

## Propagación *in vitro* de los cultivares de *Etlingera hemisphaerica* 'Red Tulip' y 'Black Tulip'

### *Etlingera hemisphaerica* cultivars 'Red Tulip' and 'Black Tulip' *in vitro* propagation

A. Barra y N. Mogollón

Unidad de Biotecnología. Posgrado de Horticultura. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apartado 400. Barquisimeto. Estado Lara. Venezuela.

## Resumen

La propagación *in vitro* de *Etlingera hemisphaerica* 'Red Tulip' y 'Black Tulip' fue realizada en dos etapas: 1) Establecimiento, donde ápices caulinares de yemas terminales y laterales fueron cultivados en el medio de Murashige y Skoog, complementado con 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Benziladenina (BA) en tres estados físicos: líquido con soporte, líquido sin soporte y semisólido. El mayor desarrollo de los explantes se registró en los medios semisólido y líquido con soporte. 2) Multiplicación y Enraizamiento, donde se evaluaron tres citocininas: cinetina, 2-isopenteniladenina y benciladenina (0; 0,5; 1,0; 2,0 y 2,5 mg.L<sup>-1</sup>), y en el primer subcultivo, la BA (0,5; 1,0; 2,0; 2,5 y 5,0 mg.L<sup>-1</sup>). Con 2 mg.L<sup>-1</sup> BA se registró el mayor número de brotes/explante en los dos cultivares.

**Palabras clave:** Micropropagación, medios de cultivo, bastón del emperador enano.

## Abstract

The *Etlingera hemisphaerica* 'Red Tulip' and 'Black Tulip' *in vitro* propagation was accomplished in two phases: 1) Establishment, where apexes of terminal and lateral buds were cultured in the Murashige and Skoog medium, complemented with 0,5 mg.L<sup>-1</sup> of Benziladenine (BA) in three physical stages: liquid with support, liquid without support and semisolid. The best explants development was registered in the semisolid and liquid with support. 2) Multiplication and rooting, in where three cytokinines were evaluated: kinetin, 2 isopenteniladenine and Benciladenine (0; 0,5; 1,0; 2,0 y 2,5 mg.L<sup>-1</sup>), and in the first subculture, the BA (0,5; 1,0; 2,0; 2,5 y 5,0 mg.L<sup>-1</sup>). With 2 mg.L<sup>-1</sup> BA was reached the best number of shoots/explants in both studied cultivars.

**Key words:** Micro propagation, culture medium, little torch ginger.

Recibido el 9-1-2007 • Aceptado el 30-4-2007

Autor para correspondencia e-mail: agba1982@yahoo.es y norcam@intercable.net.ve

## Introducción

*Etilingera hemisphaerica* es una especie ornamental tropical, perteneciente a la familia Zingiberaceae. Se caracteriza por ser una planta herbácea y perenne, cuya altura varía entre 2 y 4 m. El tallo floral se desarrolla directamente del rizoma en forma erecta, alcanzando 1 m o más de altura, aunque en los cultivares 'Red Tulip' y 'Black Tulip' puede ser de menor tamaño. Este tallo termina en una inflorescencia globosa, cuyas brácteas presentan colores que van desde rojo vivo hasta rosado (2). Su uso hortícola principalmente es con fines paisajísticos y como flor de corte, debido a la vistosidad de las inflorescencias y colores llamativos que le dan apariencia de antorcha, por lo que se considera una flor de exquisita belleza, muy atractiva para el mercado nacional e internacional (2 y 3). Por ser una especie tropical, Venezuela presenta condiciones agroclimáticas adecuadas para su cultivo. No obstante, ha sido poco explotada, aunque en los últimos años el interés por dicha especie se ha incrementado y el área cultivada ha venido en aumento sostenido (3).

Las plantas de *Etilingera* pueden ser propagadas sexualmente, aunque sus semillas son de corta viabilidad y

tardan dos meses y medio en germinar, y asexualmente, utilizando secciones de rizoma de 8 a 13 cm de longitud, los cuales requieren una etapa de vivero. Esta última forma es la empleada comercialmente, a pesar de ser un proceso más lento, requerir mayor inversión y existir la posibilidad de transmitir a la descendencia insectos y patógenos presentes en el material parental. Sin embargo, tiene la ventaja de que las plantas producen flores en el mismo año de su plantación, en contraste con las de semilla que tardan de 2 a 2,5 años (2).

