecimiento limitado por algunos problemas que incluyen la disponibilidad de material vegetativo de alta calidad fitosanitaria. En esta investigación se desarrolló un protocolo de micropropagación de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y cv. Golden Torch vía organogénesis directa. Las yemas laterales se desinfectaron con detergente comercial, hipoclorito de sodio (30 % v/v), plata coloidal (3 % v/v) y Tween® 20. Se evaluaron concentraciones de benzilaminopurina (4.4-17.8 µM) para inducir y multiplicar brotes así como auxinas para promover el enraizamiento. Se hicieron cortes histológicos para determinar el origen anatómico de los brotes. En la aclimatación se probaron tres sustratos y tres dosis de solución nutritiva Steiner (1961). En *H. collinsiana* la inducción de 4.8 brotes por explante se logró en medio de cultivo MS adicionado con 13.3 µM de benzilaminopurina, mientras que en *H. nickeriensis* y cv.

#### \*Corresponding Author:

López-Peralta, María Cristina Guadalupe. PREGEP-Genética, Colegio de Postgraduados, 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. Phone: +52(595) 9520200 Ext. 1540. E-mail: [cristy@colpos.mx](mailto:cristy@colpos.mx)

doses of the nutrient solution Steiner (1961) were tested. In *H. collinsiana* 4.8 shoots per explant was induced in MS culture medium added with 13.3  $\mu\text{M}$  of benzylaminopurine, while in *H. nickeriensis* and cv. Golden Torch the induction of 3.0 and 2.1 shoots per explant was reached with 11.1  $\mu\text{M}$  of benzylaminopurine, respectively. The shoots originated at the base of the explant and in the axils of the leaves. The shoots multiplication was obtained with 11.1  $\mu\text{M}$  of benzylaminopurine combined with 1  $\mu\text{M}$  of indoleacetic acid in the three species; 6.9 shoots per explant in *H. collinsiana*, 4.1 shoots in cv. Golden Torch and 3.6 in *H. nickeriensis*. The shoots originated at the base of the explant from axillary buds and shoots primordia differentiated from procumbium. The rooting was induced with 1  $\mu\text{M}$  of naphthaleneacetic acid and the acclimatization of the plants was achieved in peat and perlite mixture with 50 % Steiner nutrient solution after 55 days of the transplant.

---

### KEY WORDS

*H. collinsiana*, *H. nickeriensis*, Golden Torch, micropropagation, regeneration, native.

---

### Introduction

Heliconias are perennial herbaceous plants mainly cultivated as cut flowers, though its cultivation is also important as pot plants destined to interiors and gardens (Criley, 2000; Loges *et al.*, 2007). Flowers of heliconias are highly appreciated in national and international markets due to the exotic morphology of their inflorescence and bright colors of their bracts. Their cultivation and commercialization in Hawaii and Colombia represents a prosperous industry (Santos *et al.*, 2009).

Heliconias originate from the tropics of Central and South America and from a wide area in the Pacific Ocean, west of Indonesia. They include a family integrated by approximately 200 species. Mexico has the native genetic resources like *Heliconia uxpanapensis* C. Gutierrez Báez (Suárez-Montes *et al.*, 2011), *H. champneiana* Griggs cv. Maya Gold, *H. latispatha* Benthham cv. Orange Gyro, *H. vaginalis* Benthham and *H. wagneriana* Petersen (Santos *et al.*, 2009). In Costa Rica, Honduras, Colombia, Ecuador, Jamaica, Guyana, Barbados, Trinidad and Tobago, and Surinam, heliconias have become the main ornamental cultivation for cut flower thanks to the diversity of commercial cultivars (Jerez, 2007). The most popular heliconias are those that

Golden Torch la inducción de 3.0 y 2.1 brotes se obtuvo con 11.1  $\mu\text{M}$  de benzilaminopurina, respectivamente. Los brotes se originaron en la base del explante y en las axilas de las hojas. La multiplicación de brotes se obtuvo con 11.1  $\mu\text{M}$  de benzilaminopurina combinado con 1  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético en las tres especies; 6.9 brotes por explante en *H. collinsiana*, 4.1 brotes en cv. Golden Torch y 3.6 en *H. nickeriensis*. Los brotes se originaron en la base del explante a partir de yemas axilares y de primordios de brote diferenciados del procámbium. El enraizamiento se indujo con 1  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenacético y la aclimatación de las plantas se logró en mezcla de turba y perlita con riegos de 50 % de solución nutritiva Steiner después de 55 días del trasplante.

---

### PALABRAS CLAVE

*H. collinsiana*, *H. nickeriensis*, Golden Torch, micropropagación, regeneración, nativa.

---

### Introducción

Las heliconias son herbáceas perennes cultivadas principalmente para flores de corte, aunque su cultivo también es importante como plantas para maceta destinadas a interiores y jardines (Criley, 2000; Loges *et al.*, 2007). Las flores de las heliconias son altamente apreciadas en mercados nacionales e internaciones debido a la morfología exótica de sus inflorescencias y los colores brillantes de sus brácteas. Su cultivo y comercialización en Hawaii y Colombia representa una industria próspera (Santos *et al.*, 2009).

Las heliconias son originarias de los trópicos de Centro y Sudamérica, y de una extensa área en el Océano Pacífico al oeste de Indonesia. Comprenden una familia integrada por 200 especies aproximadamente. México cuenta con recursos genéticos nativos como *Heliconia uxpanapensis* C. Gutiérrez Báez (Suárez-Montes *et al.*, 2011), *H. champneiana* Griggs cv. Maya Gold, *H. latispatha* Benthham cv. Orange Gyro, *H. vaginalis* Benthham y *H. wagneriana* Petersen (Santos *et al.*, 2009). En Costa Rica, Honduras, Colombia, Ecuador, Jamaica, Guyana, Barbados, Trinidad y Tobago y Surinam, las heliconias se han convertido en el principal cultivo ornamental para flor de corte gracias a la diversidad de cultivares comerciales (Jerez, 2007). Las heliconias más populares son las que producen inflorescencias erectas y colgantes con brácteas de coloración roja y rosa como

produce erected and pendant inflorescences with red and pink bracts like *H. bihai* (cv. Pink Peach), *H. chartacea* (cv. Sexy Pink, cv. Sexy Scarlet), *H. rostrata*, *H. stricta* (cv. Iris Red, cv. Tagami), among others (Baltazar et al., 2011).

Despite of the diversity of species of heliconias in Mexico, being the main center of origin and having favorable environmental conditions, the growth of this crop at commercial scale has been limited by several factors. The most important factors are the lack of experience on care and handling of native species and commercial cultivars, the lack of efficient propagation systems of vegetative material of high phytosanitary quality and the diversification with genetically superior varieties (high winter and annual productivity and long postharvest life). This last aspect has propitiated the cultivation of native species for which no culture systems nor agronomic handling have been established (Murguía et al., 2007; Iracheta-Donjuan et al., 2013). Currently, species and commercial varieties are cultivated in southeastern Mexico (Chiapas, Tabasco, Veracruz) like *H. bihai* (cv. Pink Peach), *H. caribaea* (cv. Black Magic, cv. Green Thumb), *H. latisphata*, *H. orthotricha* (cv. Edge of Nite, cv. She), *H. psittacorum* (cv. Lady Di, cv. Sassy), *H. rostrata*, *H. stricta* (cv. Las Cruces, cv. Tagami) and *H. wagneriana*.

The main method of propagation of heliconia is by division of rhizomes because it is the most efficient way to maintain clonal populations. However, the risk of transmission of bacterial and fungus diseases is high, and the rate of reproduction of shoots is variable. There are species and cultivars that produce up to 50 new plants a year (*H. psittacorum*), while others only produce from three to five plants (*H. caribaea* and *H. vellerigera*). The sexual propagation is not commercially used because germination rates are low as a consequence of rigidity of the endosperm and latency, which also can slow it down from three months to three years (Simão & Scatena, 2003; Iracheta-Donjuan et al., 2013).

