

PROPAGACIÓN *In vitro* DE *Heliconia curtispatha* P, PLANTA UTILIZADA CONTRA LA MORDEDURA DE SERPIENTES POR ALGUNAS COMUNIDADES CAMPESINAS DE LA REGIÓN COLOMBIANA DEL URABÁ

In vitro PROPAGATION OF *Heliconia curtispatha* P, PLANT USED AGAINST SNAKEBITE BY SOME RURAL COMMUNITIES OF THE COLOMBIAN REGION OF URABÁ

Juan C. ALARCÓN P.^{1,2*}, Diego M. MARTINEZ R.¹, Andrea SALAZAR-OSPINA^{1,2}

Recibido: Agosto 19 de 2009 Aceptado: Septiembre 16 de 2011

RESUMEN

Heliconia curtispatha Petersen (Zingiberales) comúnmente conocida como platanillo, es usada en la medicina tradicional colombiana por su acción antiedematizante, antihemorrágica y neutralizante del veneno de *Bothrops asper* (mapaná) responsable del 95% de las mordeduras de serpientes en el país. Lo anterior destaca su utilidad y potencial función, como coadyuvante en el tratamiento del accidente ofídico. La propagación por cultivos *in vitro*, se convierte en una herramienta valiosa e interesante para su masificación, debido al difícil acceso al material vegetal en su ambiente natural y la carencia de estudios previos en multiplicación *in vitro* de esta especie. En el presente trabajo se obtienen plántulas a partir de semillas y se evalúa su propagación en medios de cultivo Murashige & Skoog, semisólidos y líquidos suplementados con reguladores de crecimiento tipo citoquinina. Experimentalmente, se favorece la propagación de la *Heliconia* (2 brotes semana⁻¹) cuando se utiliza medio Murashige & Skoog líquido sin adición de reguladores de crecimiento o al emplear Murashige & Skoog semisólido adicionándole 2 mg.L⁻¹ 6-Bencilaminopurina 0.93 brotes.semana⁻¹. Este es el primer reporte de propagación *in vitro* de *H. curtispatha* y el primer paso para el estudio de metabolitos secundarios con potencial antiofídico que pueden producirse bajo tales condiciones.

Palabras Clave: *Heliconiaceae*, Zingiberales, *in vitro*, etnobotánica, micropropagación

ABSTRACT

Heliconia curtispatha Petersen (Zingiberales) commonly known as platanillo, is used in colombian traditional medicine by its anti-edema, antihemorrhagic and neutralising action of *Bothrops asper* (mapaná, X) venom, responsible for 95% of snakebites in the country. The previous, emphasizes its utility and potential function as helper in the treatment of the ophidian accident. The *in vitro* propagation techniques becomes an interesting tool for plant and metabolites production, because of the hazardous accessibility to plants in their natural environment and the deficiency of previous studies on *in vitro* multiplication of the specie. In the present work, plantlets are obtained from seeds and its *in vitro* propagation is evaluated in Murashige & Skoog semi-solid and liquid medium without or in combination with cytokinines-like. Experimentally, it promotes the propagation of *Heliconia* (2 weeks outbreaks⁻¹) when using Murashige

¹ Programa Ofidismo/Escurpionismo. Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

² Departamento de Farmacia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A.1226. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: jalarcon@farmacia.udea.edu.co

& Skoog liquid medium without added growth regulators or by using Murashige & Skoog semisolid adding 2 mg.L⁻¹ 6-benzylaminopurine 0.93 week outbreaks⁻¹. This is the first report of *in vitro* propagation of *H. curtispatha* and the first step for the study of secondary metabolites with potential venom that can occur under such conditions.

Keywords: *Heliconiaceae*, Zingiberales, *in vitro*, ethnobotany, micropropagation.

INTRODUCCIÓN

Las heliconias, plantas herbáceas que se propagan lentamente por rizomas o semillas (1), son especies distribuidas en un amplio rango de altitud (400 a 1800 m.s.n.m.), en diferentes hábitats (pantanos, riberas de ríos, barrancos, y bosques tropicales) (2) y con hojas grandes y pecíolos casi ausentes o muy alargados. Las flores perfectas, penden como inflorescencias de numerosos colores y brácteas, mientras que los frutos contienen de 1 a 3 semillas por drupa y colores de tonalidad azul o naranja, según el grado de madurez (3). En Colombia, concretamente en las regiones Andina y Pacífica, se encuentra una de las mayores diversidades de especies de este género vegetal (4), incluyendo la *Heliconia curtispatha* Petersen, que se conoce tradicionalmente como platanillo rojo o nakutagar (en lengua Cuna). Esta especie, cuya composición química no ha sido estudiada (5), alcanza alturas hasta de seis metros y posee hojas alternas con limbos largos y anchos, pecíolos envolventes convertidos en vainas rojizas, frutos azules, y flores de color amarillo agrupadas en racimos planos con espadas y pedúnculos rojos. En la medicina tradicional, la decocción de rizomas y hojas se utiliza contra el reumatismo (6) y al parecer, el “platanillo rojo” podría constituirse en una gran alternativa terapéutica para la comunidad, pues, además del uso tradicional referenciado, se ha encontrado que sus componentes metabólicos resultan útiles como antiedematizantes, antihemorrágicos y neutralizantes del veneno de *Bothrops asper* (mapaná equis), especie causante del 50 al 70% de las mordeduras de serpiente en Colombia (6-10).