La técnica de cultivo *in vitro* ha permitido la multiplicación masiva y la obtención de plantas sanas y estables genéticamente; además, ha resultado un método exitoso para la propagación masiva de especies pertenecientes a la familia Zingiberaceae (4). Sin embargo, en el caso específico de *Etilingera*, no hay antecedentes previos de su cultivo mediante dicha técnica. Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue evaluar el origen de los explantes, condiciones físicas de los medios de cultivo y el efecto de reguladores de crecimiento sobre la propagación *in vitro* de dos cultivares de *Etilingera hemisphaerica*.

## Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Posgrado de Horticultura de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado,

utilizando como material vegetal dos cultivares de *Etilingera hemisphaerica*: 'Red Tulip' y 'Black Tulip'. Para la propagación *in vitro* de ambos cultivares se emplearon dos

etapas: a) Establecimiento del cultivo con el propósito de regenerar brotes libres de contaminantes visibles y b) Multiplicación y enraizamiento de los brotes obtenidos en la etapa de establecimiento, considerando que otras especies de la familia Zingiberaceae han tenido la capacidad de multiplicarse y al mismo tiempo formar raíces en el mismo medio (4).

#### **Establecimiento del cultivo.**

Secciones de rizomas provenientes de plantas cultivadas a plena exposición solar, fueron lavados y sometidos al siguiente protocolo de desinfección: 10 minutos de inmersión en una solución jabonosa (Betadine®) al 10%, 15 minutos en funguicida (Benlate® 4 g.L<sup>-1</sup>) y finalmente 15 minutos en hipoclorito de sodio (i.a. 5,25%) al 10%. Entre cada paso, el material se enjuagó tres veces con agua destilada, y los tres últimos, se realizaron en la cámara de flujo laminar con agua desmineralizada y estéril. El explante consistió de ápices caulinares (2 a 3 mm de longitud), evaluando dos fuentes de origen: yemas terminales y yemas axilares presentes en los rizomas. El medio nutritivo estuvo constituido por las sales de Murashige y Skoog (MS) (5), suplementadas con tiamina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), piridoxina (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), inositol 100 mg.L<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.L<sup>-1</sup> y benziladenina (BA) 0,5 mg.L<sup>-1</sup> y fue dispensado en tubos de ensayo (20 ml/tubo). Se probaron tres estados físicos del medio: líquido con soporte de papel de filtro (Puente Heller), líquido sin soporte (sumergido) y semisólido, adicionando 7 g.L<sup>-1</sup> de

agar. Los explantes crecieron durante cuatro semanas bajo intensidad luminosa de 13,51 mmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 horas luz y 24 ± 2°C de temperatura.

Para evaluar los tratamientos se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 2x3 (dos fuentes de explante y tres estados físicos del medio), 10 repeticiones por tratamiento y un explante por tubo como unidad experimental. A las cuatro semanas de cultivo, las variables evaluadas fueron: longitud y diámetro del explante; así mismo, el número de explantes vivos y número de explantes contaminados, con el fin de hacer o no ajustes en el protocolo de desinfección.

**Multiplicación y Enraizamiento de los brotes.** Los explantes que respondieron adecuadamente en la etapa de establecimiento se transfirieron al medio de MS con 2 mg.L<sup>-1</sup> BA para inducir la formación brotes. A los dos meses de cultivo, los brotes formados fueron retirados del medio de cultivo y se les eliminó el follaje y las raíces, dejando sólo la base del pseudotallo (1,5 a 2 cm), el cual fue utilizado como explante para la multiplicación (4). Con el objetivo de incrementar el número de brotes por explante cultivado y lograr el enraizamiento de los mismos, se realizaron dos ensayos: En el primero se probaron tres citocininas: Benziladenina (BA), Cinetina (K) y 2-isopenteniladenina (2ip) en cuatro concentraciones (0,5; 1,0; 2,0 y 2,5 mg.L<sup>-1</sup>), y en el segundo, el efecto de cinco concentraciones de BA (0,5; 1,0; 2,0; 2,5 y 5,0 mg.L<sup>-1</sup>). El medio de cul-

tivo utilizado fue similar al descrito en la etapa de establecimiento, solidificando con 7 g.L<sup>-1</sup> de agar. Los explantes se colocaron en frascos de 120 ml de capacidad con 20 ml de medio y crecieron durante ocho semanas bajo intensidad luminosa de 67,57 mmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 horas luz y 24 ± 2°C de temperatura.