Plant tissue culture has played an important role in the propagation of many plant species, including ornamentals, since efficient protocols have been established to clone elite genotypes (Jain & Ochatt, 2010). In addition, histological methods allow understand *in vitro* culture systems and of anatomical and histochemical changes provide information on the cellular processes which lead to a determined morphogenic route (Yeung, 1999). In literature, *in vitro* propagation of some heliconia have been reported (Nathan,

*H. bihai* (cv. Pink Peach), *H. chartacea* (cv. Sexy Pink, cv. Sexy Scarlet), *H. rostrata*, *H. stricta* (cv. Iris Red, cv. Tagami), entre otras (Baltazar et al., 2011).

En México, a pesar de ser el principal centro de origen de heliconias, presentar diversidad de especies y disponer de las condiciones ambientales y propicias, el crecimiento de este cultivo a nivel comercial ha estado limitado por varios factores entre los que destacan la falta de experiencia sobre el cuidado y manejo de especies nativas y cultivares comerciales, la carencia de sistemas eficientes de reproducción de material vegetativo de alta calidad fitosanitaria y la diversificación con variedades genéticamente superiores (alta productividad invernal y anual y larga vida postcosecha). Este último aspecto ha propiciado el cultivo de especies nativas para las cuales no se han establecido sistemas de cultivo ni manejo agronómico (Murguía et al., 2007; Iracheta-Donjuan et al., 2013). Actualmente se cultivan en el sureste de México (Chiapas, Tabasco, Veracruz) especies y variedades comerciales como *H. bihai* (cv. Pink Peach), *H. caribaea* (cv. Black Magic, cv. Green Thumb), *H. latisphata*, *H. orthotricha* (cv. Edge of Nite, cv. She), *H. psittacorum* (cv. Lady Di, cv. Sassy), *H. rostrata*, *H. stricta* (cv. Las Cruces, cv. Tagami) y *H. wagneriana*.

La principal forma de propagación de las heliconias es por división de rizomas, es la vía más eficiente para mantener poblaciones clonales; sin embargo, es alto el riesgo de transmisión de enfermedades bacterianas y fungosas, además que la tasa de reproducción de vástagos es variable. Existen especies y cultivares que emiten hasta 50 nuevas plantas al año (*H. psittacorum*), mientras otras solo producen de tres a cinco (*H. caribaea* y *H. vellerigera*). La propagación sexual no se usa de manera comercial debido a que las tasas de germinación son bajas como consecuencia de la rigidez del endospermo y latencia, que a su vez pueden retardarla desde tres meses hasta tres años (Simão & Scatena, 2003; Iracheta-Donjuan et al., 2013).

El cultivo de tejidos vegetales ha jugado un papel importante en la propagación de muchas especies vegetales, incluyendo ornamentales, ya que se han establecido protocolos eficientes para clonar genotipos élite (Jain & Ochatt, 2010). Además, los métodos histológicos permiten comprender los sistemas de cultivo *in vitro* y los cambios anatómicos e histoquímicos proporcionan información sobre los procesos celulares que conducen a determinada ruta morfogénica (Yeung, 1999). En la literatura existen

et al., 1992, Nogueira et al., 2004; Sosa et al., 2008); nevertheless, the new improved cultivars and some native species with outstanding agronomic characteristics have not yet been micropropagated.

In this sense, the need for develop an efficient system to multiply species and varieties, which recently stand up as new and contributing to increase the diversity of produced flowers, was raised. The objective of this research was to develop a protocol for *in vitro* regeneration of three species of *Heliconia* via organogenesis from lateral buds and to determinate the anatomic origin of shoots produced.

## Material and Methods

### Vegetal material, explants and disinfection

Adult and healthy plants of *H. collinsiana* Griggs, *H. nickeriensis* Mass & Rooij and *H. psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta cv. Golden Torch from commercial plantations were used. Lateral buds of 0.5 cm of length were dissected and then washed using commercial detergent (Roma®) and tap water for 5 minutes. After five rinses with distilled water, they were submerged for 15 min in a mixture of stable colloidal silver (3 % v/v), NaOCl (Cloralex®, 30 % v/v) and Tween® 20 (4 % v/v). They were rinsed five times with sterile distilled water and each explant was established in 10 mL of culture medium in 45 mL glass flasks.

### Culture medium and incubation conditions

Mineral salts from MS culture medium (Murashige & Skoog (1962) were used, added with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), myo-inositol (200 mg L<sup>-1</sup>), thiamine (2 mg L<sup>-1</sup>), pyridoxine (0.5 mg L<sup>-1</sup>), glycine (2 mg L<sup>-1</sup>), nicotinic acid (0.5 mg L<sup>-1</sup>) and solidified with agar-agar (Merck®, 7 g L<sup>-1</sup>). The pH of the culture medium was adjusted to 5.7 with NaOH (1N) and HCl (1N) and it was sterilized in a vertical autoclave (AESA 300®) at 121 °C and 1.5 kg cm<sup>-2</sup> of pressure during 20 min. Cultures were maintained at 25 ± 2 °C with a photoperiod of 16/8 h (light/darkness) (45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

### Shoots induction

The organogenic capacity of lateral buds was explored by incubation in MS medium supplemented with seven concentrations of benzylaminopurine (BAP; 4.4, 6.6, 8.8, 11.1, 13.3, 15.5 and 17.8 μM). The experiment had a completely randomized and factorial design 3X7=21 (three

reportes sobre la propagación *in vitro* de algunas heliconias (Nathan et al., 1992, Nogueira et al., 2004; Sosa et al., 2008); sin embargo, los cultivares mejorados modernos y algunas especies nativas con características agronómicas sobresalientes todavía no han sido micropropagadas.

Por ello se planteó la necesidad de desarrollar un sistema eficiente para multiplicar las especies y variedades que recientemente destacan como novedosas y que contribuyen a incrementar la diversidad de flores producidas. El presente trabajo tuvo como finalidad desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de tres especies de *Heliconia* vía organogénesis a partir de yemas laterales y determinar el origen anatómico los brotes producidos.

## Material y Métodos

### Material vegetal, explantes y desinfección

Se utilizaron plantas adultas y sanas de *H. collinsiana* Griggs, *H. nickeriensis* Mass & Rooij y *H. psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta cv. Golden Torch procedentes de plantaciones comerciales. Se disecaron yemas laterales de 0.5 cm de longitud que se lavaron con detergente comercial (Roma®) y agua de la llave por 5 min. Después de cinco enjuagues con agua destilada esterilizada se sumergieron por 15 min en mezcla de plata coloidal estable (3 % v/v), NaOCl (Cloralex®, 30 % v/v) y Tween® 20 (4 % v/v). Se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y cada explante se estableció en 10 mL de medio de cultivo contenido en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad.

### Medio de cultivo y condiciones de incubación

Se emplearon las sales minerales del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (200 mg L<sup>-1</sup>), tiamina (2 mg L<sup>-1</sup>), piridoxina (0.5 mg L<sup>-1</sup>), glicina (2 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0.5 mg L<sup>-1</sup>) y agar-agar para su solidificación (Merck®, 7 g L<sup>-1</sup>). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH (1N) y HCl (1N) y se esterilizó en autoclave vertical (AESA 300®) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C en fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) (45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

### Inducción de brotes

La capacidad organogénica de las yemas laterales se exploró mediante la incubación en medio MS suplementado con siete concentraciones de

heliconia species and seven BAP concentrations). Each treatment had 12 repetitions and the experimental unit was one explant per glass flask. At 12 weeks of culture, shooting (% of explants that generated shoots), number of shoots per explant and shoot length (cm) were quantified.

#### **Histological analysis**

Explants tissues were sampled at the first, fourth, and tenth weeks during the phase of induction of shoots. Tissues were fixed in formalin-acetic acid-alcohol (FAA 50:5:10 v/v) for 24 hours; they were dehydrated with isopropyl alcohol (30, 40, 50, 70, 90, 100 and 100 %), xylene-isopropyl 3:1, 1:1, 1:3 and two changes in xylene for 6 hours in each solution; they got soaked in liquid paraffin (60 °C) with two changes (12 hours). The samples were placed and cut in a manual rotatory microtome in sections of 10 µm of thickness, which were placed on a slide with chrome adhesive, they were dyed with safranin (0.05 % of time for 12 hours) and Fast Green FCF (0.12 % for 1 minute) (López *et al.*, 2005). The sections were observed and photographed using an optical microscopy (Zeiss® modelo Axiostar Plus with Paxcam® digital camera).