Por las dificultades que presentan las heliconias para su propagación por fuera de su entorno natural, el cultivo de tejidos se constituye en una herramienta valiosa para masificar su producción; sin embargo, su utilización no ha sido masiva a partir de semillas y no se han establecido para esta especie protocolos de micropropagación. Los trabajos reportados con la propagación han sido a partir de yemas e inducción de tejido desdiferenciado

con características organogénicas para otra especie emparentada (*H. pistacorum*) (11-18).

Estas alternativas de micropropagación o de producción metabólica *in vitro*, son estrategias aún no exploradas en *H. curtispatha*, por lo que la realización de este trabajo encamina los esfuerzos a obtener especímenes *in vitro* que al provenir de las semillas garanticen la uniformidad en la producción con escasa o ninguna variación somaclonal, aún no reportadas para esta especie. Por otra parte, se busca evaluar, en forma preliminar, la desdiferenciación tisular como estrategia de potenciales suspensiones celulares generadoras de metabolitos con actividad neutralizante del veneno de serpientes y otros efectos adicionales como, el neurotóxico, el miotóxico, el cardiotoxico y el agregante plaquetario (19).

MATERIALES Y MÉTODOS

Embriones obtenidos de semillas colectadas e identificadas por el personal del Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe de la ciudad de Medellín, Colombia (1538 m.s.n.m.), fueron lavados con jabón iodado y abundante agua corriente antes de su desinfección por exposición a NaClO (2% V/V, 25 min.) y transferencia aséptica a frascos de cultivo dispuestos con un medio nutritivo semisólido previamente esterilizado por autoclave (121°C/ 15 psi/ 15 min.) y compuesto por las sales básicas propuestas por Murashige & Skoog (MS) (20): pH (5,7-5,8), sacarosa (30 g/l) y agar (7 g/l). Una vez obtenidas las plántulas (aproximadamente 6 meses después de ser transferidas al medio citado), éstas sirvieron como material de partida para los ensayos realizados, en los que se incluyeron medios nutritivos semisólidos como el utilizado para la obtención de las plántulas (medio control), o, con adición de reguladores de crecimiento tipo citoquinina 6-Bencilaminopurina (BA), o, 6-furfurilaminopurina (Kinetina) a concentraciones de 0.5, 1, 2, 4 en mg/L (tratamientos).

Doscientos setenta plántulas distribuidas en dos repeticiones (135/ensayo: 8 tratamientos y un grupo control) se mantuvieron por cinco semanas bajo

condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), con fotoperiodicidad correspondiente a día largo (16 h de luz, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y revisiones semanales de las variables dependientes del proceso (número

de hojas, cantidad de brotes nuevos y longitud de los mismos (cm), altura de las plántulas (cm), número de raíces formadas y longitud radicular (cm)), como se observa en la figura 1.

