

Propagación *in vitro* de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción

Propagation *in vitro* of *Espeletia paipana* S. Díaz and Pedraza, a critically endangered endemic frailejon

María A. Bohórquez-Quintero^{1, 2}, Eyda J. Araque-Barrera^{1, 3}, José C. Pacheco-Maldonado^{1, 4}

Resumen

En la presente investigación se estableció un protocolo de micropropagación para *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, especie en peligro de extinción con una población actual de 26 plantas adultas. Los explantes primarios (semillas) fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio (NaOCl) o hipoclorito de calcio [Ca(ClO)₂]. Los embriones asépticos se cultivaron en medio MS con macroelementos a diferentes concentraciones, con y sin ácido giberélico (GA₃), kinetina (KIN) y 3-ácido indolbutírico (AIB), también se estudió el efecto de luz y temperatura sobre la germinación; para la multiplicación de brotes se utilizó MS suplementado con AIB y bencil amino purina (BA). Para el enraizamiento se probó AIB+BA, AIB y ácido naftalenacético (ANA) y para el endurecimiento de plántulas se ensayaron diferentes mezclas de capote, tierra y arena. Los resultados mostraron que el mayor porcentaje de embriones asépticos (66%) se obtuvo utilizando 1% de Ca(ClO)₂. El mayor porcentaje de embriones germinados (50%) se registró en medio basal MS/4 suplementado con 1 mg l⁻¹ de GA₃ y la mayor cantidad de embriones reactivos y de plántulas viables se obtuvo a 24 °C e iluminación continua. Los mejores resultados de proliferación de brotes se cuantificaron en MS con 0,5 mg l⁻¹ AIB + 0,05 mg l⁻¹ de BA, mientras que el 85% de enraizamiento se logró en MS con 5 mg l⁻¹ de AIB. El mayor porcentaje de plántulas viables (65%) en invernadero se cuantificó utilizando una mezcla de capote y tierra, proporción 3:1. El protocolo establecido es aplicable para desarrollar programas de propagación masiva que permitan evitar la extinción de *E. paipana*.

Palabras clave: Asteraceae, conservación, germinación, micropropagación, páramos, reguladores de crecimiento

Abstract

In this study we established a micropropagation protocol for *Espeletia paipana* S. Díaz and Pedraza, a critically endangered species with a current population size of 26 adult plants. The primary explants (seeds) used were superficially disinfected with sodium or calcium hypochlorite. The aseptic embryos were cultured on MS media with macroelements at different concentrations, with and without gibberellic acid (GA₃), kinetin (KIN), and indole-3-butyric acid (IBA). The effects of temperature and light on germination also were examined. For multiplying shoots, we used MS supplemented with IBA and benzylaminopurine (BA). Shoot rooting was attempted by using IBA + BA, IBA, and 1-naphthalene acetic acid (NAA), and different mixtures of peat, mulch and sand were tested for hardening of the seedlings. The results showed that the highest percentage (66%) of aseptic embryos was obtained using 1% calcium hypochlorite. The highest percentage (50%) of germinated embryos was registered using the MS/4 supplement with 1 mg l⁻¹ GA₃, and the highest quantity of reactive embryos and viable seedlings were obtained at 24 °C with continual illumination. The best shoot proliferation results were achieved on MS with 0.5 mg l⁻¹ IBA + 0.05 mg l⁻¹ BA, while 85% rooting was achieved on MS with 5 mg l⁻¹ IBA. The highest percentage (65%) of viable seedlings in a growing house was obtained using a mixture of soil enriched with organic matter and mulch in a 3:1 proportion. The proposed protocol may be employed to develop massive propagation programs, which could reverse the trend toward extinction of *E. paipana*.

Key words: Asteraceae, conservation, germination, growth regulators, micropropagation, paramos

Recibido: marzo 2015; aceptado: noviembre 2015.

¹ Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales BIOPLASMA-UPTC. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. A. A. 1094. Tunja (Boyacá), Colombia.

Correos electrónicos: ² <mariadelosangeles.bohorquez@uptc.edu.co>; ³ <eyda.araque@uptc.edu.co>; ⁴ <constantino.pacheco@uptc.edu.co >.

INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los cinco países del mundo con ecosistemas de páramo poseyendo el 98% de la totalidad de los mismos (SOGEOCOL 2003). En el país, Boyacá es el departamento con la mayor extensión, 18,3%, de zonas paramunas (Anónimo 2002). Los páramos colombianos presentan alto grado de amenaza y vulnerabilidad biológica (García y León 2004), con aumento acelerado de la desaparición de especies; como es el caso de *Espeletia paipana* Díaz y Pedraza 2001, considerada especie en peligro de extinción, que solo crece en una zona restringida de Boyacá con probabilidad de extinción en el futuro cercano (López 2004); Sánchez (2004) registró 76 individuos, Morales et al. (2011) 55 y 28 en 2011 y 2012 y, en 2013 se registraron 26 individuos. Los pocos individuos que han alcanzado mayor desarrollo ya no crecen ni prosperan debido al debilitamiento de los tallos causado por la fricción del ganado (caprino y bovino), a la presencia de roedores en la necromasa, así como insectos y larvas que depredan los capítulos florales (Calderón et al. 2005, Morales et al. 2011a).

La pérdida acelerada de recursos genéticos vegetales ha urgido el desarrollo de nuevos métodos de conservación *ex situ*; algunos de estos nuevos procedimientos son biotecnologías que permiten la conservación de germoplasma vegetal. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ofrece alternativas para la conservación de la diversidad biológica, permitiendo, por ejemplo, la multiplicación de especies en peligro de extinción, que presentan poblaciones extremadamente pequeñas o con limitaciones para su reproducción (Bramwell 1990).

Con el fin de contribuir tanto a la recuperación como a la conservación de especies en peligro de extinción, el propósito de esta investigación fue establecer un procedimiento que facilite la micropropagación de *E. paipana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. La población de *E. paipana*, objeto de este trabajo, está localizada en el Parque Natural Municipal "Ranchería" en Paipa, Boyacá, sector La Cuchilla (5° 5' 09,7" N, 73° 08' 38,2" O), ocupa alrededor de 657 ha a una altura entre 3.200 y 3.600 m (Morales et al. 2011, Sánchez y Cely 2003). Para obtener el material vegetal, en el transcurso de un año (diciembre 2011-diciembre 2012) se realizaron siete recolectas de capítulos florales de los cuales en el laboratorio, con pinzas de punta fina, se

extrajeron los achenios; posteriormente, al estereoscopio, se seleccionaron aquellos que contenían embrión.

Además, utilizando cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (**TTC**) (Vázquez et al. 1997), se realizaron pruebas de viabilidad a lotes de 120, 80 y 100 embriones extraídos de achenios recién recolectados (en diciembre, septiembre y noviembre, respectivamente), así como a 300 embriones no reactivos después de 30 días de cultivo *in vitro* en medio de germinación.

Etapas de establecimiento. Los achenios con embrión se separaron en dos grupos: uno desinfectado directamente para escarificar y luego extraer los embriones; el otro escarificado, para obtener los embriones y luego desinfectarlos. De los embriones asépticos se seleccionaron aquellos que no presentaban heridas y se encontraban intactos de color ámbar y con cotiledones turgentes.

La asepsia de achenios y embriones se ensayó utilizando hipoclorito de sodio (NaOCl de 5,25% p/v) al 1% (v/v) por 2 y 3 min y al 3% (v/v) por 10 min e hipoclorito de calcio [Ca(ClO)₂] al 1% (p/v) y al 0,5% (p/v) por 5 min. La asepsia se realizó en cámara de flujo laminar y los achenios y embriones (50 unidades por tratamiento) se manipularon en lotes de no más de 20, contenidos en bolsas de muselina estériles.

Para la germinación de embriones se utilizó el medio basal (**MS**) (Murashige y Skoog 1962); el pH en todos los medios empleados se ajustó a 5,7 con HCl y/o NaOH 1N, luego se utilizó el autoclave para su esterilización a 15 psi y 121 °C durante 20 min. Los embriones cultivados se incubaron a 24 ± 1 °C con fotoperiodo de 16/8 h (iluminación de 70-80 μmol m⁻² s⁻¹).