#### **Shoots multiplication**

Shoots 2 cm in length of the three heliconia species resulting from the induction were transferred to a MS culture medium added with BAP (11.1, 15.5, 20.0 and 24.4 µM); 1 µM of indoleacetic acid (IAA) was added for each dose of BAP. Subcultures to fresh medium were performed at four weeks; and after eight weeks of culture the same variables as in the phase of shoots induction were quantified. The experiment had a completely randomized design and factorial arrangement; 12 treatments were formed by the combination of four doses of BAP and three heliconia species; each treatment had 12 repetitions and the experimental unit was of one shoot per glass flask.

#### **Plants rooting**

Shoots 3 to 4 cm in length of the three heliconia species were cultivated in MS culture medium added with 1 µM of alpha-naphthalene acetic acid (ANA), 1 µM of indolebutyric acid (IBA) and in MS culture medium free of plant growth regulators (control). After four weeks, the number and length (cm) of roots were quantified, as well as plant height (cm). The experiment had a completely randomized design and factorial arrangement 3X3 (three auxin levels and three heliconia

bencilaminopurina (BAP; 4.4, 6.6, 8.8, 11.1, 13.3, 15.5 y 17.8 µM). El experimento tuvo un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3X7=21 (tres especies de heliconia y siete concentraciones de BAP). Cada tratamiento tuvo 12 repeticiones y la unidad experimental fue un explante por frasco. A las 12 semanas de cultivo se cuantificó la brotación (% de explantes que generaron brotes), número de brotes por explante y longitud de brote (cm).

#### **Análisis histológico**

Se tomaron muestras de tejido de explantes a la primera, cuarta y décima semana durante la fase de inducción de brotes. Los tejidos se fijaron en formalina-ácido acético-alcohol (FAA 50:5:10 v/v) por 24 h; se deshidrataron con alcohol isopropílico (30, 40, 50, 70, 90, 100 y 100 %), isopropílico-xileno 3:1, 1:1, 1:3 y dos cambios en xileno por 6 h en cada solución; se embebieron en parafina líquida (60 °C) con dos cambios (12 h). Las muestras se montaron y cortaron en micrótopo rotatorio manual en secciones de 10 µm de grosor, las cuales se montaron en portaobjetos con adhesivo de cromo, se tiñeron con safranina (0.05 % tiempo por 12 h) y verde rápido (0.12 % por 1 min) (López *et al.*, 2005). Las secciones se observaron y fotografiaron en microscopio óptico (Zeiss® modelo Axiostar Plus con cámara digital Paxcam®).

#### **Multiplicación de brotes**

Brotes de 2 cm de longitud de las tres especies de heliconias procedentes de la inducción se transfirieron a medio MS adicionado con BAP (11.1, 15.5, 20.0 y 24.4 µM) y a cada dosis de BAP se agregó 1 µM de ácido indolacético (IAA). Los subcultivos a medio fresco se hicieron a las cuatro semanas; y después de ocho semanas de cultivo se cuantificaron las mismas variables que en la fase de inducción de brotes. El experimento tuvo diseño completamente al azar con arreglo factorial; se formaron 12 tratamientos por la combinación de cuatro dosis de BAP y tres especies de heliconia; cada tratamiento tuvo 12 repeticiones y la unidad experimental fue un brote por frasco.

#### **Enraizamiento de plantas**

Brotes de 3 a 4 cm de longitud de las tres especies de heliconias se cultivaron en medio MS suplementado con 1 µM de ácido alfa-naftalenacético (ANA), 1 µM de ácido indolbutírico (IBA) y medio MS libre de reguladores de crecimiento (testigo). Después de cuatro semanas se cuantificó el número y longitud de raíces (cm), así como la altura de planta (cm). El experimento tuvo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x3 (tres niveles auxinas y tres especies de heliconia).



species). Each treatment had 12 repetitions and the experimental unit was one shoot per glass flask.

#### Plants acclimatization

Rooted plants 7 cm in length were transplanted into 175 mL polystyrene pots with peat moss:perlite (1:1) as substrate and the nutritive Steiner (1961) solution (0, 50 and 100 %) was assessed. They were cultivated in a growth chamber (Environmental chamber, Lab-Line Instruments®) at  $25 \pm 2$  °C with a photoperiod of 12/12 h (light/darkness) and 60% of relative humidity during 40 days. Then, they were transferred to greenhouse conditions and at two weeks, plants survival rate (%), height (cm) and the diameter of pseudo-stem base (cm) were quantified. The experiment was conducted in a completely randomized design and factorial arrangement  $3 \times 3 = 9$  (three doses of nutritive solution and three heliconia species). Each treatment had 20 repetitions and the experimental unit was one plant.

#### Statistical analysis

Data obtained from each experiment were submitted to analysis of variance using Statistical Analysis Software SAS (SAS Institute, 2003) and the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) was used to compare means. Values in percentages were transformed using square root.

### Results and Discussion

#### Shoots induction

The genotype, doses of BAP and its interaction had significant effects on shooting and on the number of shoots per explant. The shoot length was only affected by the dose of BAP and the interaction; in the three variables the highest effect was produced by the dose of BAP ( $p \leq 0.05$ ). BAP caused the activation of the axillary meristems and the resulting shooting of lateral buds on the explants. In general, shooting increased as the dose of BAP increased and was of 100 % with 11.1 and 13.3  $\mu\text{M}$ . This optimal dose produced the highest number of shoots per explant on each species; 4.8 in *H. collinsiana*, 3.0 in cv. Golden Torch and 2.1 in *H. nickeriensis*. It also favored the highest length of shoots; 1.3 cm in *H. collinsiana*, 1.4 cm in cv. Golden Torch and 1.5 cm in *H. nickeriensis* (Table 1; Figure 1a-c). Shoots induction occurred at 10 weeks of culture in *H. collinsiana* and cv. Golden Torch, while it appeared at week 12 in *H.*

Cada tratamiento tuvo 12 repeticiones y la unidad experimental fue un brote por frasco.

#### Aclimatación de plantas

Plantas enraizadas de 7 cm de longitud se trasplantaron a vasos de poliestireno de 175 mL de capacidad con turba:perlita (1:1) como sustrato y se evaluó la solución nutritiva Steiner (1961) (0, 50 y 100 %). Se cultivaron en cámara de crecimiento (Environmental chamber, Lab-Line Instruments®) a  $25 \pm 2$  °C con fotoperiodo de 12 h y 60 % de humedad relativa durante 40 días. Después se transfirieron a condiciones de invernadero y a las dos semanas se contabilizó la supervivencia (%), altura de planta (cm) y diámetro de la base del pseudotallo (cm). El experimento se condujo en un diseño completamente al azar en arreglo factorial  $3 \times 3 = 9$  (tres dosis de solución nutritiva y tres especies de heliconia). Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones y la unidad experimental fue una planta.

#### Análisis estadístico

Los datos de cada experimento se sometieron a análisis de varianza con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) se usó para comparar las medias. Los valores de porcentaje se transformaron usando raíz cuadrada.

### Resultados y Discusión

#### Inducción de brotes

El genotipo, dosis de BAP y su interacción tuvieron efectos significativos en la brotación y número de brotes por explante. La longitud de brote fue afectada sólo por la dosis de BAP y la interacción; en las tres variables el mayor efecto fue producido por el BAP ( $p \leq 0.05$ ). Este regulador de crecimiento provocó la activación de los meristemos axilares y la consecuente brotación de yemas laterales en los explantes. En general, la brotación aumentó conforme se incrementó la dosis de BAP y fue de 100 % con 11.1 y 13.3  $\mu\text{M}$ . Esta dosis óptima produjo el mayor número de brotes por explante en cada especie; 4.8 en *H. collinsiana*, 3.0 en cv. Golden Torch y 2.1 en *H. nickeriensis*. También favoreció la mayor longitud del brote; 1.3 cm en *H. collinsiana*, 1.4 cm en cv. Golden Torch y 1.5 cm en *H. nickeriensis* (Tabla 1; Figura 1a-c). La inducción de brotes se presentó a las 10 semanas de cultivo en *H. collinsiana* y cv. Golden Torch, mientras en *H. nickeriensis* se presentó hasta la semana 12. Las concentraciones mayores a la óptima inhibieron la inducción y redujeron drásticamente el número de brotes diferenciados.