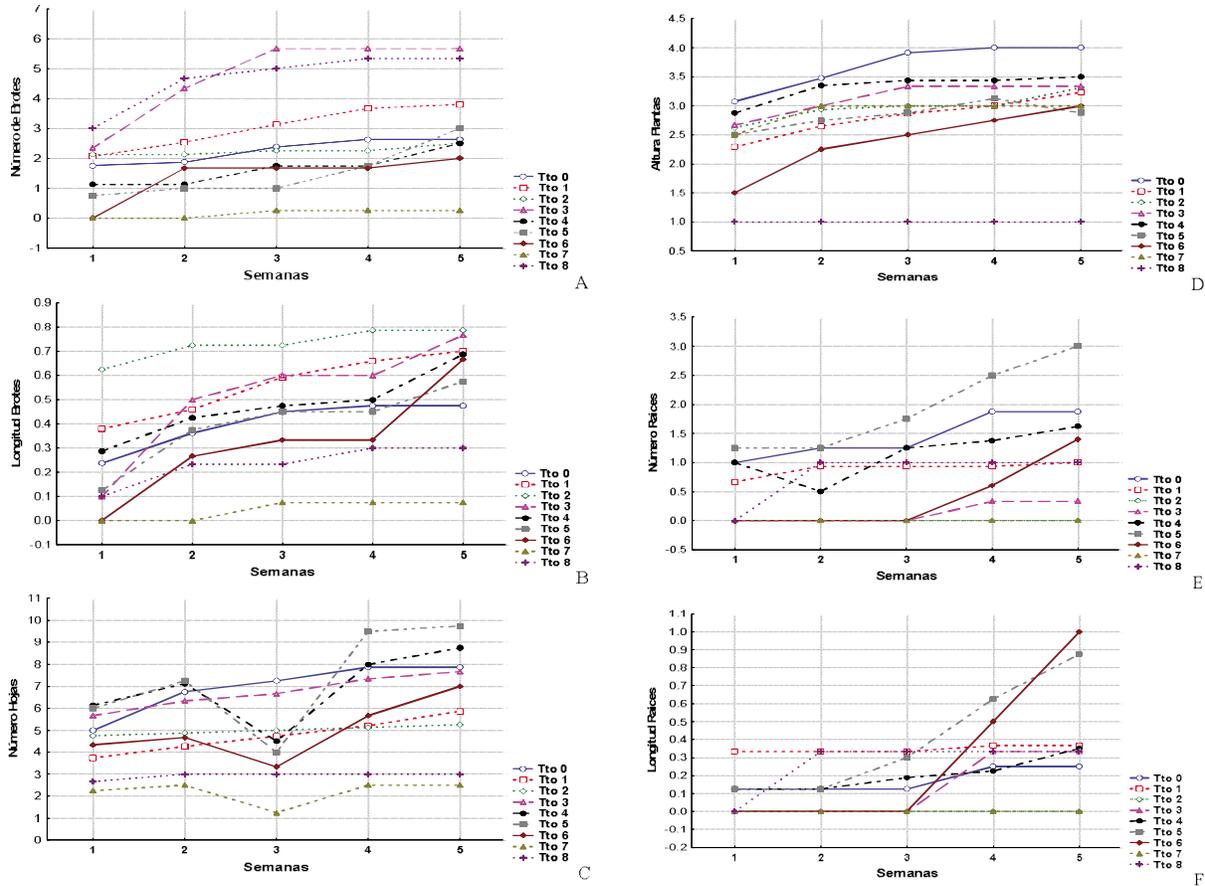


Figura 1. *Heliconia curtispatha* micropropagadas en medios nutritivos semisólidos: (A) Número de Brotes; (B) Longitud de los brotes; (C) Número de hojas; (D) Altura de las plantas; (E) Número de raíces; (F) Longitud de las raíces.

Adicionalmente, y con el fin de evaluar el crecimiento de nuevos brotes en medios líquidos, se aislaron 135 de ellos, independientes y únicos a partir de las plántulas propagadas en medios semisólidos sin reguladores de crecimiento, y se transfirieron a frascos de cultivo dispuestos con medios de cultivo líquidos previamente esterilizados con calor húmedo (121°C / 15 psi / 15 min.) y compuestos por las sales básicas de Murashige & Skoog (20): pH (5,7-5,8) y sacarosa (30 g/l) (medio control), o, con adición de 6-Bencilaminopurina (BAP) a con-

centraciones de 0,5, 1, 2, 4 en mg/L (tratamientos). Una vez transferidas, las plántulas se mantuvieron por cuatro semanas sin agitación y bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), fotoperiodicidad correspondiente a día largo (16h de luz, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y revisiones semanales de número de brotes, longitud de los mismos, altura de las plantas, número de raíces y longitud de las mismas, como se observa en la figura 2, para comparar todos los tratamientos utilizando como variable fija el tiempo de exposición en semanas.