De la recolecta de diciembre 2011, los embriones seleccionados se cultivaron durante 30 días en MS suplementado con 0,01, 0,05, 0,1 y 0,2 mg l⁻¹ de 3-ácido indolbutírico (**AIB**); en MS, MS/2 y MS/4 sin reguladores de crecimiento o suplementados con ácido giberélico (**GA₃**) y kinetina (**KIN**) en concentraciones de 1, 3 y 5 mg l⁻¹, adicionadas a los medios individualmente o combinadas. En cada medio ensayado se cultivaron 20 embriones. En esta etapa se evaluó durante 30 días el efecto de: **i**) la composición del medio de cultivo; **ii**) fotoperiodo de 16/8 h, e iluminación y oscuridad continuas; **iii**) diferentes temperaturas: 4 y 24 °C continuos, 4 y 24 °C de forma alternada cada 12 h. En esta etapa se evaluó: reactividad de embriones, contaminación por hongos y bacterias, viabilidad y apariencia de plántulas desarrolladas.

El medio en el que se cuantificó el mayor porcentaje de germinación fue utilizado para el cultivo de los embriones obtenidos en las recolectas posteriores.

Etapas de multiplicación de brotes axilares. Con el fin de producir brotes suficientes para los ensayos de proliferación, las pocas plántulas obtenidas en la fase anterior se cultivaron durante tres meses en el medio propuesto por Rache y Pacheco (2009) para *Espeletopsis muiska* [MS + 2,46 μM de AIB + 0,004 μM de bencil amino purina (BA)]. Posteriormente, los brotes obtenidos se cultivaron durante 30 días en MS suplementado con 0,1, 0,2, 0,5, 2 y 3 mg l^{-1} de AIB, adicionados a los medios individualmente o combinados con 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 y 0,2 mg l^{-1} de BA. En cada medio se cultivaron 50 brotes en recipientes de 200 ml con 20 ml de medio y se determinó: tasa de proliferación, apariencia y longitudes de brotes y tallo principal, hábito de crecimiento y formación de callo basal. Se determinó la combinación hormonal más adecuada para multiplicación de brotes y se utilizó para el mantenimiento de cadenas proliferativas subcultivándolas cada 30 días. La tasa de proliferación (TP) se estimó mediante la relación $\text{TP} = (\text{Bi} - \text{B}_0) / \text{B}_0$ (B_0 = brotes iniciales y Bi = brotes individualizables) a través de nueve subcultivos consecutivos.

Enraizamiento de brotes. Al final de cada subcultivo se seleccionaron brotes de longitud ≥ 2 cm y se cultivaron durante 60 días en MS sin reguladores, MS suplementado con: 0,5, 1, 1,5, 2,0, 3,0 y 5,0 mg l^{-1} de AIB o, con 0,1, 0,3 y 0,5 mg l^{-1} de ácido naftalenacético (ANA). En esta etapa se determinó: porcentaje de brotes enraizados, número y longitud de raíces y formación de callo basal en los brotes.

Endurecimiento de plántulas. Durante la fase de endurecimiento se realizaron dos ensayos: *Ensayo I*: según el protocolo establecido por Rache y Pacheco (2009), los brotes enraizados se extrajeron de los recipientes de cultivo, las raíces se enjuagaron con agua corriente para eliminar el agar y, posteriormente, se transfirieron a vasos plásticos de 100 ml. Los sustratos utilizados fueron mezclas de capote (mantillo de bosque), turba y tierra. Los vasos se colocaron en recipientes de vidrio de 50 x 30 x 10 cm cerrados con plástico extensible y se mantuvieron en cuarto de incubación (23 °C, luz continua y 97% de humedad relativa) durante 30 días, con un riego diario por aspersión manual. Luego se trasladaron a invernadero y, de forma progresiva, durante 15 días, se disminuyó la humedad eliminando la cubierta de plástico. En el invernadero el riego de las plántulas también se realizó cada 24 h por aspersión manual.

Para el *Ensayo II*, la tapa de aluminio de los recipientes con brotes enraizados se reemplazó por una tapa de plástico extensible; progresivamente, durante diez días, la tapa plástica se perforó hasta un 70% de su área total. Luego, las plántulas se extrajeron de los recipientes, sus raíces se enjuagaron con agua corriente y se transfirieron a bandejas de poliestireno de 21 x 20 x 4 cm con una mezcla de capote:tierra (3:1). Cada bandeja se colocó en una cubeta plástica de 34 x 29 x 13 cm y se cubrió con plástico extensible perforado 70% de su superficie; las cubetas se mantuvieron 30 días en cuarto de incubación y 30 días en invernadero, con un riego diario por aspersión manual; finalmente, las plántulas se transfirieron a macetas plásticas individuales con el mismo sustrato utilizado en las bandejas y se mantuvieron en invernadero.

Análisis de datos. Los datos obtenidos se procesaron mediante el programa Statgraphics plus 5.1. Se realizaron análisis de varianza univariado (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD). Además, para analizar el comportamiento multivariable de los datos obtenidos en las etapas de proliferación y enraizamiento se realizó un análisis de componentes principales (ACP).

RESULTADOS

Material vegetal. A través del año de estudio se observó que solo 14 de las 26 plantas existentes desarrollaron inflorescencias; de estas se recolectaron 290 capítulos de los cuales se extrajeron 10.427 aquenios y se recuperaron 7.223 embriones; finalmente, se seleccionaron 4.370 embriones aptos para cultivo *in vitro* (tabla 1). El número de embriones seleccionados solo alcanzó el 60,5% del total de embriones extraídos; el 39,5% restante se consideró como embriones no funcionales, deshidratados, con tejidos necróticos o colonizados por hongos o larvas de insectos (figura 1A).

En las pruebas con TTC se estimó una viabilidad promedio de 29% (62,50, 1,00 y 23,75%) en los tres lotes de embriones de aquenios recién recolectados; mientras que en embriones no reactivos (77%) después de 30 días del cultivo *in vitro* la viabilidad fue nula.

Establecimiento de cultivos *in vitro*. *Asepsia superficial de aquenios y embriones.* Los porcentajes de embriones asépticos recuperados después de aplicados los tratamientos de asepsia, así como los porcentajes de embriones reactivos cuantificados en los medios de germinación no dependieron de

Tabla 1. Capítulos recolectados y respuesta germinativa *in vitro* de embriones de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza (* = ausencia de capítulos con flores en antesis; # cap rec = número de capítulos recolectados; \bar{X} cap = promedio de capítulos; # ext = número de extraídos)

Colecciones (meses)	Aqueños			# de embriones			# de plántulas
	# cap rec	\bar{X} cap	# ext	extraídos	cultivados	reactivos	viables
Diciembre	73	45,78	3.342	1.916	1.160	433	90
Febrero*	—	—	—	—	—	—	—
Marzo	15	31,78	477	235	220	0	0
Mayo	6	60,17	361	167	96	5	5
Julio	22	58,55	12.88	1.050	985	0	0
Septiembre	113	22,16	2.504	1.638	1.124	2	2
Noviembre	61	40,26	2.455	2.217	785	241	45
Total	290	258,68	10.427	7.223	4.370	681	142