**Table 1.**  
**Effect of benzylaminopurine (BAP) on shoot induction from lateral bud explants of three heliconia species after 12 weeks of culture.**

**Tabla 1.**  
**Efecto de la bencil-aminopurina (BAP) sobre la inducción de brotes en explantes de yemas laterales de tres especies de heliconias después de 12 semanas de cultivo.**

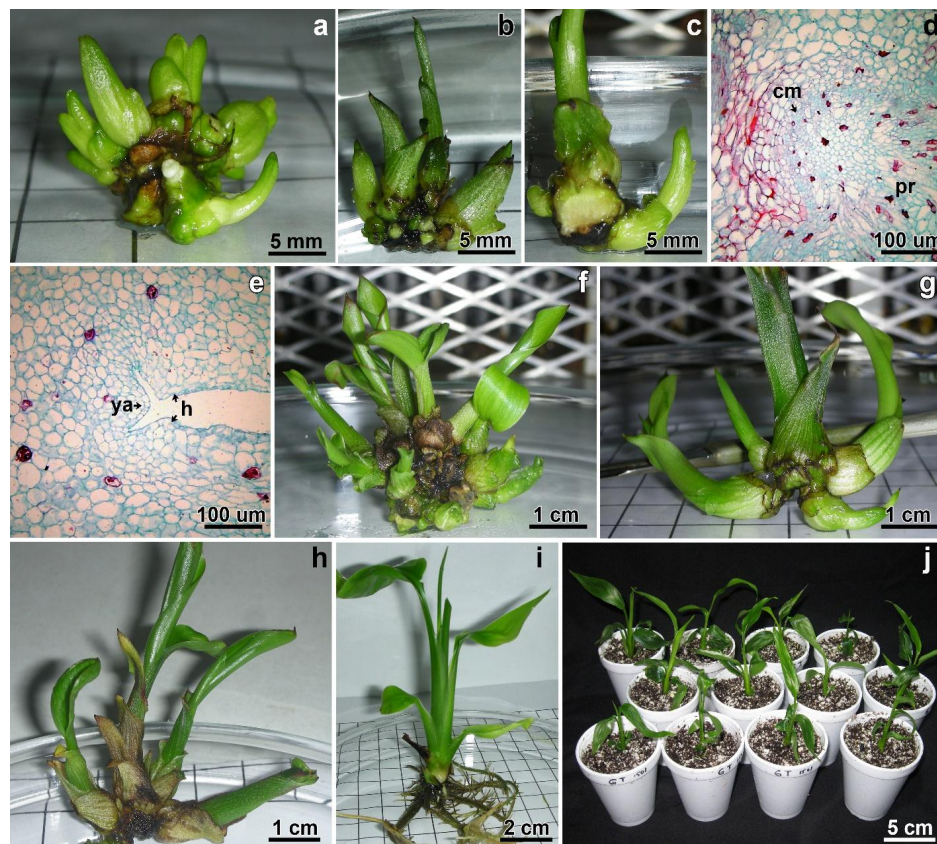
Specie	BAP ( $\mu$ M)	Shooting (%)	Shoots per explant (Num.)	Shoot lenght (cm)
<i>H. collinsiana</i>	4.4	0.0 <sup>f</sup>	0.1 <sup>gh</sup>	0.0 <sup>e</sup>
	6.6	50.0 <sup>bode</sup>	0.8 <sup>efg</sup>	0.4 <sup>cde</sup>
	8.8	83.3 <sup>abc</sup>	1.0 <sup>def</sup>	0.8 <sup>abcd</sup>
	11.1	91.7 <sup>ab</sup>	2.1 <sup>c</sup>	0.9 <sup>abcd</sup>
	13.3	100.0 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>
	15.5	75.0 <sup>abcd</sup>	1.7 <sup>cd</sup>	1.3 <sup>ab</sup>
	17.7	0.0 <sup>f</sup>	0.0 <sup>h</sup>	0.0 <sup>e</sup>
cv. Golden Torch	4.4	0.0 <sup>f</sup>	0.0 <sup>h</sup>	0.0 <sup>e</sup>
	6.6	83.3 <sup>abc</sup>	1.0 <sup>def</sup>	1.0 <sup>abc</sup>
	8.8	100.0 <sup>a</sup>	1.3 <sup>de</sup>	1.0 <sup>abc</sup>
	11.1	100.0 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>	1.4 <sup>a</sup>
	13.3	58.3 <sup>abcd</sup>	1.7 <sup>cd</sup>	1.0 <sup>abc</sup>
	15.5	41.7 <sup>cdef</sup>	0.4 <sup>fgh</sup>	0.9 <sup>abcd</sup>
	17.7	0.0 <sup>f</sup>	0.0 <sup>h</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>H. nickeriensis</i>	4.4	0.0 <sup>f</sup>	0.0 <sup>h</sup>	0.0 <sup>e</sup>
	6.6	16.7 <sup>ef</sup>	0.2 <sup>gh</sup>	0.2 <sup>de</sup>
	8.8	41.7 <sup>cdef</sup>	0.4 <sup>fgh</sup>	0.5 <sup>bcd</sup>
	11.1	100.0 <sup>a</sup>	2.1 <sup>c</sup>	1.5 <sup>a</sup>
	13.3	91.7 <sup>ab</sup>	1.0 <sup>def</sup>	1.5 <sup>a</sup>
	15.5	33.3 <sup>def</sup>	0.3 <sup>fgh</sup>	0.5 <sup>bcd</sup>
	17.7	0.0 <sup>f</sup>	0.0 <sup>h</sup>	0.0 <sup>e</sup>
MSD		47.0	0.7	0.7

Means with equal letters per column are not statistically different (Tukey, 0.05). MSD= Minimum significant difference.

Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa.

*nickeriensis*. BAP concentrations higher than the optimal level inhibited the induction and drastically reduced the number of differentiated shoots.

Los brotes promovidos por el BAP en esta etapa difieren de los reportados por Nathan *et al.*, (1992) en *H. psittacorum* cv. Choconiana donde la brotación sólo fue posible con 10  $\mu$ M



**Figure 1.** Organogenesis in *Heliconia* spp. [a] Shoots induction in *H. collinsiana* with 13.3  $\mu\text{M}$  of BAP; [b] Shoots induction in cv. Golden Torch and [c] *H. nickeriensis* with 11.1  $\mu\text{M}$  of BAP. [d] Shoot primordia of *H. collinsiana* originated from procambium (pr) at the base of the explant. [e] Differentiation of axillary bud (ya) of cv. Golden Torch at the base of the explant. [f] Shoots multiplication in *H. collinsiana* with 13.3  $\mu\text{M}$  of BAP and 1  $\mu\text{M}$  of IAA; [g] Multiplication in cv. Golden Torch and [h] *H. nickeriensis* with 11.1  $\mu\text{M}$  of BAP and 1  $\mu\text{M}$  of IAA. [i] Rooting of *H. nickeriensis* plants with 1  $\mu\text{M}$  ANA. [j] Plants acclimatization of cv. Golden torch. cm = meristematic cells; h = leaf.

**Figura 1.** Organogénesis de *Heliconia* spp. [a] Inducción de brotes en *H. collinsiana* con 13.3  $\mu\text{M}$  de BAP; [b] Inducción de brotes en cv. Golden Torch y [c] *H. nickeriensis* con 11.1  $\mu\text{M}$  de BAP. [d] Primordio de brote de *H. collinsiana* originado de procámbium en la base del explante. [e] Diferenciación de yema axilar de cv. Golden Torch en la base del explante. [f] Multiplicación de brotes en *H. collinsiana* con 13.3  $\mu\text{M}$  de BAP y 1  $\mu\text{M}$  de IAA; [g] Multiplicación en cv. Golden Torch y [h] *H. nickeriensis* con 11.1  $\mu\text{M}$  de BAP y 1  $\mu\text{M}$  de IAA. [i] Enraizamiento de plantas de *H. nickeriensis* con 1  $\mu\text{M}$  de ANA. [j] Aclimatación de plantas cv. Golden Torch. cm=células meristemáticas; h=hoja.