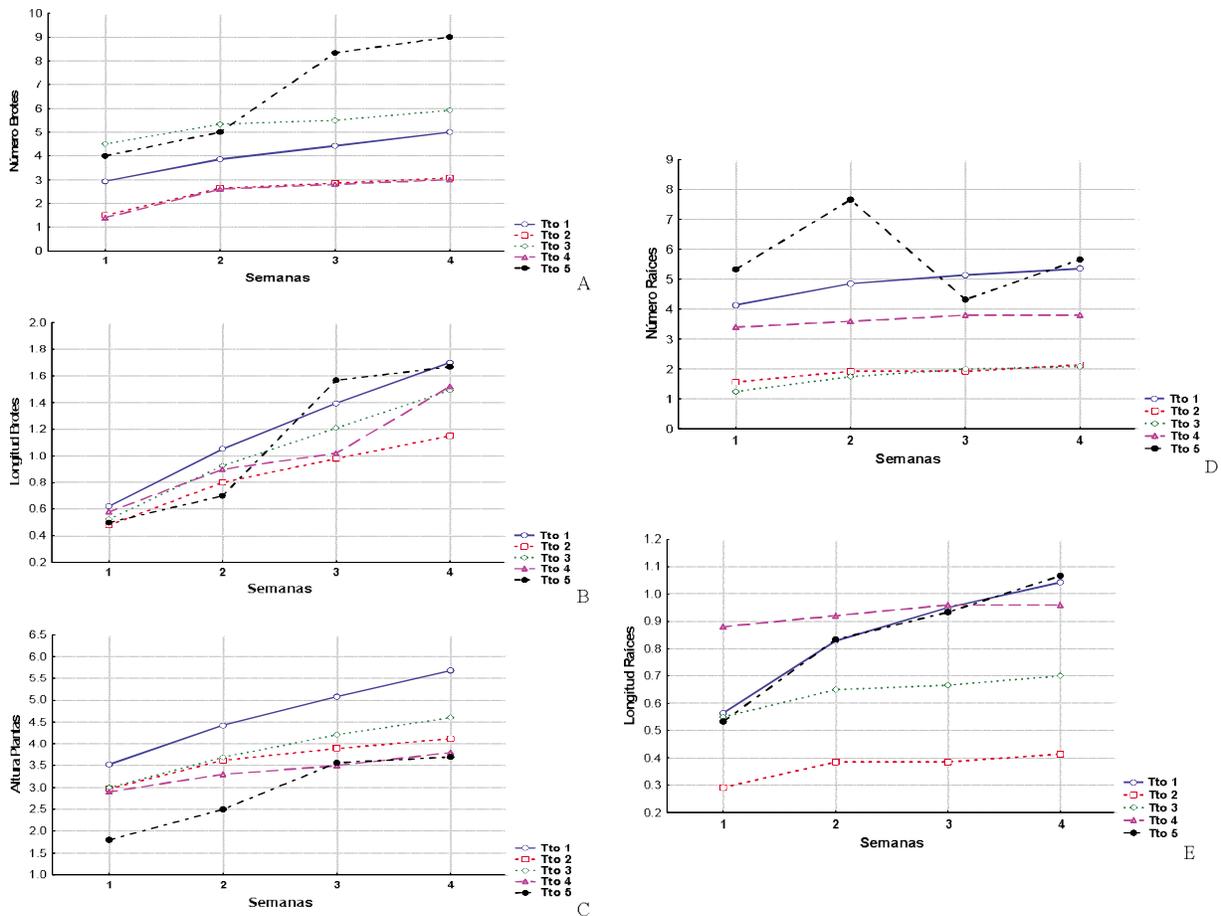


Figura 2. *Heliconia curtispatha* micropropagada en medios nutritivos líquidos suplementados con diferentes concentraciones de BAP: (A) Número de brotes; (B) Longitud de los brotes; (C) Altura de las plantas en medio líquido; (D) Número de raíces; (E) Longitud de raíces.

Adicionalmente y para establecer los efectos de los tratamientos en cada variable de estudio se utilizó la prueba de Newman-Keuls, el test de esfericidad de datos de Mauchley y la prueba multivariada de Pillai-Bartlett. Los datos se procesaron en el paquete STATISTICA 7.0 (StatSoft® Inc., Tulsa, OK, USA) y las pruebas se consideraron significativas con una probabilidad de error $\alpha < 0,05$.

Finalmente, la tasa de velocidad de multiplicación-TVM- (en medios semisólidos y líquidos) se calculó como la diferencia entre el número de brotes obtenidos al final del ciclo y el número de explantes introducidos al ciclo de multiplicación, dividida por el tiempo de duración del ciclo:

$$TVM = (\text{número de brotes finales} - \text{número de brotes iniciales}) / \text{tiempo.}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque la propagación mediante cultivo “*in vitro*” de *Heliconia curtispatha* no ha sido descrita previamente se dispone de información acerca de los factores que pueden estar involucrados en la micropropagación de especies relacionadas (12, 13, 16), en la que al parecer, la inclusión de citoquininas (BAP o kinetina) en los medios nutritivos tiende a promover un mayor desarrollo de brotes en las plantas (12-14, 16, 21-28).

Por su parte, se ha observado en este trabajo con respecto a otros (21-23, 27) que no hay diferencias significativas en el número de brotes generados como consecuencia de la adición de estos reguladores de crecimiento en los medios semi-sólidos como

se ilustra en la tabla 1; sin embargo, al igual que en los estudios citados, el mayor número de brotes y la mayor tasa de multiplicación se obtiene con el tratamiento que incluyen BAP a una concentración de 2 mg/L. Adicionalmente, un estudio (13) concluye que con concentraciones altas de kinetina se logra un mayor número de brotes con respecto al control e igualmente se ha reportado en especies vegetales relacionadas como la *Renealmia alpinia* (Rottb) (29), no presentándose diferencias significativas sobre esta variable.

Los resultados llevan a pensar posiblemente en un eventual efecto promotor consecuente con la adición de este regulador a una concentración de 4 mg/L (tabla 1, tratamiento 8), comparable al conocido para otras familias afines, como las Musaceas y Zingiberaceae, en las que el empleo

de altas concentraciones de este regulador favorece la generación de brotes (25-27); sin embargo, esta aseveración resulta diferente a lo observado en otras especies de *Heliconia* (16) en las que las altas concentraciones causan disminución en la frecuencia de regeneración de brotes. Es necesario destacar el efecto contradictorio observado en la tabla 1 con respecto a la utilización de reguladores de crecimiento, donde una concentración de 2 mg/L de BAP promueve una buena generación de brotes en contraste con la kinetina (2,0 mg/L Kin), en la que se evidencia una disminución en el número de brotes con relación al control, sin que esta pueda asociarse a un efecto de dosis inversa, pues una concentración mayor de este regulador lograría promover la aparición de un mayor número de brotes (tratamiento 8).

Tabla 1. Comparaciones intertratamientos (prueba de Newman-Keuls) realizadas en la micropropagación de *Heliconia curtispatha* en medios semisólidos.