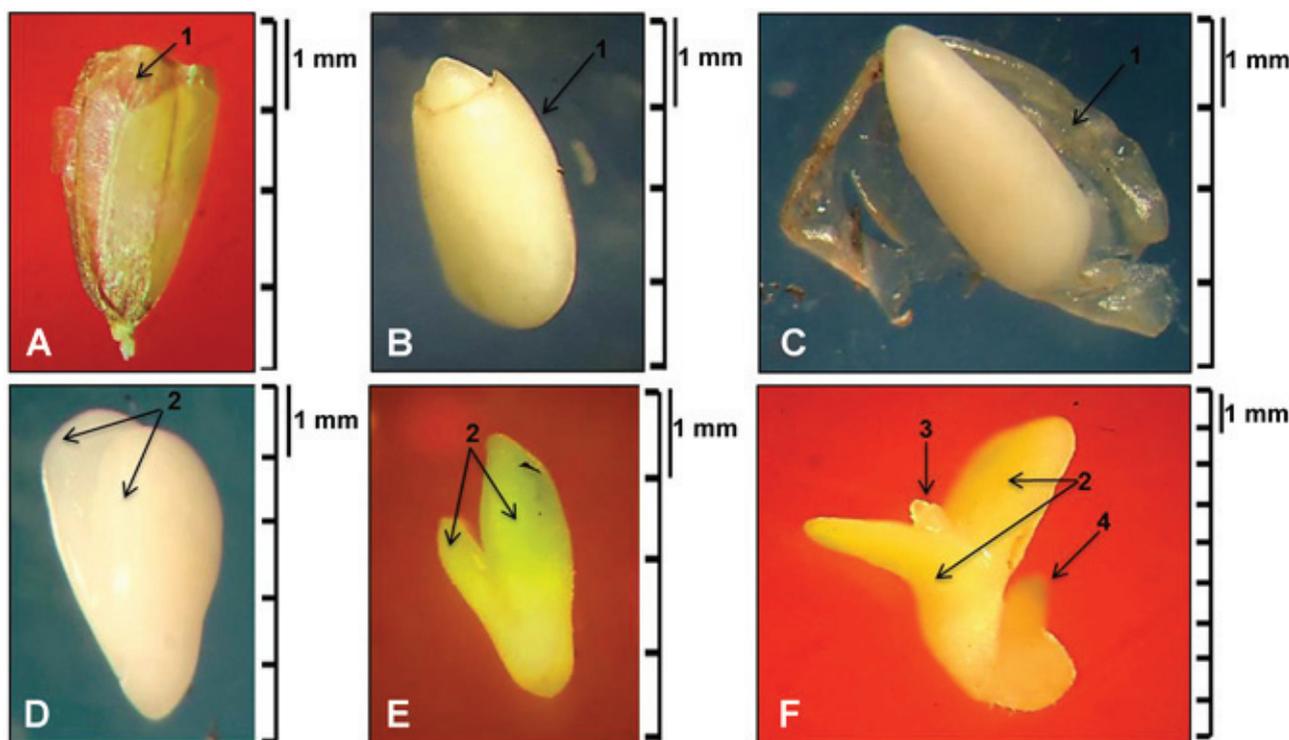


Figura 1. Embriones de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza. A. No viable; B. Con cubierta seminal; C. Desprovisto de cubierta seminal; D. Con cotiledones distinguibles; E. Germinando, con cotiledones clorofílicos; F. En proceso de crecimiento y desarrollo: 1. Cubierta seminal; 2. Cotiledones; 3. Primordio foliar en desarrollo; 4. Radícula

si se desinfectaron aqúenos o embriones (tabla 2); por tanto, el contacto directo del hipoclorito con los tejidos del embrión no afectó su viabilidad. El mayor porcentaje de embriones superficialmente asépticos (66%) y reactivos (50%) se cuantificó aplicando $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 1% durante 5 min (tabla 2).

Germinación de embriones. Después de 30 días de cultivo en los medios de germinación, de 1.160 embriones seleccionados para cultivo *in vitro*, 433 fueron reactivos y presentaron elongación, hinchamiento o expansión cotiledonar, escasa emergencia radicular y elongación hipocotiledonar, así como una incipiente actividad de la yema apical y baja actividad clorofílica. Solo 90 embriones desarrollaron plántulas viables (tabla 1, figura 1A-F), cuantificación consistente con los datos de las pruebas de viabilidad con TTC.

En embriones recién recolectados, el mayor porcentaje de viabilidad esperado, 62,5% (de acuerdo a la prueba con TTC, diciembre 2011), y a 30 días de cultivo, 37,3% (433 embriones, diciembre 2011) (tabla 1), permiten establecer que los capítulos recolectados en diciembre contienen mayor número de embriones reactivos con capacidad para germinar. Sin embargo, el porcentaje de viabilidad a 30 días de cultivo difiere del porcentaje de viabilidad estimado, evidenciándose una pérdida de viabilidad de un 50% de los embriones obtenidos y cultivados *in vitro*.

Comparando el efecto del medio de cultivo sobre la germinación de embriones, de un total de 52 tratamientos

ensayados, solo en los 23 registrados en la figura 2 se observó reactivación de embriones; en los 29 restantes, los embriones cultivados apenas cambiaron su coloración tornándose más blanquecina. Además, los resultados cuantificados a 30 días de cultivo, mostraron que la reducción de macroelementos del MS basal favoreció la germinación de embriones, registrándose mayor porcentaje (50%), de embriones germinados en MS/4 suplementado con 1 mg l^{-1} de GA_3 (figura 2).

En condiciones de luz se observaron embriones reactivos (luz continua: 42% y fotoperiodo de 16/8 h: 20%) sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los embriones mantenidos en oscuridad (44% embriones reactivos y 44% plántulas viables) y/o mantenidos con iluminación continua (42% embriones reactivos y 34% de plántulas viables), pero si se observaron diferencias morfológicas tanto entre embriones reactivos como entre las plántulas desarrolladas (figura 3). Los embriones desarrollados en ausencia de luz tendieron a presentar menor contaminación y se caracterizaron por su coloración blanquecina (casi hialina), elongación acusada de los cotiledones, hojas y radícula (figura 3 A-C), presentando una apariencia propia de estructuras etioladas. La etiolación redujo la incidencia de necrosis y oxidación de embriones, efecto contrario al observado en los embriones germinados en condiciones de luz, de aspecto clorofílico, en los cuales se registraron pérdidas causadas por oxidación de tejidos (figura 3 F) después de 15 días de cultivo.

Tabla 2. Porcentaje de embriones asépticos y reactivos de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza después de la acción desinfectante del hipoclorito de sodio (NaOCl) y calcio [$\text{Ca}(\text{ClO})_2$] (* = unidades por tratamiento: 50)

Explantos	Agente desinfectante	Concentración (%)	Tiempo (min)	% de embriones	
				asépticos	reactivos
Aqúenos	NaOCl	1,0	2	50	51
		1,0	3	52	49
		3,0	10	65	46
	$\text{Ca}(\text{ClO})_2$	1,0	5	58	48
		0,5	5	51	48
Embriones	NaOCl	1,0	2	58	45
		1,0	3	62	40
		3,0	10	68	43
	$\text{Ca}(\text{ClO})_2$	1,0	5	66	50
		0,5	5	53	52

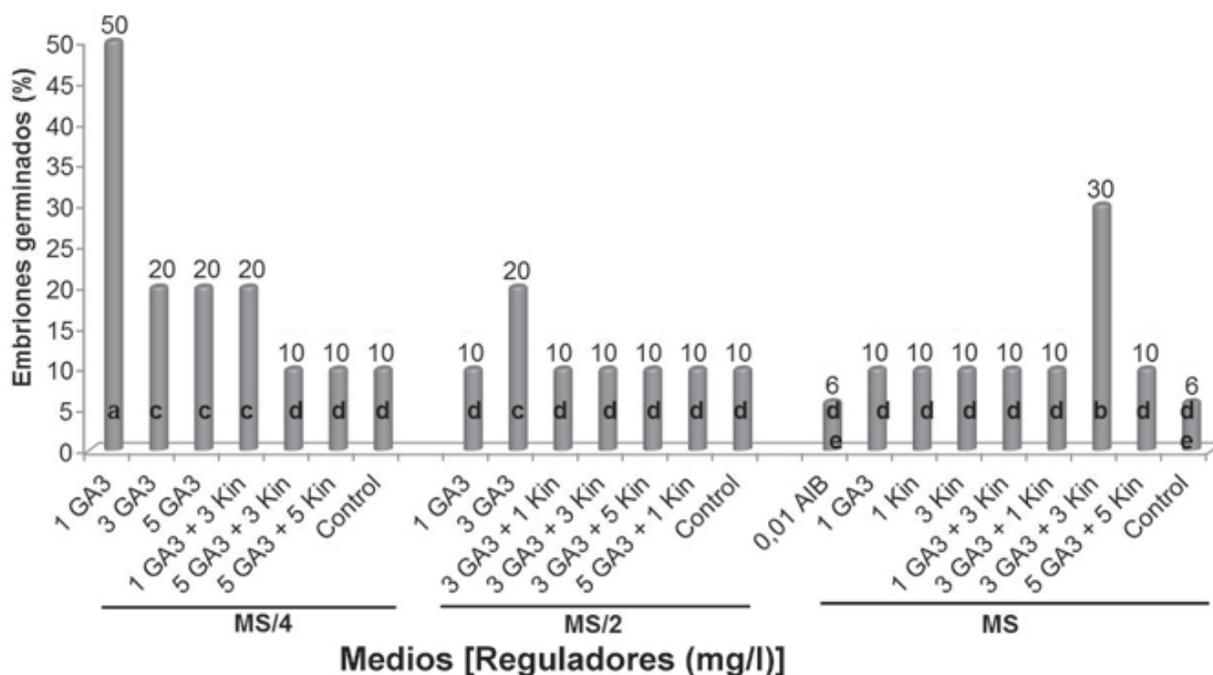


Figura 2. Embriones de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza germinados en diferentes medios de cultivo [letras distintas entre barras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) ($P \leq 0,05$)]