Shoots promoted by BAP in this phase differ from the ones reported by Nathan *et al.*, (1992) in *H. psittacorum* cv. Choconiana where shooting was only possible with 10  $\mu\text{M}$  of BAP after 24 weeks of culture. In contrast, in *H. stricta*, the highest quantity of shoots (2.4 and 2.3) was induced with 8.8 and 17.7  $\mu\text{M}$  of BAP,

de BAP después de 24 semanas de cultivo. En cambio, en *H. stricta* la mayor cantidad de brotes (2.4 y 2.3) se indujo con 8.8 y 17.7  $\mu\text{M}$  de BAP, respectivamente, después de ocho semanas (Nogueira *et al.*, 2004). También en *H. curtisphata*, 8.9  $\mu\text{M}$  de BAP fue la concentración óptima para inducir 5.6 brotes después de tres semanas de cultivo a partir de plántulas



respectively, after 8 weeks (Nogueira et al., 2004). Also, in *H. curtisphata* 8.9  $\mu\text{M}$  of BAP was the optimal concentration to induce 5.6 shoots after three weeks from six-months-old *in vitro* plantlets (Alarcon et al., 2011). In explants of floral buds of *H. bihai* cv. Lobster Salmon the highest results of shoots induction were also obtained with 8.9  $\mu\text{M}$  of BAP but combined with 5.7  $\mu\text{M}$  of IAA after six weeks, although the number of shoots was not specified (Marulanda-Ángel et al., 2011). In *H. psittacorum* cv. Choconiana BAP (4.4  $\mu\text{M}$ ) also resulted effective to induce shoots in explants of thin cell layer, but combined with 2,4-D (4.5  $\mu\text{M}$ ) after eight weeks (Meneses et al., 2009). In contrast, in *Heliconia ortotricha* cv. Total Eclipse the optimal dose to induce from 7.5 to 10.1 shoots was of 17.8  $\mu\text{M}$  of BAP, twice that reported in other species and cultivars, although the response was modulated by the light source (Takeui et al., 2016).

The breaking of meristems latency and shoots induction is a response promoted by BAP because it stimulates cellular division and results effective in shoots initiation in many plant species. Its effects on organogenesis can be magnified when combined with auxins (Machakova et al., 2008; van Staden et al., 2008). Although BAP stimulated the production of new shoots, differences in morphogenic capacity among genotypes of *Heliconia* are appreciated by the number of shoots generated per explant, since some species are naturally more prolific than others. In this study, the quantity of shoots emitted by *H. collinsiana* was 2.2 times higher than *H. nickeriensis* and 1.6 times more than cv. Golden Torch.

#### Histological analysis

Produced shoots were formed in two specific sites of the explant. Buds primordia were observed to emerge from the axils of the fourth and fifth leaf, near the apical meristem of the shoot, after 4 weeks of culture in *H. collinsiana*. In *H. collinsiana* and cv. Golden Torch observed the formation of adventitious shoots originated at the base of the explant, from meristematic cells derived from procambium after ten weeks of culture (Figure 1d). In cv. Golden Torch the activation of lateral buds present at the axil of the leaves was observed (Figure 1e); while in *H. nickeriensis* only the elongation of the leaves surrounding the apical meristem of the shoot was appreciated. The action of BAP is due to its capacity to modify apical dominance and promote growth of lateral buds (Sakakibara, 2006).

*in vitro* de 6 meses de edad (Alarcón et al., 2011). En explantes de yemas florales de *H. bihai* cv. Lobster Salmón los mejores resultados de inducción de brotes también se obtuvieron con 8.9  $\mu\text{M}$  de BAP pero combinado con 5.7  $\mu\text{M}$  de IAA después de seis semanas, aunque no se precisa el número de brotes (Marulanda-Ángel et al., 2011). En *H. psittacorum* cv. Choconiana el BAP (4.4  $\mu\text{M}$ ) también resultó efectivo para inducir brotes en explantes de capa fina de células pero combinado con 2,4-D (4.5  $\mu\text{M}$ ) después de ocho semanas (Meneses et al., 2009). En contraste, en *Heliconia ortotricha* cv. Total Eclipse la dosis óptima para inducir de 7.5 a 10.1 brotes fue 17.8  $\mu\text{M}$  de BAP, el doble de los reportados en otras especies y cultivares, aunque la respuesta fue modulada por la fuente de luz (Takeui et al., 2016).

El rompimiento de la latencia de meristemos y la inducción de brotes es una respuesta promovida por el BAP porque estimula la división celular y resulta efectiva en la iniciación de brotes en muchas especies vegetales. Sus efectos en la organogénesis se pueden magnificar cuando se combina con auxinas (Machakova et al., 2008; van Staden et al., 2008). Aunque el BAP estimuló la producción de nuevos brotes, las diferencias en la capacidad morfogénica entre genotipos de *Heliconia* se aprecia en el número de brotes generados por explante, ya que algunas especies de manera natural son más prolíficas que otras. En este estudio, la cantidad de brotes emitida por *H. collinsiana* fue 2.2 veces mayor que la de *H. nickeriensis* y 1.6 veces más que cv. Golden Torch.

#### Análisis histológico

Los brotes producidos se formaron en dos sitios específicos del explante. Se observaron primordios de yema que emergieron en la axila de la cuarta y quinta hoja, cerca del meristemo apical de brote, después de cuatro semanas de cultivo en *H. collinsiana*. En *H. collinsiana* y cv. Golden Torch se observó la formación de brotes adventicios que se originaron en la base del explante, a partir de células meristemáticas derivadas del procambium después de diez semanas de cultivo (Figura 1d). En el cv. Golden Torch se observó la activación de yemas laterales presentes en la axila (Figura 1e) de las hojas; mientras que en *H. nickeriensis* sólo se apreció el alargamiento de las hojas que rodean el meristemo apical de brote. La acción del BAP se debe a su capacidad de modificar la dominancia apical y promover el crecimiento de yemas laterales (Sakakibara, 2006).

#### Multiplificación de brotes

En esta etapa el genotipo, la dosis de BAP y su interacción sólo afectaron significativamente el número de

**Table 2.**  
**Effect of benzylaminopurine (BAP) and indoleacetic acid (IAA) in the *in vitro* shoots multiplication of three heliconia species after eight weeks of culture.**

**Tabla 2.**  
**Efecto de bencilaminopurina (BAP) y ácido indolacético (IAA) en la multiplicación de brotes *in vitro* de tres especies de heliconias después de ocho semanas de cultivo.**

Specie	BAP + IAA ( $\mu$ M)	Shooting (%)	Shoots per explant (Num.)	Shoot lenght (cm)
<i>H. collinsiana</i>	11.1 + 1	100.0 <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>
	15.5 + 1	100.0 <sup>a</sup>	3.0 <sup>cd</sup>	2.0 <sup>ab</sup>
	20.0 + 1	100.0 <sup>a</sup>	2.1 <sup>def</sup>	1.9 <sup>ab</sup>
	24.4 + 1	50.0 <sup>b</sup>	0.6 <sup>h</sup>	1.1 <sup>bc</sup>
cv. Golden Torch	11.1 + 1	100.0 <sup>a</sup>	4.1 <sup>b</sup>	1.9 <sup>ab</sup>
	15.5 + 1	91.6 <sup>ab</sup>	2.5 <sup>de</sup>	1.6 <sup>abc</sup>
	20.0 + 1	83.3 <sup>ab</sup>	1.6 <sup>efg</sup>	1.4 <sup>abc</sup>
	24.4 + 1	50.0 <sup>b</sup>	0.5 <sup>h</sup>	0.8 <sup>c</sup>
<i>H. nickeriensis</i>	11.1 + 1	100.0 <sup>a</sup>	3.6 <sup>bc</sup>	2.1 <sup>a</sup>
	15.5 + 1	66.6 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>gh</sup>	1.6 <sup>abc</sup>
	20.0 + 1	58.3 <sup>ab</sup>	1.1 <sup>gh</sup>	1.3 <sup>abc</sup>
	24.4 + 1	58.3 <sup>ab</sup>	0.5 <sup>h</sup>	1.1 <sup>bc</sup>
MSD		48.8	0.9	1.0

Means with equal letters per column are not statistically different (Tukey, 0.05). MSD = Minimum significant difference.

Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). MSD = Diferencia mínima significativa.