En ambos experimentos se usó un diseño completamente al azar. El primero, con arreglo factorial de tratamiento 3x4 (tres citocininas en cuatro concentraciones) mas un control

único, libre de citocininas, para un total de 13 tratamientos y 16 repeticiones por tratamiento. El segundo, con cinco tratamientos y 16 repeticiones por tratamiento, cultivando en ambos ensayos, cuatro explantes por frasco como unidad experimental. A las ocho semanas, las variables evaluadas fueron: número de brotes/explante; número de hojas/brote; longitud de brotes y longitud máxima de raíces. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente mediante el programa Cohort 2 (1990).

## Resultados y discusión

### Establecimiento del cultivo:

En ambos cultivares los ápices caulinares provenientes de yemas terminales fueron superiores a los extraídos de yemas laterales sólo en la longitud de los explantes, cuyos promedios variaron de 0,6 a 1,17 y 0,54 a 0,86 cm para 'Red Tulip' y 'Black Tulip', respectivamente; mientras que en el diámetro se observó una respuesta similar, al alcanzar valores entre 0,4 y 0,67 cm para 'Red Tulip' y entre 0,23 y 0,25 cm para 'Black Tulip', independientemente de la procedencia del explante. Esto posiblemente se debió a que las yemas terminales constituyen el principal sitio de síntesis de auxinas, tal como lo señalado en la multiplicación *in vitro* de papa, en donde se obtuvo mayor respuesta al utilizar esquejes caulinares apicales en relación a las yemas del primer, segundo y tercer nudo, sustentado por las diferencias hormonales existentes entre las yemas ubicadas a diferentes distancias del ápice (6).

En ambos cultivares, los medios

semisólido y líquido con soporte (Puente Heller), fueron estadísticamente superiores, ya que en ambos los explantes alcanzaron la mayor longitud (1,17 y 1,03 cm para 'Red Tulip' y 0,86 y 0,64 cm para 'Black Tulip', respectivamente) y diámetro (0,67 y 0,65 cm para 'Red Tulip' y 0,25 y 0,25 cm para 'Black Tulip', respectivamente), especialmente en los extraídos de yemas apicales. Por el contrario, en el medio líquido sin soporte (sumergido), se registraron los menores valores de longitud (0,53 a 0,6 cm para 'Red Tulip' y 0,3 a 0,59 cm para 'Black Tulip') y de diámetro (0,40 a 0,47 cm para 'Red Tulip' y 0,20 a 0,23 cm para 'Black Tulip'), correspondiendo estos promedios a explantes extraídos de yemas laterales y terminales, respectivamente. El porcentaje de explantes vivos estuvo comprendido entre 67 y 100% en 'Red Tulip' y entre 70 y 100% en 'Black Tulip'. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en *Cattleya*

*lueddemaniana* cultivada sobre puentes de papel de filtro (Puente Heller), al lograr entre 60 y 80% de sobrevivencia (7). El porcentaje de contaminación no superó el 25% en ambos cultivares, por lo que no se requirió hacer ajustes en el protocolo de desinfección utilizado.

### **Multiplicación** y

**enraizamiento:** En el primer experimento el empleo de las tres citocininas permitió un adecuado crecimiento y desarrollo de brotes y raíces en los dos cultivares. Sin embargo, la BA fue la citocinina que estimuló significativamente ( $P < 0,001$ ) el mayor número de brotes/explante en las concentraciones de 1 y 2  $\text{mg.L}^{-1}$  para 'Red Tulip' y de 2 y 2,5  $\text{mg.L}^{-1}$  para 'Black Tulip' (cuadro 1). Con estas concentraciones, las respuestas obtenidas en el resto de las variables fueron ligeramente inferiores a la de los otros tratamientos. Sin embargo, sus valores permitieron un adecuado manejo de las vitroplantas al momento de la aclimatización. Esto se debe a que incrementos en los niveles de citocininas pueden mejorar la tasa de

multiplicación, pero al mismo tiempo afectar el tamaño y calidad del brote (1 y 6).