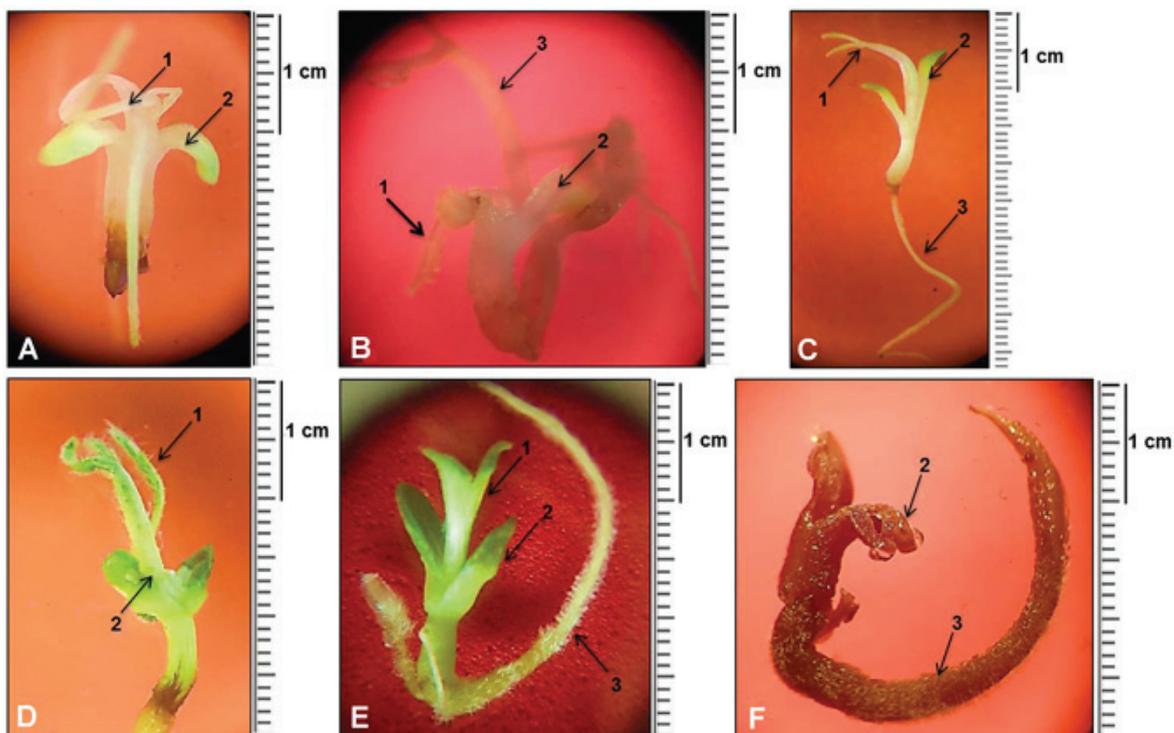


Figura 3. Embriones de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza germinados en condiciones de luz y oscuridad a 30 días de cultivo. A, B y C. Oscuridad continua; D y E. Iluminación continua; F. Plántula fenolizada: 1. Hojas; 2. Cotiledones; 3. Radicula

En el tratamiento incubado a 24 °C se cuantificaron las mejores respuestas, 42% de embriones reactivos y 34% de plántulas viables, marcando diferencias significativas con los tratamientos realizados a las otras temperaturas ensayadas, 4 °C continua: 4% de embriones reactivos y 0% plántulas viables y, 4 °C por 12 h/24 °C por 12 h: 0% tanto de embriones reactivos como de plántulas viables.

Multiplicación de brotes axilares. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos en todos los parámetros estudiados en esta etapa. El análisis ACP para correlacionar los datos de número de brotes/explante, longitud de brotes neoformados, longitud de tallo principal, brotes con hojas dispuestas en roseta, brotes con hojas alternas y formación de callo basal, permitió establecer que el tratamiento siete (figura 4), MS suplementado con 0,5 mg l⁻¹ de AIB + 0,05 mg l⁻¹ de BA, fue el más adecuado tanto para inducción de nuevas yemas axilares como para promover el crecimiento y desarrollo de brotes (figura 5). Aunque en los tratamientos ocho y nueve se cuantificó el mayor número de brotes/explante, se observó formación de callo basal (en 12-13% de brotes) (figura 4 y 5).

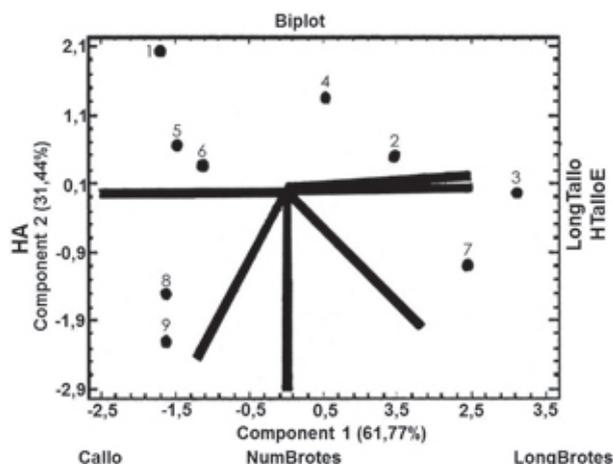


Figura 4. Análisis de componentes principales para proliferación *in vitro* de brotes de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza cultivados en medio basal (MS) (los números indican los tratamientos de proliferación y entre paréntesis se indican los reguladores en mg l⁻¹: 1. MS (testigo); 2. 3-ácido indolbutírico (AIB); 3. AIB (3); 4. AIB (0,2); 5. AIB (0,1) + bencil amino purina (BA; 0,02); 6. AIB (0,5) + BA (0,01); 7. AIB (0,5) + BA (0,05); 8. AIB (0,5) + BA (0,1); 9. AIB (0,5) + BA (0,2)

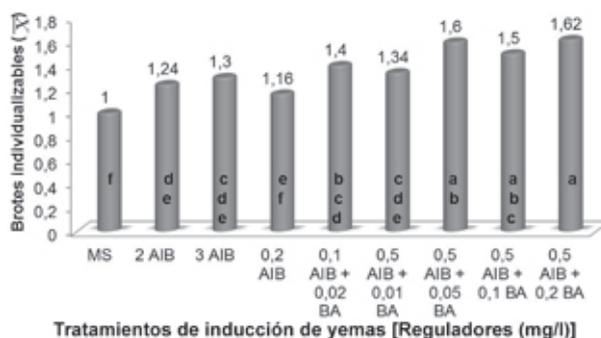


Figura 5. Promedio de brotes individualizables de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza por explantes producidos en medio basal (MS) suplementado con 3-ácido indolbutírico (AIB) solo o combinado con bencil amino purina (BA) [letras distintas entre barras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) ($P \leq 0,05$)]

En los medios suplementados con 3 mg l⁻¹ de AIB o con 0,5 mg l⁻¹ de AIB + 0,05 mg l⁻¹ de BA, tanto los tallos principales de los brotes en proliferación como de los nuevos brotes desarrollados alcanzaron sus mayores longitudes, 0,478 cm y 0,41 cm y, 2,56 cm y 2,60 cm, respectivamente. Además, la longitud total de los brotes disminuyó progresivamente cuando se redujeron las concentraciones de la auxina y la citoquinina, cuantificándose la menor longitud (1,09 cm) en los brotes cultivados en MS libre de reguladores (tabla 3).