Tiempo Tratamiento	SEMANA 1			SEMANA 3			SEMANA 5					TVM
	Número de Brotes	Longitud (cm) Brotes	Altura Plántula (cm)	Número de Brotes	Longitud (cm) Brotes	Altura Plántula (cm)	Número de Brotes	Longitud (cm) Brotes	Altura plántulas (cm)	Número nuevos brotes	Longitud (cm) de nuevos brotes	
control	1,75 ± 2,18	0,23 ± 0,34	3,07 ± 2,68	2,37 ± 2,92	0,45 ± 0,57	3,91 ± 2,51	2,62 ± 3,06	0,47 ± 0,55	4,00 ± 2,42 ^a	2,62 ± 3,06 ^a	0,47 ± 0,55 ^a	0,32
(1) 0,5 mg/L BA	2,06 ± 2,54	0,38 ± 0,42	2,29 ± 1,84	3,13 ± 3,11	0,59 ± 0,54	2,86 ± 2,39	3,80 ± 3,36	0,70 ± 0,59	3,23 ± 2,38 ^a	3,80 ± 3,36 ^a	0,70 ± 0,59 ^a	0,56
(2) 1,0 mg/L BA	2,12 ± 1,24	0,62 ± 0,36	2,62 ± 0,79	2,25 ± 1,16	0,72 ± 0,48	3,00 ± 0,92	2,50 ± 1,30	0,78 ± 0,48	3,31 ± 1,41 ^a	2,50 ± 1,30 ^a	0,78 ± 0,48 ^a	0,30
(3) 2,0 mg/L BA	2,33 ± 4,04	0,10 ± 0,17	2,66 ± 1,52	5,66 ± 4,50	0,60 ± 0,36	3,33 ± 1,60	5,66 ± 4,50	0,76 ± 0,25	3,33 ± 1,60 ^a	5,66 ± 4,50 ^a	0,76 ± 0,25 ^a	0,93
(4) 4,0 mg/L BA	1,12 ± 1,35	0,28 ± 0,36	2,87 ± 1,02	1,75 ± 1,98	0,47 ± 0,51	3,43 ± 1,17	2,50 ± 1,92	0,68 ± 0,53	3,50 ± 1,16 ^a	2,50 ± 1,92 ^a	0,68 ± 0,53 ^a	0,30
(5) 0,5 mg/L Kin	0,75 ± 1,50	0,12 ± 0,25	2,50 ± 1,15	1,00 ± 1,41	0,45 ± 0,61	2,87 ± 0,75	3,00 ± 3,16	0,57 ± 0,53	2,87 ± 0,75 ^a	3,00 ± 3,16 ^a	0,57 ± 0,53 ^a	0,40
(6) 1,0 mg/L Kin	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,50 ± 0,70	1,66 ± 1,52	0,33 ± 0,28	2,50 ± 0,70	2,00 ± 1,00	0,66 ± 0,28	2,87 ± 0,75 ^a	2,00 ± 1,00 ^a	0,66 ± 0,28 ^a	0,20
(7) 2,0 mg/L Kin	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00	0,25 ± 0,50	0,07 ± 0,15	3,00 ± 0,00	0,25 ± 0,50	0,07 ± 0,15	3,00 ± 0,22 ^a	0,25 ± 0,50 ^a	0,07 ± 0,15 ^a	0,15
(8) 4,0 mg/L Kin	3,00 ± 5,19	0,10 ± 0,17	1,00 ± 0,00	5,00 ± 6,92	0,23 ± 0,05	1,00 ± 0,00	5,33 ± 7,50	0,30 ± 0,17	1,00 ± 0,17 ^a	5,33 ± 7,50 ^a	0,30 ± 0,17 ^a	0,86

Los datos se expresan como media ± DE; * Los tratamientos con la misma letra forman grupos homogéneos. TVM: Tasa de velocidad de multiplicación.

Con relación a la longitud de los brotes obtenidos ilustrados en la tabla 1 o al número de raíces formadas como se muestra en la tabla 2, no hay diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,40$) entre los tratamientos empleados, o de estos con el control, y en consecuencia ninguno de los tratamientos utilizados muestra un efecto promotor o inhibidor a destacar. Asimismo, la longitud de las raíces recién formadas no es consecuencia de

la acción de un regulador en particular, pues aunque algunos tratamientos presentan un aparente efecto promotor comparado con las plántulas expuestas al medio de cultivo utilizado como control, como se muestra en la tabla 2, en los tratamientos 5 y 6; ninguno de estos alcanza una significancia estadística ($p = 0,80$) que permita suponer que la utilización del mismo, es promotor de una mayor elongación de estas estructuras.

Tabla 2. Comparaciones intertratamientos (prueba de Newman-Keuls) realizadas en la micropropagación de *Heliconia curtispatha* en medios semisólidos

Tiempo Tratamiento	SEMANA 1			SEMANA 3			SEMANA 5				
	Número Hojas	Número Hojas	Número Raíces	Longitud Raíces	Número Raíces	Longitud Raíces.	Número Hojas	Número Raíces	longitud (cm) de raíces en plántulas	Hojas en plántulas	Raíces en plántulas
CONTROL	5,00 ± 4,95	7,25 ± 4,49	1,25 ± 3,53	0,12 ± 0,37	1,00 ± 2,82	0,12 ± 0,35	7,87 ± 4,32	1,87 ± 4,15	0,25 ± 0,37 ^a	7,87 ± 4,32 ^a	1,87 ± 4,15 ^a
(1) 0,5 mg/L BA	3,73 ± 2,76	4,73 ± 3,47	0,93 ± 2,12	0,33 ± 0,81	0,66 ± 1,67	0,33 ± 0,74	5,86 ± 4,06	1,00 ± 2,29	0,36 ± 0,81 ^a	5,86 ± 4,06 ^a	1,00 ± 2,29 ^a
(2) 1,0 mg/L BA	4,75 ± 2,60	5,00 ± 2,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,25 ± 2,49	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,25 ± 2,49 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
(3) 3,0 mg/L BA	5,66 ± 1,52	6,66 ± 1,52	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,57	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	7,66 ± 2,08	0,33 ± 0,57	0,33 ± 0,5 ^a	7,66 ± 2,08 ^a	0,33 ± 0,57 ^a
(4) 4,0 mg/L BA	6,12 ± 0,83	4,50 ± 3,38	1,25 ± 2,18	0,18 ± 0,40	1,00 ± 1,92	0,12 ± 0,23	8,75 ± 1,16	1,62 ± 2,55	0,35 ± 0,4 ^a	8,75 ± 1,16 ^a	1,62 ± 2,55 ^a
(5) 0,5 mg/L Kin	6,00 ± 2,44	4,00 ± 5,47	1,75 ± 2,87	0,30 ± 0,47	1,25 ± 2,50	0,12 ± 0,25	9,75 ± 4,71	3,00 ± 2,70	0,87 ± 0,47 ^a	9,75 ± 4,71 ^a	3,00 ± 2,70 ^a
(6) 1,0 mg/L Kin	4,33 ± 2,08	3,33 ± 1,15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,86	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	7,00 ± 2,64	1,40 ± 1,94	1,00 ± 0,86 ^a	7,00 ± 2,64 ^a	1,40 ± 1,94 ^a
(7) 1,0 mg/L Kin	2,25 ± 1,89	1,25 ± 1,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,50 ± 1,73	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 ^a	2,50 ± 1,73 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
(8) 1,0 mg/L Kin	2,66 ± 2,30	3,00 ± 2,64	1,00 ± 1,73	0,33 ± 0,57	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,57	3,00 ± 2,64	1,00 ± 1,73	0,33 ± 0,57 ^a	3,00 ± 2,64 ^a	1,00 ± 1,73 ^a