### Shoots multiplication

In this phase, the genotype, BAP concentration and the interaction between both factors only significantly affected the number of shoots per explant. Shooting and shoot length were only affected by the dose of BAP ( $p \leq 0.05$ ). Similarly, to that obtained in shoots induction, the highest effect was produced by BAP. The shooting in the three species was 100 % with 11.1  $\mu$ M of BAP, while the highest doses decreased it. This concentration also stimulated the highest number of shoots per explant (6.9 in *H. collinsiana*, 4.1 in cv. Golden Torch and 3.6 in *H. nickeriensis*) and the highest shoot length (2.1 cm in *H. collinsiana* and *H. nickeriensis*; 1.9 cm in cv. Golden Torch).

brotes por explante. La brotación y longitud de brote únicamente fueron afectadas por la dosis de BAP ( $p \leq 0.05$ ). De forma similar a lo ocurrido en la inducción de brotes, el mayor efecto lo produjo el BAP. El 100 % de brotación en las tres especies se obtuvo con 11.1  $\mu$ M de BAP, mientras que dosis mayores la redujeron. Esta concentración también estimuló el mayor número de brotes por explante (6.9 en *H. collinsiana*, 4.1 en cv. Golden Torch y 3.6 en *H. nickeriensis*) y la mayor longitud del brote (2.1 cm en *H. collinsiana* y *H. nickeriensis*; 1.9 cm en cv. Golden Torch). Dosis de BAP superiores a 11.1  $\mu$ M disminuyeron el número y tamaño de brotes por explante (Tabla 2; Figura 1f-h).

Doses of BAP superior to 11.1  $\mu\text{M}$  decreased the number and size of shoot per explant (Table 2; Figure 1f-h).

Shoots number produced in the multiplication phase in each species was superior to the one generated during the shoots induction phase and the shoots were generated in a shorter time (eight weeks of cultivation). These values indicate that the combination of cytokinins and auxins favored the proliferation of axillary shoots. The evaluated doses of BAP were combined with IAA (1  $\mu\text{M}$ ) because auxins attenuate the inhibitory effect of cytokinins on shoot length and increased the number of shoots (Gaba, 2005; Kane, 2005).

The effectiveness of BAP in shoots multiplication coincides with that reported by Ulisses *et al.*, (2010) in *H. bihai* cv. Lobster Claw Two, where the best results of shoots multiplication (2.3 shoots per explant) were obtained with 11.1  $\mu\text{M}$  of BAP but in MS culture medium with half concentration of salts after six weeks. In *H. standley*, the maximum quantity of shoots per explant (4.6) was obtained with a lower dose of BAP (8.8  $\mu\text{M}$ ) combined with 3.7  $\mu\text{M}$  of IAA (Sosa *et al.*, 2008). In contrast, shoots multiplication in *H. bihai* cv. Lobster Salmon requires two subculture of eight and four weeks with 26.6 and 8.8  $\mu\text{M}$  of BAP, respectively, to obtain a maximum of 3 shoots per explant (Marulanda-Ángel *et al.*, 2011). Even when the highest effect on shoots multiplication of the three species was due to the action of the cytokinin, the genotype also influenced. *H. collinsiana* surpassed cv. Golden Torch and *H. nickeriensis*, both in shoots induction and multiplication, showing that the species of the genus exhibited different morphogenic capacities.

Shoots obtained in this multiplication phase were subcultured three times (with six weeks of interval) in the MS culture medium added with 11.1  $\mu\text{M}$  of BAP and 1  $\mu\text{M}$  of IAA. With these doses of plant growth regulators, the multiplication rate was maintained until obtaining 328.5 shoots per explant in *H. collinsiana*, 68.9 in cv. Golden Torch and 46.6 in *H. nickeriensis*, in a period of 18 weeks.

### Plants rooting

The number and length (cm) of roots, as well as plants height were significantly affected by the genotype, by plant growth regulators and by the interaction between both factors ( $p \leq 0.05$ ). Although rooting in the three species was produced in every treatment, auxin was the factor that most influenced the three variables with 97, 92, and 63 % of the total variation, respectively. Plants of the three species

La cantidad de brotes producidos en la fase de multiplicación en cada especie fue superior a la generada en la inducción y los brotes se generaron en menor tiempo (ocho semanas de cultivo). Estos valores indican que la combinación de citocininas con auxinas favoreció la proliferación de brotes axilares. Las dosis de BAP probadas se combinaron con IAA (1  $\mu\text{M}$ ) porque las auxinas atenúan el efecto inhibitorio de las citocininas sobre la longitud e incrementan el número de brotes (Gaba, 2005; Kane, 2005).

La efectividad del BAP en la multiplicación de brotes coincide con lo reportado por Ulisses *et al.*, (2010) en *H. bihai* cv. Lobster Claw Two donde los mejores resultados de multiplicación (2.3 de brotes por explante) se obtuvieron con 11.1  $\mu\text{M}$  de BAP pero en medio MS a la mitad de concentración de sales después de seis semanas. En *H. standley*, la máxima cantidad de brotes por explante (4.6 brotes) se obtuvo con una dosis menor de BAP (8.8  $\mu\text{M}$ ) en combinación con 3.7  $\mu\text{M}$  de IAA (Sosa *et al.*, 2008). En contraste, la multiplicación en *H. bihai* cv. Lobster Salmón requiere dos subcultivos de ocho y cuatro semanas con 26.6 y 8.8  $\mu\text{M}$  de BAP, respectivamente, para alcanzar un máximo de 3 brotes por explante (Marulanda-Ángel *et al.*, 2011). Aun cuando el mayor efecto en la multiplicación de brotes de las tres especies se debió a la acción de la citocinina, el genotipo también influyó. *H. collinsiana* superó al cv. Golden Torch y a *H. nickeriensis*, tanto en la inducción como en la multiplicación de brotes, lo que demuestra que las especies del género exhiben capacidades morfológicas diferentes.

Los brotes obtenidos en la etapa de multiplicación se subcultivaron tres veces (a intervalos de seis semanas) en el medio MS adicionado con 11.1  $\mu\text{M}$  de BAP y 1  $\mu\text{M}$  de IAA. Con estas dosis de reguladores de crecimiento se mantuvo la tasa de multiplicación hasta obtener 328.5 brotes por explante en *H. collinsiana*, 68.9 en cv. Golden Torch y 46.6 en *H. nickeriensis*, en un período de 18 semanas.

### Enraizamiento de plantas

El número y longitud (cm) de raíces, así como la altura de planta fueron afectados significativamente por el genotipo, regulador de crecimiento y la interacción de ambos ( $p \leq 0.05$ ). Aunque el enraizamiento en las tres especies se produjo en todos los tratamientos, la auxina fue el factor que mayor influencia tuvo sobre estas tres variables con 97, 92 y 63 % de la variación total, respectivamente. Las plántulas de las tres especies alcanzaron los valores más altos en las tres variables de raíz cuando se cultivaron con 1  $\mu\text{M}$  de ANA. Esta auxina permitió duplicar la cantidad de

**Table 3.**  
**Effect of naphthalenacetic acid (ANA) and indolebutyric acid (IBA) in the *in vitro* rooting of three heliconia species after eight weeks of culture.**

**Tabla 3.**  
**Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA) en el enraizamiento *in vitro* de tres especies de heliconias después de ocho semanas de cultivo.**

Specie	Auxin ( $\mu\text{M}$ )	Roots (Num.)	Root lenght (cm)	Plant height (cm)
<i>H. collinsiana</i>	0	5.1 <sup>d</sup>	2.9 <sup>e</sup>	6.2 <sup>f</sup>
	1 ANA	9.0 <sup>b</sup>	6.3 <sup>c</sup>	9.1 <sup>b</sup>
	1 IBA	3.9 <sup>f</sup>	3.0 <sup>e</sup>	5.3 <sup>h</sup>
cv. Golden Torch	0	5.1 <sup>d</sup>	2.0 <sup>f</sup>	5.9 <sup>g</sup>
	1 ANA	8.1 <sup>c</sup>	7.2 <sup>b</sup>	7.8 <sup>d</sup>
	1 IBA	4.2 <sup>ef</sup>	5.1 <sup>d</sup>	5.2 <sup>h</sup>
<i>H. nickeriensis</i>	0	4.6 <sup>de</sup>	2.1 <sup>f</sup>	8.5 <sup>c</sup>
	1 ANA	9.9 <sup>a</sup>	8.8 <sup>a</sup>	10.8 <sup>a</sup>
	1 IBA	4.7 <sup>de</sup>	2.8 <sup>e</sup>	7.1 <sup>e</sup>
MSD		0.5	0.7	0.6

Means with equal letters per column are not statistically different (Tukey, 0.05). MSD= Minimum significant difference.

Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). MSD= Diferencia mínima significativa.

reached the highest values in the three variables related to roots when they were cultivated with 1  $\mu\text{M}$  of ANA. This auxin allowed to duplicate the quantity of roots obtained in comparison with the IBA and the control (Table 3).

The emergency of roots originated in the fourth week of cultivation and the maximum values were registered in the eighth week. *Heliconia nickeriensis* was the species in which taller plants were obtained and with higher quantity and length of roots, followed by *H. collinsiana* and cv. Golden Torch (Figure 1i).

Even though shoots of the three species of *Heliconia* in the multiplication phase formed roots in the MS culture medium with no growth regulators, the rooting was considerably improved with the use of ANA. The easiness to form roots without any presence of auxins was also

raíces obtenidas en comparación con el IBA y el tratamiento testigo (Tabla 3).

La emergencia de raíces se produjo en la cuarta semana de cultivo y los valores máximos se registraron en la octava semana. *Heliconia nickeriensis* fue la especie en la que se obtuvieron plantas de mayor altura y con mayor cantidad y longitud de raíces, seguida de *H. collinsiana* y cv. Golden Torch (Figura 1i).

Si bien los brotes de las tres especies de *Heliconia* en la etapa de multiplicación formaron raíces en el medio MS sin reguladores de crecimiento, el enraizamiento se mejoró considerablemente con el uso del ANA. La facilidad para formar raíces sin presencia de auxinas también se ha reportado en *H. psittacorum* cv. Choconiana y *H. bihai* cv. Lobster Clow Two (Nathan *et al.*, 1992; Ulisses *et al.*, 2010).

**Table 4.**  
**Survival and growth of micropropagated plants of three species of *heliconias* after 55 days.**

**Tabla 4.**  
**Supervivencia y crecimiento de plantas micropropagadas de tres especies de *heliconias* después de 55 días.**

Specie	Steiner Solution (%)	Survival (%)	Plant height (cm)	Pseudostem diameter (cm)
<i>H. collinsiana</i>	0	30 <sup>b</sup>	11.9 <sup>de</sup>	0.5 <sup>e</sup>
	50	100 <sup>a</sup>	22.2 <sup>abc</sup>	1.1 <sup>a</sup>
	100	50 <sup>b</sup>	28.2 <sup>a</sup>	0.8 <sup>c</sup>
<i>H. nickeriensis</i>	0	45 <sup>b</sup>	9.0 <sup>e</sup>	0.4 <sup>e</sup>
	50	100 <sup>a</sup>	19.8 <sup>bc</sup>	0.8 <sup>c</sup>
	100	50 <sup>b</sup>	24.7 <sup>ab</sup>	0.6 <sup>d</sup>
cv. Golden Torch	0	35 <sup>b</sup>	9.7 <sup>e</sup>	0.4 <sup>e</sup>
	50	100 <sup>a</sup>	17.9 <sup>cd</sup>	0.8 <sup>c</sup>
	100	55 <sup>b</sup>	23.3 <sup>abc</sup>	0.6 <sup>d</sup>
MSD		40.6	6.1	0.1

Means with equal letters per column are not statistically different (Tukey, 0.05). MSD= Minimum significant difference.

Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). MSD= Diferencia mínima significativa.

reported in *H. psittacorum* cv. Choconiana and *H. bihai* cv. Lobster Clow Two (Nathan *et al.*, 1992; Ulisses *et al.*, 2010). On the other hand, the rooting in *H. bihai* cv. Lobster Salmon was induced with 7.4  $\mu$ M de IAA (Marulanda-Ángel *et al.*, 2011).

#### Plants acclimatization

The genotype, the dose of nutritive solution and the interaction between both factors had significant effects on plants height and pseudostem diameter; survival rate was only affected by the dose of nutritive solution ( $p \leq 0.05$ ). However, the main effect was produced by the dose of nutritive solution in all measured variables. Survival rate was of 100 % in the three species when the nutritive solution was applied at half concentration. In contrast, plants that achieved a higher growth rate, and therefore a larger size, were obtained with the complete nutritive solution (Table 4, Figure 1j).

En cambio, el enraizamiento en *H. bihai* cv. Lobster Salmón se indujo con 7.4  $\mu$ M de IAA (Marulanda-Ángel *et al.*, 2011).

#### Aclimatación de plantas

El genotipo, la dosis de solución nutritiva y la interacción de ambos factores tuvieron efectos significativos sobre la altura de planta y diámetro del pseudotallo; la tasa de supervivencia sólo fue afectada por la dosis de la solución nutritiva ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, el mayor efecto lo produjo la dosis de solución nutritiva en todas las variables medidas. La tasa de supervivencia fue de 100 % en las tres especies cuando se aplicó la solución nutritiva a la mitad de su concentración. Los mayores valores de diámetro de pseudotallo también se alcanzaron con esta misma concentración. En cambio, las plantas que lograron una tasa de crecimiento más activo, y por consiguiente mayor tamaño, se obtuvieron con la solución nutritiva completa (Tabla 4; Figura 1j).



Results obtained with the nutritive solution applied at 50 % were due to the fact that the requirements of the plants were optimally covered, which produced a higher activation and accumulation of plant growth. Although plants height was higher with the solution at 100 % concentration of salts, pseudostem diameter in the three species was considerably reduced, which produced weaker plants. Plants treated with 50 % concentration of salts presented medium size but with thick pseudostems, which was reflected by vigorous plants, ideal for their transplant into pots and greenhouses. Fertilization requirements of plants during acclimatization were similar to the ones used in the establishment of new commercial plantations of heliconias, where more nitrogen is provided (3N-1P-2K) for stimulating plant growth during the first year; then the proportion of potassium is increased in order to induce blooming (Jerez, 2007; Alarcón & Bernal, 2012).

## Conclusions

A protocol for the *in vitro* propagation of *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* and *H. psittacorum* x, *H. spathocircinata* cv. Golden Torch by direct organogenesis from lateral buds culture was developed. Meristems activation and shoots induction was achieved with 11.1 and 13.3  $\mu\text{M}$  of BAP in the three species. The histological analysis revealed that the shoots originated in the base of the explant and from the differentiation of adventitious shoots. The highest shoots multiplication rate was achieved with 11.1 and 13.3  $\mu\text{M}$  of BAP combined with 1  $\mu\text{M}$  of IAA in the three species. Rooting was induced in MS culture medium without plant growth regulators and was improved with 1  $\mu\text{M}$  of ANA. Plants survival in acclimatization was 100 % in peat moss: perlite (1:1) and fertilized with 50 % of Steiner nutritive solution. This protocol constitutes a valuable contribution for the propagation of native species, new hybrids and commercial cultivations of heliconia as well as the rescue of plantations devastated by pathogens.

## Acknowledgements

To Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, for the support provided in the development of this research and to Finca las Abejas de Tacotalpa, Tabasco, for the plant material provided.

Los resultados obtenidos con la solución nutritiva aplicada al 50 % se deben a que se cubrieron óptimamente los requerimientos de las plantas, lo que produjo mayor activación y acumulación de crecimiento vegetativo. Si bien con la solución al 100 % se lograron plantas más altas, el diámetro del pseudotallo en las tres especies se redujo considerablemente, lo cual produjo plantas más frágiles. Las plantas tratadas con 50 % de concentración fueron de porte mediano pero con bases de pseudotallos gruesos, lo que se reflejó en plantas vigorosas, ideales para su trasplante a macetas e invernadero. Los requerimientos de fertilización de las plantas en la aclimatación son similares a los empleados en el establecimiento de nuevas plantaciones comerciales de heliconia, donde se aporta mayor nitrógeno (3N-1P-2K) para estimular crecimiento vegetativo durante el primer año; después se incrementa la proporción de potasio para inducir la floración (Jerez, 2007; Alarcón & Bernal, 2012).