Tabla 3. Longitud de tallo principal y de brotes individualizables cuantificada en explantes de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza en el medio basal (MS) en presencia de 3-ácido indolbutírico (AIB) y bencil amino purina (BA), al cabo de 30 días de cultivo [promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) ($P \leq 0,05$)]

Reguladores (mg l ⁻¹)		Longitud (cm)	
AIB	BA	brotes	tallo
0,2	—	1,38 ± 0,19 ^e	0,328 ± 0,17 ^c
2,0	—	2,10 ± 0,26 ^b	0,364 ± 0,20 ^{b, c}
3,0	—	2,56 ± 0,17 ^a	0,478 ± 0,18 ^a
0,1	0,02	1,16 ± 0,22 ^f	0,146 ± 0,05 ^d
0,5	0,01	1,74 ± 0,32 ^d	0,134 ± 0,04 ^d
0,5	0,05	2,60 ± 0,59 ^a	0,410 ± 0,19 ^b
0,5	0,10	1,90 ± 0,38 ^c	0,107 ± 0,02 ^d
0,5	0,20	2,05 ± 0,28 ^b	0,100 ± 0,00 ^d
Control		1,09 ± 0,20 ^f	0,100 ± 0,00 ^d

Los brotes con aspecto de roseta presentaron tallos muy cortos, mientras que los de aspecto elongado se caracterizaron por tallos más largos y hojas alternas (figura 6). Los porcentajes promedio de brotes en roseta presentaron diferencias estadísticamente significativas con los porcentajes de brotes con hojas alternas, siendo evidente que en la mayoría de los tratamientos los nuevos brotes desarrollados únicamente presentaron aspecto en roseta; en los demás tratamientos se observó que los brotes en proliferación desarrollaron simultáneamente brotes en roseta y brotes con hojas alternas (figura 6 A-D). Además, el desarrollo de brotes con hojas pubescentes fue notoriamente mayor en brotes en roseta que en brotes con hojas alternas en los que, también, se observó un crecimiento y desarrollo de hojas más lento.

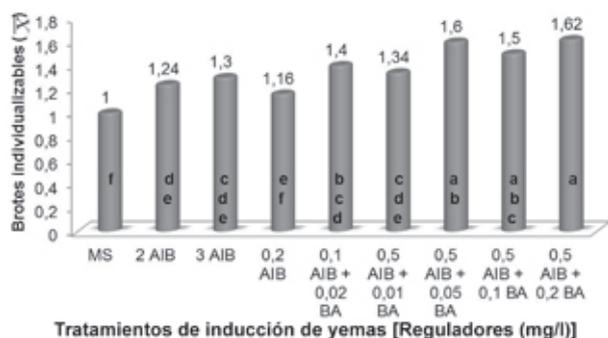


Figura 6. Brotes de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza en fase de proliferación. A. Explante con brotes axilares; B. Brote de aspecto en roseta; C. Brote de aspecto elongado; D. Explante con brotes de aspecto en roseta y aspecto elongado (* = callo basal)

En el medio MS con 0,5 mg l⁻¹ de AIB + 0,05 mg l⁻¹ de BA se cuantificaron tasas variables de proliferación por subcultivo y una tasa acumulada de 1:7 brotes a través de nueve subcultivos consecutivos; se determinó que cada ciclo completo de proliferación comprendió tres subcultivos siendo el intermedio el que presentó una tasa de proliferación más elevada (figura 7).

Enraizamiento de brotes. El análisis de ACP que correlaciona porcentaje de brotes enraizados, número de raíces/brote, longitud mínima y máxima de raíces y frecuencia de formación de callo basal, permitió establecer que el medio más adecuado para enraizamiento fue MS suplementado con 5 mg l⁻¹ de AIB (figura 8.5), seguido de los tratamientos suplementados con 0,3 y 0,5 mg l⁻¹ de ANA (figura 8.7, 8.8); en estos últimos tratamientos los brotes formaron callo basal y el número de raíces/brote disminuyó.

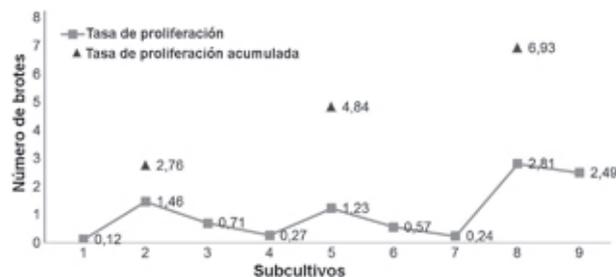


Figura 7. Tasa de proliferación de brotes de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza mantenidos en cadenas proliferativas con subcultivos cada 30 días en medio basal (MS) suplementado con AIB y BA [MS + 0,5 mg l⁻¹ de 3-ácido indolbutírico (AIB) + 0,05 mg l⁻¹ de bencil amino purina (BA)]

El mayor porcentaje (85%), de brotes enraizados se registró en el medio suplementado con 5 mg l⁻¹ de AIB, aunque estadísticamente esta respuesta fue similar a la obtenida en los tratamientos con 3 mg l⁻¹ de AIB y 0,3 mg l⁻¹ de ANA (tabla 4). En cuanto a número de raíces/brote (tabla 3), en los medios suplementados con 5 mg l⁻¹ de AIB o 0,5 mg l⁻¹ de ANA se registraron los promedios más altos (grupo a).

Después de 30 días de cultivo, entre los datos de enraizamiento registrados en los medios suplementados con 2, 3 ó 5 mg l⁻¹ de AIB y con 0,1, 0,3 ó 0,5 mg l⁻¹ de ANA no se presentaron diferencias estadísticamente significativas y se registraron longitudes máximas de raíz muy semejantes, aunque en presencia de ANA son mayores. Sin embargo, las longitudes mínimas de las raíces desarrolladas en los tratamientos con AIB son mayores que las alcanzadas en los tratamientos con ANA (tabla 4). Las raíces desarrolladas en presencia de AIB fueron delgadas y más largas (figura 9 A-C), en contraste con las que se desarrollaron en presencia de ANA las cuales, además, presentaron engrosamiento el cual fue más notorio en aquellas de menor longitud (figura 9 D-F).

Endurecimiento de plántulas. Se observó que todos los brotes enraizados con ANA murieron después de cinco a seis días de su transferencia a sustrato sólido en condiciones de cuarto de incubación. En el Ensayo I, después de 90 días, en las plántulas transferidas del recipiente de enraizamiento directamente a sustrato sólido (figura 10 A, B) se cuantificó 2% de plántulas viables; las demás presentaron necrosis foliar progresiva desde el ápice hasta la base. En el Ensayo II, el cambio de las tapas de aluminio de los recipientes de enraizamiento, por tapas de papel extensible (perforadas gradualmente, durante diez días)

Tabla 4. Efecto del 3-ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y 3-ácido indolbutírico (AIB) + bencil amino purina (BA) sobre el desarrollo radical de brotes de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza cultivados en medio basal (MS) [promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) ($P \leq 0,05$)]

Reguladores	Reguladores [mg l ⁻¹]	% de brotes enraizados	\bar{X} de raíz/brote	Longitud mínima (cm)	Longitud máxima (cm)
AIB	0,5	0 ±0,00 ^f	—	—	—
	1	16 ±0,37 ^e	1 ±0,0 ^e	3,4 ±1,06 ^{d, e}	3,4 ±1,06 ^{b, c}
	1,5	16 ±0,37 ^e	1,5 ±0,53 ^e	1,5 ±0,53 ^e	2,1 ±0,64 ^c
	2	49,2 ±0,50 ^d	4,29 ±2,17 ^{d, e}	6 ±3,57 ^{b, c}	11,5 ±4,93 ^a
	3	76,7 ±0,42 ^{a, b}	5,33 ±3,41 ^d	8,1 ±4,35 ^a	13 ±5,56 ^a
ANA	0,1	60,5 ±0,49 ^{c, d}	5,91 ±4,53 ^{c, d}	3,5 ±2,46 ^{d, e}	11,6 ±7,08 ^a
	0,3	75,4 ±0,43 ^{a, b, c}	7,52 ±6,19 ^{b, c}	3,7 ±2,65 ^{d, e}	12,6 ±6,84 ^a
	0,5	63,6 ±0,48 ^{b, c}	8,98 ±5,6 ^{a, b}	4,4 ±2,35 ^{c, d}	13,8 ±6,64 ^a
AIB + BA	0,5+0,05	10 ±0,30 ^f	1,67 ±1,21 ^{d, e}	9,2 ±5,41 ^a	9,3 ±6,28 ^{a, b}
MS		0 ±0,00 ^f	—	—	—