Los datos se expresan como media ± DE; * Los tratamientos con la misma letra forman grupos homogéneos.

Tabla 3. Comparaciones intertratamientos (prueba de Newman-Keuls) realizadas en la micropropagación de *Heliconia curtispatha* en medios líquidos que incluían diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA).

Tiempo Tratamiento	SEMANA 1			SEMANA 3			SEMANA 4						
	Número de Brotes	Longitud Brotes (cm)	Altura Plántula (cm)	Número de Brotes	Longitud Brotes (cm)	Altura Plántula (cm)	Número de Brotes	Longitud Brotes (cm)	Altura Plántula (cm)	Número nuevos brotes	Longitud (cm) nuevos brotes	Altura (cm) de plántulas	TVM de nuevos brotes
Control	2,92 ± 3,51	0,62 ± 0,66	3,52 ± 1,03	4,42 ± 3,81	1,39 ± 1,04	5,07 ± 1,75	5,00 ± 4,47	1,70 ± 1,52	5,67 ± 1,74	9,00 ± 3,60 ^a	1,66 ± 0,72 ^a	3,70 ± 1,60 ^a	2,00
(1) 0,5 ppm	1,50 ± 1,69	0,47 ± 0,50	2,97 ± 0,91	2,85 ± 2,79	0,97 ± 0,83	3,89 ± 1,00	3,07 ± 2,86	1,15 ± 1,13	4,11 ± 1,11	5,00 ± 4,47 ^a	1,70 ± 1,52 ^a	5,67 ± 1,74 ^a	1,00
(2) 1,0 ppm	4,50 ± 4,88	0,52 ± 0,33	2,99 ± 1,19	5,50 ± 4,68	1,20 ± 0,61	4,20 ± 1,19	5,91 ± 5,14	1,49 ± 0,93	4,60 ± 1,66	3,07 ± 2,86 ^a	1,15 ± 1,13 ^a	4,11 ± 1,11 ^a	0,51
(3) 2,0 ppm	1,40 ± 1,51	0,58 ± 0,54	2,90 ± 1,27	2,80 ± 2,77	1,02 ± 0,88	3,50 ± 1,22	3,00 ± 3,16	1,52 ± 1,41	3,80 ± 1,44	5,91 ± 5,14 ^a	1,49 ± 0,93 ^a	4,60 ± 1,66 ^a	1,22
(4) 4,0 ppm	4,00 ± 4,58	0,50 ± 0,70	1,80 ± 1,05	8,33 ± 3,51	1,56 ± 0,81	3,56 ± 1,80	9,00 ± 3,60	1,66 ± 0,72	3,70 ± 1,60	3,00 ± 3,16 ^a	1,52 ± 1,41 ^a	3,80 ± 1,44 ^a	0,5

Los datos se expresan como media ± DE; * tratamientos con igual letra forman grupos homogéneos; TVM: Tasa de velocidad de multiplicación.

En cuanto a los medios líquidos como se muestra en las tablas 3 y 4, ninguna de las variables analizadas resulta particularmente influenciada por el uso de alguna concentración del regulador de crecimiento empleado; y por el contrario, los medios de cultivo utilizados como control, muestran resultados similares en el número de brotes generados, la tasa de velocidad de multiplicación, el número de raíces y la longitud de las mismas.

Estos resultados son contrarios a algunos trabajos en los que se muestra un efecto negativo de los medios líquidos en condiciones estáticas (30, 31), al parecer consecuente con una mayor facilidad de absorción de nutrientes e hiperhidricidad que pueden afectar el desarrollo normal de los explantes. El medio líquido sin ningún regulador del crecimiento es suficiente para inducir en buena proporción la generación de brotes con una TVM de

2,0 brotes/semana, superando incluso, en buena medida, los resultados obtenidos en los tratamientos dispuestos con BAP en los que en el mejor de los casos se logró una TVM de 1,22 brotes/semana. Lo observado en los resultados ilustra un grado de superioridad a los obtenidos en medios

semisólidos, en los cuales se percibe la necesidad de suplementarlos con BAP. Lo anterior ofrece una ventaja adicional, ya que la ausencia de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo puede contribuir a disminuir la variación somaclonal que podría ser causada por la acción de los mismos.