En el segundo experimento se encontró que para 'Red Tulip' la concentración de 2  $\text{mg.L}^{-1}$  de BA fue estadísticamente superior ( $P < 0,001$ ) en las variables número de brotes/explante (3,69), longitud de brotes (11,54 cm) y longitud máxima de raíces (8,61 cm); mientras que en 'Black Tulip' esta misma concentración fue significativa ( $P < 0,05$ ) para las variables número de brotes/explante (3,00), longitud de brotes (7,93 cm), número de hojas (2,81) y longitud máxima de raíces (8,84 cm) (cuadro 2). Estos resultados se asemejan, en cuanto al número de brotes, a los encontrados en la Zingiberaceae *Alpinia purpurata* 'Jungle King', donde se obtuvo un promedio de 4 brotes/explante con las concentraciones de 1 y 2  $\text{mg.L}^{-1}$  BA. Sin embargo, difieren en el resto de las variables, ya que los valores de longitud de brotes (5,13 cm), número de hojas (4,6) y longitud máxima de raíces (3,40 cm) en esta especie, fueron inferiores (4).

**Cuadro 1. Efecto de tres citocininas Cinetina (K), Benziladenina (BA) e Isopenteniladenina (2ip) sobre la multiplicación y enraizamiento de *E. hemisphaerica* 'Red Tulip' y 'Black tulip' a los 60 días de cultivo.**

Cultivar	Citocinina	Concentración mg.L <sup>-1</sup>	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de Hojas	Longitud máxima de raíces
Red Tulip	Testigo	0	1,56 c	11,88 ab	5,5 ab	8,53 bcd
	K	0,5	1,25 c	11,59 abc	4,88 bc	10,34 ab
	K	1	2 bc	11,27 a	5,31 ab	11,24 a
	K	2	1,75 bc	11,84 ab	4,88 bc	7,94 cd
	K	2,5	1,81 bc	12,44 a	5,5 ab	11,09 a
	BA	0,5	2,75 ab	9,98 bcd	5,06 abc	9,11 abc
	BA	1	3,25 a	9,33 de	5,56 ab	7,67 cd
	BA	2	3,62 a	8,81 de	4,38 c	8,39 bcd
	BA	2,5	2,75 ab	7,84 e	5,06 abc	9,54 abc
	2ip	0,5	1,5 c	10,81 abcd	5,78 ab	7,69 cd
	2ip	1	1,87 bc	10,72 abcd	5,88 a	6,5 d
	2ip	2	1,75 bc	9,68 cde	5,5 ab	7,52 cd
	2ip	2,5	1,81 bc	9,78 cde	5,81 a	6,79 d
	CV %		28,76	13,25	10,42	17,31
Significancia		***	***	**	***	***

Los valores con la misma letra no difieren al nivel del 1% según las pruebas de Duncan (n=13). \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; ns: no significativo.

**Cuadro 1. Efecto de tres citocininas Cinetina (K), Benziladenina (BA) e Isopenteniladenina (2ip) sobre la multiplicación y enraizamiento de *E. hemisphaerica* ‘Red Tulip’ y ‘Black tulip’ a los 60 días de cultivo (Continuación).**

Cultivar	Citocinina	Concentración mg.L <sup>-1</sup>	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de Hojas	Longitud máxima de raíces
BlackTulip	Testigo	0	1,69 bc	13,07 cde	7,81 a	8,43 bc
	K	0,5	1,06 c	16,53 a	6,81 ab	12,4 ab
	K	1	1,13 bc	14,19 bcd	6,31 bc	9,2 abc
	K	2	1,75 bc	13,68 bcd	6,38 bc	9,98 abc
	K	2,5	1,38 bc	15,74 ab	5,75 bc	12,9 a
	BA	0,5	1,13 bc	14,53 bc	5,38 cde	11,3 abc
	BA	1	1,56 bc	10,58 fg	4,31 e	8,89 abc
	BA	2	3,13 a	9,62 gh	4,4 de	8,48 bc
	BA	2,5	2,88 a	8,25 h	4,38 de	8,12 c
	2ip	0,5	1,06 c	14,51 bc	5,5 cde	11,98 abc
	2ip	1	1,5 bc	13,91 bcd	6 bc	11,99 bc
	2ip	2	1,94 b	11,47 efg	5,56 cd	10,27 abc
	2ip	2,5	1,88 bc	12,31 def	6,13 bc	9,66 abc
	CV %		25,53 ***	12,32 ***	9,25 ***	19,10 ***
	Significancia					

Los valores con la misma letra no difieren al nivel del 1% según las pruebas de Duncan (n=13). \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; ns: no significativo.