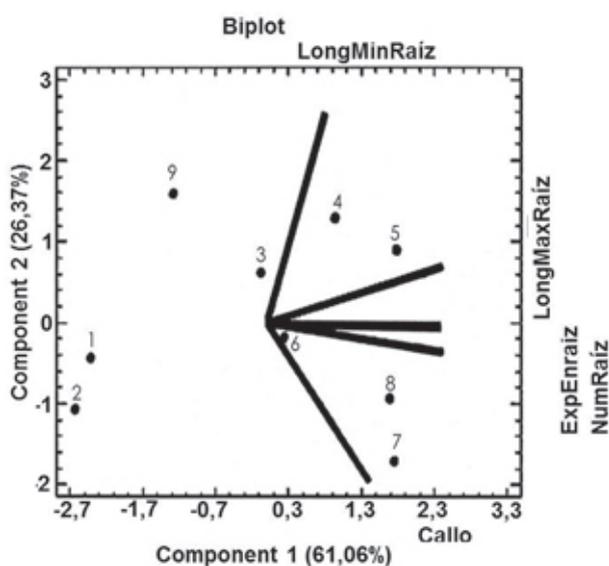


Figura 8. Análisis de componentes principales para los datos de enraizamiento *in vitro* de brotes de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza cultivados en medio basal (MS) (los números indican los tratamientos de enraizamiento y entre paréntesis se indica la concentración de los reguladores en mg l⁻¹: 1. 3-ácido indolbutírico (AIB; 1); 2. AIB (1,5); 3. AIB (2); 4. AIB (3); 5. AIB (5); 6. ácido naftalenacético (ANA; 0,1); 7. ANA (0,3); 8. ANA (0,5); 9. AIB (0,5) + bencil amino purina (BA; 0,05)

propició un acondicionamiento lento y progresivo de las plántulas a los nuevos niveles de luz, humedad y aireación (figura 10 C).

Después de 30 días de endurecimiento en el cuarto de incubación, se cuantificó un 78% de plántulas viables (figura 10 D) y al cabo de 30 días en invernadero se cuantificó un 65% (figura 10 E, F). Posteriormente, las plántulas transferidas a recipientes individuales en condiciones de invernadero (figura 10 G, H) alcanzaron, en promedio, longitud de 7 cm, 13 hojas (de 3 cm de longitud x 0,5 cm de ancho) color verde oscuro con abundante pubescencia, sistema radical vigoroso (con siete raíces gruesas y 20 raíces más delgadas), raíces de longitud mínima de 9 cm y máxima de 17 cm, y abundantes pelos absorbentes. El tamaño y número de hojas aumentó, notándose un incremento de la pubescencia y una intensificación del color, mientras que el crecimiento caulinar fue lento, casi imperceptible.

DISCUSIÓN

El procedimiento para micropropagación de *E. paipana* puede iniciarse a partir de achenios o de embriones tratados con Ca(ClO)₂, agente desinfectante eficaz para eliminar hongos y bacterias superficiales de los explantes y cuya acción es, según García et al. (2008), menos fitotóxica

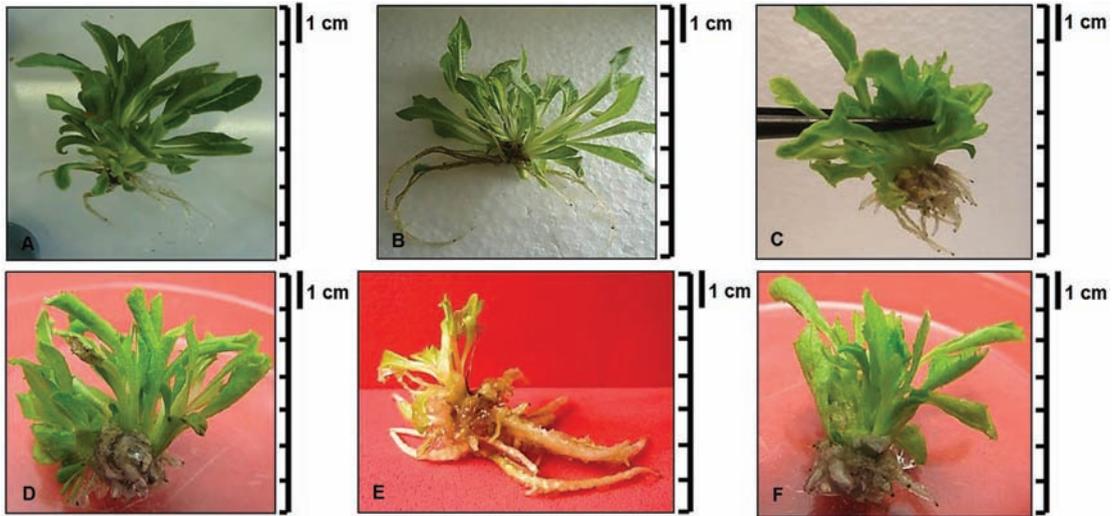


Figura 9. Brotes de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza enraizados. A, B y C. en presencia de 3-ácido indolbutírico (AIB); D, E y F. en presencia de ácido naftalenacético (ANA)