Tabla 4. Comparaciones intertratamientos (prueba de Newman-Keuls) realizadas en la micropropagación de *Heliconia curtispatha* en medios líquidos que incluían diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP).

Tratamiento	Variables analizadas y comparaciones de los respectivos promedios					
	Altura plántulas en la semana 4 (cm)	Comparación de la altura promedio (cm) de las plántulas *	Número e raíces presentes por plántula en la semana 4	Comparación del número de raíces presentes por plántula *	Longitud (cm) de las raíces presentes por plántula en la semana 4	Comparación de la longitud (cm) de las raíces presentes por plántula *
CONTROL	3,70 ± 1,60	2,89 ± 1,44 ^a	5,66 ± 2,08	5,75 ± 4,82 ^a	1,06 ± 0,20	0,84 ± 0,36 ^a
(1) 0,5 ppm	5,67 ± 1,74	4,67 ± 1,50 ^a	5,35 ± 4,49	4,87 ± 3,99 ^a	1,04 ± 0,75	0,84 ± 0,61 ^a
(2) 1,0 ppm	4,11 ± 1,11	3,65 ± 1,01 ^a	2,14 ± 3,39	1,89 ± 3,19 ^a	0,41 ± 0,55	0,36 ± 0,52 ^a
(3) 2,0 ppm	4,60 ± 1,66	3,87 ± 1,31 ^a	2,08 ± 1,97	1,77 ± 1,70 ^a	0,70 ± 0,57	0,64 ± 0,53 ^a
(4) 4,0 ppm	3,80 ± 1,44	3,37 ± 1,33 ^a	3,80 ± 4,08	3,65 ± 3,87 ^a	0,96 ± 0,51	0,93 ± 0,48 ^a

Los datos se expresan como media ± DE; * tratamientos con igual letra forman grupos homogéneos.

En este trabajo es adecuado resaltar el suplemento de los medios de cultivo semisólidos con una concentración de 2 mg/L de BA el cual presenta una TVM de 0,93 brotes/semana o de 4 mg/L de kinetina con TVM de 0,86 brotes/semana, sin que los efectos atribuidos a estos reguladores sean efectos de dosis, o con relación entre sí, pues como se ha observado en otros trabajos (13) al utilizar concentraciones altas de kinetina se logra un mayor número de brotes que al utilizar la misma concentración de BAP (24). Esto significa comparativamente que las concentraciones utilizadas podrían no ser elevadas; de hecho, concentraciones altas causan disminución en la frecuencia de regeneración de brotes en diferentes heliconias, como *Heliconia psittacorum* (16), aunque en algunos casos esto no se constituye una constante, pues de manera opuesta se ha conocido que en diversas plantas de esta familia o familias afines, como la Musaceae y Zingiberaceae, es necesario emplear altas concentraciones de este regulador para favorecer la generación de brotes (25-27).

CONCLUSIONES

La tardanza en producción metabólica, sumada a diversos factores como variación en la expresión, dependencia de condiciones climáticas o medioambientales y la alta exigencia de suelos, son razones suficientemente poderosas para considerar que las