## Conclusiones

Se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de *Heliconia collinsiana*, *H. nickeriensis* y *H. psittacorum* x, *H. spathocircinata* cv. Golden Torch vía organogénesis directa a partir del cultivo de yemas laterales. La activación meristemática e inducción de brotes se logró con 11.1 y 13.3  $\mu\text{M}$  de BAP en las tres especies. El análisis histológico reveló que los brotes se originaron en la base del explante y a partir de la diferenciación de brotes adventicios. La mayor tasa de multiplicación de brotes se logró con 11.1 y 13.3  $\mu\text{M}$  de BAP combinado con 1  $\mu\text{M}$  de IAA en las tres especies. El enraizamiento se indujo con el medio MS sin reguladores de crecimiento y se mejoró con 1  $\mu\text{M}$  de ANA. La supervivencia de plantas en la aclimatación fue de 100 % en turba+perlita (1:1) y fertilizadas con 50 % de solución nutritiva de Steiner. Este protocolo constituye un valioso aporte para la propagación de especies nativas, nuevos híbridos y cultivares comerciales de heliconias así como el rescate de plantaciones devastadas por patógenos.

## Agradecimientos

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, por el apoyo brindado para el desarrollo del presente trabajo y a la Finca las Abejas de Tacotalpa, Tabasco por el material vegetal proporcionado.

## References

- Alarcón, P. J. C., Martínez R. D. M. and Salazar-Ospina, A. (2011). Propagación *in vitro* de *Heliconia curtispatha* P, planta utilizada contra la mordedura de serpientes por algunas comunidades campesinas de la región colombiana del Urabá. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 18: 271-278. <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/18n3/v18n3a05.pdf>
- Alarcón, R. J. J. and Bernal, M. O. (2012). El cultivo de heliconias: Medidas para la temporada invernal. ICA. Colombia. 36 p. <https://www.ica.gov.co/getattachment/34fbeece-8f6f-4692-97ef-2ca1e8e73967/-nbsp:El-cultivo-de-heliconias.aspx>
- Baltazar, B. B., Zavala R. J. and Hernández N. S. J. (2011). Producción comercial de heliconias. Colegio de Postgraduados. México. 66 p. [https://www.researchgate.net/publication/311274222\\_Produccion\\_comercial\\_de\\_heliconias\\_Commercial\\_production\\_of\\_heliconias](https://www.researchgate.net/publication/311274222_Produccion_comercial_de_heliconias_Commercial_production_of_heliconias)
- Criley, R. A. (2000). Seasonal flowering patterns for heliconia shown by grower records. *Acta Horticulturae* 541: 159-165. [http://www.actahort.org/books/541/541\\_22.htm](http://www.actahort.org/books/541/541_22.htm)
- Gaba, V. P. (2005). Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray (eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp 87-99. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02822700>
- Iracheta-Donjuan, L., Olivera de los Santos A., Ortiz-Curiel, S. and López-Gómez, P. (2013). Propagación de heliconias. INIFAP. CIRPAS. Campo Experimental Rosario Izapa. Folleto técnico No. 30. Tuxtla Chico, Chiapas, México. 29 p. [http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4027/CIRPAS\\_01020899500054072ok.pdf?sequence=1](http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4027/CIRPAS_01020899500054072ok.pdf?sequence=1)
- Jain, S. M. and Ochatt S. J. (2010). Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. Springer. U.K. 400 p. DOI:10.1007/978-1-60327-114-1
- Jerez, E. (2007). El cultivo de las heliconias. *Cultivos Tropicales* 28: 29-35. <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215858005.pdf>
- Kane, M. E. (2005). Shoot culture procedures. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray (eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp 145-157. <https://www.crcpress.com/Plant-Development-and-Biotechnology/Trigiano-Gray/p/book/9780849316142>
- Loges, V. A., C. Castro, A. S. Costa, A. L. Verona, L. C. Nogueira, W. N. Guimarães, M. F. Castro, and Bezerra, M. (2007). The ornamental attributes of *Heliconia* for landscape design in Brazil. *Acta Horticulturae* 743: 75-80. [http://www.actahort.org/books/743/743\\_9.htm](http://www.actahort.org/books/743/743_9.htm)
- López, C. M. A., Márquez, G. J. and Murguía, S. G. (2005). Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2 ed. 177 p.
- Machakova, I., Zazimalova E. and George, E. F. (2008). Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In: E. F. George et al. (eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp 175-204. <https://investigacionfitopatologiaumar.files.wordpress.com/2016/06/plant-propagation.pdf>
- Marulanda-Ángel, M. L., Isaza-Valencia, L., and Londoño-Giraldo, L. M. (2011). Propagación *in vitro* de *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón a partir de meristemas florales. *Acta Agronómica* 60: 132-139. <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v60n2/v60n2a04.pdf>
- Meneses, G. A. J., Rojas, M. N. and Atehortúa, G. L. (2009). Regeneración *in vitro* de *Heliconia psittacorum*, variedad choconiana, usando el sistema de sección transversal delgada "Tcls" (thin cells layer). *Revista UDO Agrícola* 9: 547-555. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09069>
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-493. [http://priede.bf.ljv/grozs/AuguFiziologijas/Augu\\_audu\\_kulturas\\_MAG/literatura/03\\_Murashige%20Skoog1962.pdf](http://priede.bf.ljv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf)
- Murguía, G. J., Lee E. H. and Landero T. I. (2007). La horticultura ornamental en el estado de Veracruz, México. *Actas de Horticultura* 48: 485-488. [https://www.researchgate.net/publication/268413607\\_La\\_horticultura\\_ornamental](https://www.researchgate.net/publication/268413607_La_horticultura_ornamental)

- [en\\_el\\_estado\\_de\\_Veracruz\\_Mexico](#)
- Nathan, M., Goh, C. and Kumar, P. (1992). *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. *HortScience* 27: 450-452. <http://hortsci.ashspublications.org/content/27/5/450.full.pdf+html>
- Nogueira, D. J., Gomes, S. O., Innecco, R., Almeida, J. L. and Costa, J. T. (2004). Evaluation of the apical dominance break and the BA actions on *in vitro* multiplication of *Heliconia stricta* Huber. *Revista Ciência Agronômica* 35: 232-237. <http://www.ccarevista.ufc.br/site/down.php?arq=13rca35-e.pdf>
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-49. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- Santos, B. A., Lombera, R. and Benitez-Malvido, J. (2009). New records of *Heliconia* (Heliconiaceae) for the region of Chajul, Southern Mexico, and their potential use in biodiversity-friendly cropping systems. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 857- 860. [http://www.ib.unam.mx/m/revista/pdfs/27-Santos\\_et-385.pdf](http://www.ib.unam.mx/m/revista/pdfs/27-Santos_et-385.pdf)
- SAS Institute. (2003). The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Simão, D. and Scatena, V. (2003). Morphological aspects of the propagation in *Heliconia velloziana* L. Emygd. (Zingiberales: Heliconiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 65-72. <http://www.scielo.br/pdf/babt/v46n1/a11v46n1.pdf>
- Sosa R. F. M., Soto, O. R., Machado, A. P. and Hernández P. R. (2008). Propagación *in vitro* de *Heliconia standley* Macbride. *Bioteconología Vegetal* 8: 43-50. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v15nspe/v15nspea4.pdf>
- Steiner, A. A. (1961). A method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and soil*. 15: 134-154. [https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4020-5005-3\\_6.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4020-5005-3_6.pdf)
- Suárez-Montes, P., Fornoni J. and Núñez-Farfán, J. (2011). Conservation genetics of the endemic mexican *Heliconia uxpanapensis* in the Los Tuxtlas tropical rain forest. *Biotropica* 43: 114-121. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2010.00657.x>
- Takeui, B., Ansante, N. F., Rossi, M. L., Calaboni, C. and Rodrigues, P. H. V. (2016). *In vitro* culture of heliconia in different light sources. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 12: 39-45. <http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/view/92/50>
- Ulisses, C., Melo-de-Pinna, G. F., Willadino, L., Albuquerque, C. C. and Camara, T. R. (2010). *In vitro* propagation of *Heliconia bihai* (L.) L. from zygotic embryos. *Acta Botanica Brasilica* 24: 184 - 192. <http://www.scielo.br/pdf/abb/v24n1/18.pdf>
- vanStaden, J., Zazimalova E. and George, E.F. (2008). Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: E. F. George et al. (eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd. Edition. Springer. Dordrecht, Netherlands. pp 175-204. [https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_6.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-5005-3_6.pdf)
- Yeung, E. C. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems - some practical comments. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 35: 137-143. [DOI/10.1007/s11627-999-0023-z](https://doi.org/10.1007/s11627-999-0023-z)