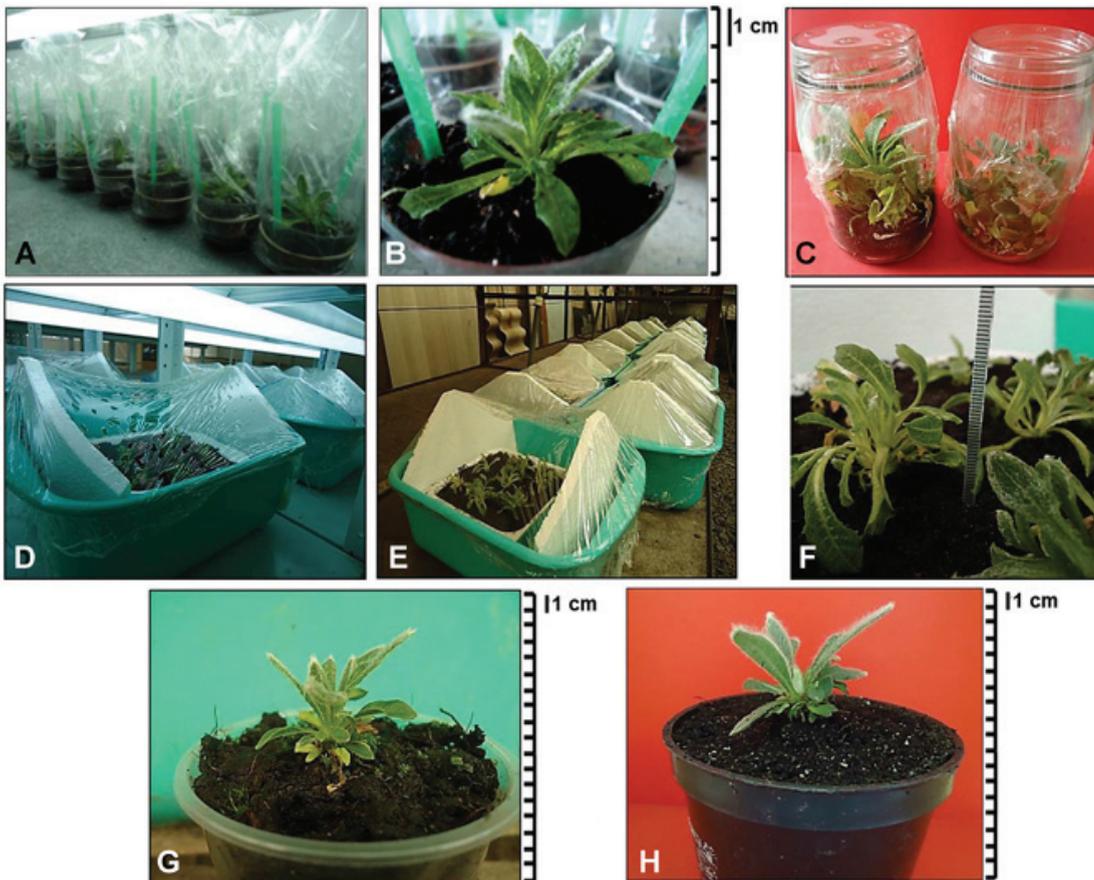


Figura 10. Endurecimiento de plántulas de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza. A y B. Plántulas en sustrato sólido, en cuarto de incubación; C. Plántulas en recipientes con tapa de papel extensible; D y E. Plántulas en bandejas de poliestireno, en cuarto de incubación y en invernadero, respectivamente; F. Plántulas en bandejas, sin cubierta en invernadero; G. Plántula a 60 días en sustrato sólido; H. Plántula en sustrato sólido a 100 días de endurecimiento

que la del NaOCl, tal como lo comprobó García et al. (2008) en semillas de *Oryza sativa* L. y Jaakola et al. (2001) en semillas de *Vaccinium meridionale* Sw. Aunque el hipoclorito utilizado para la desinfección no afectó la viabilidad, la capacidad germinativa de los embriones sí disminuyó; este efecto negativo también se presentó en los ensayos de germinación y latencia de semillas de *Annona cherimola* L. y *Annona muricata* L. (Lobo et al. 2007). Sin embargo, los porcentajes de viabilidad de embriones obtenidos en este trabajo son más elevados que los indicados por Morales et al. (2011), quienes además registraron 89% de aquenios sin embrión y 3% de aquenios viables cuando fueron germinados en invernadero.

Teniendo en cuenta el total de embriones cultivados (1.160), el bajo número de embriones reactivos (433) y el escaso número de embriones germinados (90), es evidente la baja capacidad de germinación que dichos embriones demuestran en condiciones *in vitro*; no obstante, el medio MS/4 suplementado con GA₃ fue el que mejor estimuló tanto la iniciación del proceso germinativo como los procesos morfológicos de los embriones cultivados, observándose que dicha estimulación incrementó a medida que disminuyó la concentración de GA₃ en el medio de cultivo. Por tanto, es evidente que el efecto del GA₃ dependió tanto de la concentración en el medio como de la viabilidad de los embriones, concordando con las observaciones en otras especies como *Theobroma cacao* L. (Cárdenas et al. 2010) y *Jaltomata procumbens* Cav. (Saldívar et al. 2010). A pesar de que algunos pocos embriones de *E. paipana* (6 a 10%), germinaron en los medios MS, MS/2 y MS/4 sin reguladores (controles), la reactividad fue más lenta y el desarrollo y crecimiento de plántulas más retardado en comparación con lo observado en los medios suplementados con GA₃. No obstante, se debe tener en cuenta que el porcentaje de embriones viables es bajo y que dicha viabilidad no puede ser detectada en los embriones a cultivar, lo cual explicaría la semejanza de repuesta germinativa entre la mayoría de los tratamientos realizados (figura 2). Los datos registrados sobre germinación de embriones concuerdan claramente con la reducida capacidad de reproducción natural y supervivencia de plantas de *E. paipana*; al respecto, Arciga (2011) y Arditti (1992, citado en Arciga 2011) señalan que aun cuando se obtengan porcentajes bajos de germinación, estos resultados pueden no ser significativos puesto que a través de cultivo de tejidos, las pocas plántulas obtenidas se pueden propagar rápidamente, asegurando ciertos porcentajes de sobrevivencia puesto que dado los cultivos se realizan en condiciones asépticas en medios establecidos para cada especie.

Las condiciones de luz y temperatura utilizadas afectaron de manera variable la germinación de embriones de *E. paipana*, observándose que el porcentaje de embriones germinados fue mayor bajo luz continua a 24 °C; además, en estas condiciones la apariencia de las estructuras en desarrollo fue normal; estas observaciones son semejantes a las realizadas en *Marchantia polymorpha* L. (Pedroza-Manrique y Caballero 2009), en las que la germinación fue considerablemente superior a mayor temperatura (20-25 °C y máxima de 30 °C).

En algunas especies se ha observado un efecto aditivo entre el tratamiento con frío y el ácido giberélico (Watkinson y Pill 1998) y aunque *E. paipana* es propia de un ecosistema paramuno, en los tratamientos realizados a temperaturas bajas se cuantificaron bajos porcentajes de germinación. Al respecto, Engelmann (1991) indicó que si los explantes cultivados *in vitro* se mantienen a temperaturas bajas durante períodos prolongados, pueden presentarse daños fisiológicos causados por el frío, que inciden en cambios en el metabolismo, en el contenido de proteínas y en la composición y funcionamiento de las membranas celulares.

Durante la etapa de multiplicación de brotes se observó que una característica particular del medio establecido para proliferación es que la relación AIB:BA = 1:10 difiere de las relaciones comúnmente utilizadas para proliferación, pero es semejante a la utilizada para *E. muiska* (Rache y Pacheco 2009). Schumüller (2004) sostiene que mayor concentración de citoquinina respecto a la de auxina debe promover la formación de brotes y que en las plantas superiores estos balances generalmente están presentes, razón por la cual no requieren altas concentraciones de reguladores en el medio para establecimiento y multiplicación *in vitro*; esto último explicaría, en parte, el éxito del medio establecido en la proliferación de brotes de *E. paipana*.

La producción de brotes alcanzada en presencia de la combinación AIB+BA, establecida para proliferación de brotes de *E. paipana*, pone en evidencia su eficacia para estimular tanto la formación de yemas como el crecimiento y desarrollo caulinar; además, la semejanza de las respuestas registradas en los diferentes tratamientos de proliferación, indica alta efectividad del BA aún en bajas concentraciones en el medio de cultivo.

Con relación al enraizamiento de brotes de *E. paipana*, se observó que la presencia de auxinas en el medio es indispensable para estimular el desarrollo radical y, que tanto el ANA como el AIB, son efectivos para este

proceso. Sin embargo, cuando se utilizó ANA, de forma generalizada los brotes formaron callo basal lo cual dificulta el funcionamiento adecuado de las raíces y, además, puede ser causa de inviabilidad de las plántulas durante el proceso de endurecimiento tal como lo proponen Ríos et al. (2005).

Si bien, los brotes de *E. paipana* producidos *in vitro* podrían catalogarse como estructuras de fácil y rápido enraizamiento puesto que activan y ponen en marcha su capacidad rizogénica aún en presencia de bajas concentraciones de auxina, en su ausencia o en dosis limitadas no ocurrió enraizamiento. Esta observación concuerda con los planteamientos de Martínez et al. (2007) y Uribe et al. (2011), quienes indicaron que la aplicación exógena de agentes inductores de enraizamiento, como las auxinas en concentraciones elevadas, favorece la iniciación y desarrollo de raíces. Además, Gutiérrez (1988) sugiere que debe tenerse en cuenta que la facilidad de un brote para desarrollar raíces adventicias, se debe al genotipo de la especie en estudio, condiciones fisiológicas y ambientales, además de algunos factores bioquímicos.

La adición de 5 mg l⁻¹ de AIB al medio permitió obtener no solo los mayores porcentajes de brotes enraizados sino el mayor número de raíces por explante; estos resultados quedan enmarcados dentro de los planteamientos de Saucedo et al. (2008) quienes señalaron que es importante obtener un alto número de raíces, aún de poca longitud, ya que las plántulas obtenidas *in vitro* requieren un buen sistema radical para tener éxito durante el trasplante y transferencia a condiciones de invernadero.