técnicas de manipulación *in vitro* son las principales estrategias a desarrollar en masificación, micropropagación y producción metabólica de numerosas plantas. Adicionalmente, la *Heliconia curtispatha* constituye una gran alternativa terapéutica de atención primaria en accidentes ofídicos o en una fuente generadora de moléculas con importancia farmacéutica. Este es el primer reporte de propagación *in vitro* de *Heliconia curtispatha* y adquiere mayor importancia pues con él se encaminan los esfuerzos a obtener especímenes *in vitro* y a generar plantas que con escasa variación somaclonal garanticen uniformidad en la producción y se conviertan en un mecanismo alterno de generación de metabolitos secundarios con potencial efecto inhibitorio de la acción del veneno de *Bothrops asper* que pueden producirse bajo tales condiciones. Por su parte se observa que el medio líquido sin la adición de reguladores de crecimiento es suficiente para la propagación de *Heliconia curtispatha* en condiciones *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Al Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe de la ciudad de Medellín, Colombia por la colección e identificación de las semillas que sirvieron como material de partida para los ensayos realizados y al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto EO1018.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Maza VM, Atehortúa L. Fenología y ecología de *Heliconia laxa* (Heliconiaceae) en un bosque pluvial [Tesis de pregrado]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia; 1992. 91 p.
- Kress WJ. Systematics of Central American *Heliconia* (Heliconiaceae) with Pendant inflorescences. *J Arnold Arbor*. 1984; 65 (4): 429-532.
- Wagner WL, Herbst DR, Sohmer SH. Manual of the flowering plants of Hawaii. rev ed. Bishop Museum special publication Pub. 83. Honolulu, United States: Univ Hawaii and Bishop Museum Press; 1999. 1919 p.
- Atehortúa L, Maza V, Urrea AI. Advances in the introduction into cultivation of two wild species of the genus *Heliconia*. *H. marginata* and *H. platystachys*. Ecology, Phenology and *in vitro* regeneration. *HSI Bull*. 1995; 7 (3): 7-9.
- NAPRALERT Databasc. *Heliconia curtispatha* [Internet]. Chicago, USA: University of Illinois at Chicago; 2008. [citado: 2009 Mar 10]. Disponible en: <http://www.napralert.org/>.
- Otero R, Fonnegra R, Jiménez S. Plantas utilizadas contra mordedura de serpientes en Antioquia y Chocó. Medellín, Colombia: Grandacolor; 2000. 402 p.
- Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Núñez V, Evans N, *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: traditional use of plants. *J Ethnopharmacol*. 2000 Aug; 71 (3): 493-504.
- Otero R, Núñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol*. 2000 Aug; 71 (3): 505-511.
- Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, *et al.* Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol*. 2000 Nov; 73 (1-2): 233-241.
- Núñez V, Otero R, Barona J, Saldarriaga M, Osorio RG, *et al.* Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Jul; 37 (7): 969-277.
- Loaiza AM, Villegas JH. Adaptación de las técnicas de micropropagación clonal in-vitro de ave del Paraíso *Strelitzia reginae* y el platanillo *Heliconia psittacorum* Propagación *in vitro* de *H. psittacorum* y *Strelitzia reginae* [Tesis de pregrado]. [Rionegro, Colombia]: Universidad Católica de Oriente; 1991. 77 p.
- Mora BE. Regeneración de *Heliconia wagneriana* mediante el cultivo *in vitro* de ápice terminal de la inflorescencia [Tesis de pregrado]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia; 1995. 115 p.
- Urrea AI. Cultivo *in vitro* de dos especies de *Heliconia latispatha* y *H. wagneriana* para conservación del germoplasma [Tesis de pregrado]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia; 1992. 88 p.
- Nathan MJ, Goñi CJ, Kumar PP. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud cultura. *Hort Sci*. 1992 May; 27 (5): 450-452.
- Nathan MJ, Kumar PP, Goh CJ. High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum*. *Plant Sci*. 1993 Jan; 90 (1): 63-71.
- Goh C, Nathan M, Kumar P. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. *Sci Hortic*. 1995 Apr; 62 (1-2): 113-120.
- Shiau YJ, Hseu SH, Wang TY, Tsay HS. Studies on tissue culture of *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa' I. Identification and control of bacterial contamination of explants cultured. *J Agric Res China*. 1998; 47 (4): 346-363.
- Shiau YJ, Wang TY, Tsay HS. Studies on tissue culture of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa III. Effect of cefotaxime and plant growth regulators on growth of shoot tip explants *in vitro*. *J Agric Res China*. 1999; 48 (4): 42-51.
- Kini RM (Editor). *Venom Phospholipase A₂ Enzymes*. Chichester: Wiley; 1997. Gowda TV. Interaction of snake venom phospholipases A₂ with plant isolates; p. 205-221.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*. 1962 Jul; 15 (3): 473-479.
- Machado P, Agramante D, Almanza N, Diaz D, Gómez L. Micropropagación "in vitro" de la *Gerbera Jamesonii* H Bolus. *Biocología vegetal*. 2002 Jul-Sep; 2 (3): 169-178.
- Olivera Z, Gutiérrez A, Gutiérrez J, Rodríguez M. Cultivo "in vitro" de *Gerbera* (*Gerbera Jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernaderos. *BIOAGRO*. 2000; 12 (3): 75-80.
- Marulanda ML, Isaza L. Establecimiento "in vitro" de Heliconias con fines de producción masiva. *Sci Tech*. 2004 Dic; 10 (26): 193-198.
- Gutiérrez LF, Perca M, Torres O. Regeneración de *Borjoia patinoi* mediante cultivo *in vitro* de ápices caulinares. *ACECIV Boletín Científico*. 1990; 2 (3): 23-41.
- Zeng SJ, Guo SC, Wu KL, Zhang YQ, Chen GH, Duan J. *In vitro* propagation of *Heliconia* plants. *J Trop Subtrop Bot*. 2004 Jun; 12 (2): 153-158.
- Diniz JD, Gomés SO, Innecco R, Almeida JL, Costa JT. Evaluation of the apical dominante break and the BAP actions on *in vitro* multiplication of *Heliconia stricta* Huber. *Rev Cienc Agron*. 2004; 35 (Número especial): 232-237.
- Martínez L. Desarrollo y estandarización de protocolo para el cultivo *in vitro* de gallito (*Heliconia psittacorum* L). *Notas de Investigación en proceso*. 2009 Feb; 13 (3): 1-8.
- Sosa FM, Ortiz RS, Hernández RP, Armas PM, Guillen DS. Propagación *in vitro* de *Heliconia standleyi* Macbride en Cuba. *Rev Chapingo. Serie horticultura* 2009 Ene - Abr; 15 (2): 17-23.
- Alarcón JC, Martínez D, Quintana JC, Jiménez S, Díaz A, Jiménez I. Propagación *in vitro* de *Renealmia alpinia* (Rottb), planta con actividad antiofídica. *Vitae*. 2008 Ene-Abr; 15 (1): 61-69.
- Pérez JN. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología (Editor). Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas; 1998. Orellana P. Introducción a la propagación masiva; p. 125-132.
- Albany N, Vilchez J, León de Sierralta S, Molina M, Chacín P. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. *Rev. Fac. Agron*. 2006 Abr-Jun; 23 (2) 213-222.