**Cuadro 2. Efecto de cinco dosis de Benziladenina (BA) sobre el número y longitud de brotes, número de hojas y longitud máxima de raíces de *E. hemisphaerica* ‘Red Tulip’ y ‘Black Tulip’ después de 60 días del primer subcultivo.**

Cultivar	Citocinina	Concentración mg.L <sup>-1</sup>	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de Hojas	Longitud máxima de raíces (cm)
Red Tulip	BA	0,5	1,63 <sup>c</sup>	12,36 <sup>a</sup>	6,81 <sup>a</sup>	9,29 <sup>a</sup>
	BA	1	1,69 <sup>c</sup>	12,21 <sup>a</sup>	6,19 <sup>a</sup>	10,74 <sup>a</sup>
	BA	2	3,69 <sup>a</sup>	11,54 <sup>a</sup>	5,19 <sup>b</sup>	8,61 <sup>a</sup>
	BA	2,5	2,19 <sup>bc</sup>	11,65 <sup>a</sup>	5,13 <sup>b</sup>	10,99 <sup>a</sup>
	BA	5	3,38 <sup>ab</sup>	6,63 <sup>b</sup>	4,25 <sup>c</sup>	4,99 <sup>b</sup>
	CV %		30,44	11,26	10,97	20,68
	Significancia		***	***	***	***
BlackTulip	BA	0,5	2,38 <sup>ab</sup>	8,27 <sup>a</sup>	2,63 <sup>b</sup>	9,95 <sup>a</sup>
	BA	1	3,00 <sup>a</sup>	7,71 <sup>ab</sup>	2,56 <sup>b</sup>	8,15 <sup>a</sup>
	BA	2	3,00 <sup>a</sup>	7,93 <sup>ab</sup>	2,81 <sup>ab</sup>	8,84 <sup>a</sup>
	BA	2,5	3,31 <sup>a</sup>	6,60 <sup>ab</sup>	2,69 <sup>ab</sup>	6,84 <sup>ab</sup>
	BA	5	3,44 <sup>a</sup>	6,40 <sup>ab</sup>	3,38 <sup>a</sup>	4,77 <sup>b</sup>
	CV %		24,29	12,79	12,90	31,53
	Significancia		ns	*	*	**

Los valores con la misma letra no difieren al nivel del 1% según las pruebas de Duncan (n=13). \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; ns: no significativo



## Conclusiones

En la propagación *in vitro* de *Etilingera hemisphaerica* 'Red Tulip' y 'Black Tulip' sólo fueron necesarias dos etapas: el establecimiento del cultivo y la multiplicación y enraizamiento de los explantes, ya que en esta última ocurrió al mismo tiempo, el incremento de los brotes y la rizogénesis.

El establecimiento *in vitro* se logró cultivando ápices caulinares ex-

traídos tanto de yemas terminales como laterales presentes en los rizomas, los cuales tuvieron mejor desarrollo en los medios líquido con soporte (Puente Heller) y semisólido.

La benciladenina (2 mg.L<sup>-1</sup>) fue la citocinina que produjo los mejores resultados en la multiplicación y desarrollo de los brotes en los dos cultivares propagados.

## Literatura citada

1. Escandón, A. S., P. Ferrari, G. Facciuto, S. Soto, J.C. Hagiwara y A. Acevedo. 2003. Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (Hibr.) una arbustiva de relevancia ornamental. RIA, 32 (1):111-122
2. Lamas Alonso Da Mota. 2002. Floricultura tropical. Técnicas de cultivo. Serie Emprendedor, 5. Recife: SEBRAE/PE. Brasil. pp: 45-49.
3. Maciel N. y N. Mogollón. 1997. Germinación en seis Zingiberales Ornamentales. Proc. Int. Coc. Hort. Trop. 41:51 – 31.
4. Mogollón N., M. González y J.G. Diaz. 1997. Multiplicación clonal *in vitro* y Aclimatización de *Alpinia purpurata*. Proc. Inter. Soc. Trop. Hort. 41:62 – 69. 1997.
5. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture by giberelin. Ann. Rev. Phisology Plant. 15:473-497
6. Pérez, J.N., E.A. Jiménez y D. Agramonte. 1998. Aumento de la eficiencia en la Micropropagación. In; Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez Ponce, J. N. (Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. pp:179-191.
7. Torres J. y N. Mogollón. 1997. Micropropagación Clonal Masiva de *Cattleya lueddemanniana* Rchb.f. Proc. Inter. Soc. Trop. Hort. 41:92-98.