Rache y Pacheco (2009) probaron la acción de AIB en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *E. muiska* y al cabo de 30 días de cultivo, observaron que a medida que se incrementó la concentración de AIB, también aumentó el porcentaje de brotes enraizados y el promedio de raíces por explante, tal como ocurrió en *E. paipana*; mientras que en estudios realizados por Suárez et al. (2006) en *Stevia rebaudiana*, a medida que se aumentó la concentración de AIB en el medio de cultivo la formación de raíces disminuyó.

Por otro lado, los porcentajes de viabilidad de plántulas cuantificados durante la etapa de endurecimiento, indican claramente que la transferencia de brotes enraizados *in vitro* a sustrato sólido en invernadero es uno de los procesos más determinantes para el éxito de la micropropagación de *E. paipana*; téngase en cuenta que el acondicionamiento lento y progresivo a las nuevas condiciones tanto del sustrato

como del ambiente de cultivo, incide drásticamente sobre la adaptación y las respuestas morfofisiológicas de las plántulas. González et al. (2002) consideran el endurecimiento como uno de los pasos críticos en la propagación *in vitro* de plantas debido a que los cambios bruscos que se producen, constituyen causas de estrés y pérdida de plántulas al finalizar la micropropagación.

De manera semejante a lo determinado para *E. paipana*, Rache y Pacheco (2009) enfatizan que la etapa de endurecimiento de vitroplantas de *E. muiska* exige un control minucioso de la temperatura, humedad e iluminación y que debe ser realizado progresivamente; además, indican que las plántulas transferidas de los recipientes de cultivo directamente a condiciones de invernadero no son viables. En frailejones, determinar con precisión las condiciones específicas de endurecimiento es un proceso bastante complejo, en el cual intervienen numerosas variables que seguramente guardan una estrecha relación con las condiciones naturales muy particulares de los ecosistemas paramunos en los que subsisten estas especies.

Los resultados exitosos de enraizamiento de brotes de *E. paipana* obtenidos en este trabajo confirman lo planteado por Fujii et al. (1990) quienes sostienen que la capacidad para obtener *in vitro* plantas con raíces, no es necesariamente un indicador generalizado de crecimiento y desarrollo en condiciones *ex vitro*. Sin embargo, la mezcla de capote-tierra utilizada como sustrato, en conjunto con las demás condiciones tenidas en cuenta durante el endurecimiento favoreció la viabilidad de plántulas de *E. paipana*.

El estudio realizado establece el primer protocolo para propagación *in vitro* de *E. paipana* el cual permite la producción de plántulas a partir de embriones cigóticos en medio MS/4 suplementado con 1 mg l⁻¹ de GA₃. Las plántulas obtenidas se pueden multiplicar a través de cadenas proliferativas mantenidas en MS suplementado con 0,5 mg l⁻¹ de AIB + 0,05 mg l⁻¹ de BA y 85% de los brotes producidos se pueden enraizar en MS suplementado con 5 mg l⁻¹ de AIB, recuperándose, finalmente, 65% de plántulas viables después de la etapa de endurecimiento.

El protocolo establecido es un logro biotecnológico utilizable como alternativa adecuada para contribuir al aumento de la pequeña población de *E. paipana*, puesto que permite la propagación masiva de plántulas con fines de replantación y conservación y, además, constituye la base para adelantar futuros estudios en otras asteráceas paramunas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo expresan su agradecimiento a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (DIN-UPTC), a la Corporación Autónoma Regional de Boyacá (CORPOBOYACÁ) y al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (BIOPLASMA-UPTC), por la financiación aportada para el desarrollo de la investigación. El desarrollo científico estuvo enmarcado en el Convenio Interinstitucional de Cooperación N.º 2011119 (123): “Aplicación de procesos biotecnológicos con fines de restauración, recuperación y/o conservación de ecosistemas de páramo de Boyacá. (I) Micropropagación de *Espeletia paipana*” suscrito entre la UPTC y CORPOBOYACÁ.

REFERENCIAS

- Anónimo. 2002. Programa para el manejo sostenible y restauración de ecosistemas de la alta montaña colombiana: páramos. Bogotá: Ministerio del Medio Ambiente, Dirección General de Ecosistemas. Sin páginas.
- Arciga M. 2011. Germinación *in vitro* de *Guarienthe aurantiaca* Bateman (Orquidaceae). [Tesis pregrado] [Morela Mich.]: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p. 50.
- Arditti J. 1992. Fundamentals of orchid biology. New York: John Wiley. p. 487-488, 504-549, 898. En: Arciga M. 2011. Germinación *in vitro* de *Guarienthe aurantiaca* Bateman (Orquidaceae). [Tesis pregrado] [Morela Mich.]: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p. 50.
- Bramwell D. 1990. The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. En: Hernández B, Clemente M, Heywood V, editores. Techniques in Botanic Gardens. Koenigstein (Germany): Koeltz Scientific Books. p. 3-15.
- Calderón E, Galeano G, García N, editores. 2005. Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 2: Palmas, Frailejones y Zamias. Bogotá (Colombia): Instituto Alexander von Humboldt - Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. p. 454.
- Cárdenas J, Álvarez J, Barragán E, Rivera C. 2010. Efecto del ácido giberélico y la 6-bencilaminopurina sobre el desarrollo de yemas en injertos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Agronomía Colombiana, 28 (1): 19-27.
- Engelmann F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm a review. Euphytica, 57 (3): 227-243.
- Fujii J, Slade D, Olsen R, Ruzin S, Redenbaugh K. 1990. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. Plant Science, 72 (1): 93-100.
- García A, León P. 2004. Zonas de Páramo. Bogotá (Colombia): Congreso de la República de Colombia, Oficina de Asistencia Técnica Legislativa. Estudio de Antecedentes Sobre el Proyecto de Ley N.º 032 de 2003.
- García J, Hernández A, Acebo Y, Rives N. 2008. Obtención de un nuevo método de desinfección de semillas de arroz. Cultivos Tropicales, 29 (4): 55-59.
- González G, Alemán S, Trujillo R, Domech R, Abreu E, Pérez Y. 2002. Influencia del 6-bencilaminopurina sobre el comportamiento *in vitro* de plantas de Henequén obtenidas a partir de embriones. Biotecnología Vegetal, 2 (4): 235-238.
- Gutiérrez T. 1988. Enraizamiento de estacas de cuatro especies nativas chilenas mediante el uso de auxinas sintéticas [Tesis de Pregrado]. [Valdivia (Chile)]: Universidad Austral de Chile. p. 74.
- Jaakola L, Tolvanen A, Laine K, Hohtola A. 2001. Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66 (1): 73-77.
- Lobo M, Delgado O, Cartagena J, Fernández E, Medina C. 2007. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. Agronomía Colombiana, 25 (2): 231-244.
- López F. 2004. Diagnóstico del estado de conservación de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza y *E. jaramilloi* S. Díaz (Asteraceae) especies endémicas del departamento de Boyacá, Colombia [Tesis Pregrado]. [Tunja (Colombia)]: Instituto Alexander Von Humboldt, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. p. 75.
- Martínez G, Arena M, Benavides M, Eliasco E, Curvetto N. 2007. Role of polyamines during *in vitro* rhizogenesis of *Nothofagus nervosa* using successive culture media. New Forests, 34 (1): 83-93.
- Morales M, Gil P, Díaz C, Sanabria L, Torres L. 2011. Creación del banco de germoplasma, vivero regional y propagación de *Espeletia paipana* en la zona de influencia del Parque Natural Municipal Ranchería, Municipio de Paipa. Tunja (Colombia): Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Informe Técnico Grupo Sistemática Biológica-SISBIO Convenio de cooperación UPTC-CORPOBOYACÁ N.º 083-2009.
- Morales M, Gil P, Díaz C, Torres L, Alvarado V, Hernández A, Arias S. 2011a. Guía ilustrada de propagación de especies silvestres del Parque Natural Municipal Ranchería y su área de influencia (Paipa-Boyacá) Colombia. Tunja (Colombia): Editorial Uptc. p. 134.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15 (3): 473-497.
- Pedroza-Manrique J, Caballero M. 2009. Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L. (Marchantiaceae) bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología, 11 (2): 85-104.
- Rache L, Pacheco J. 2009. Micropropagación de *Espeletia paipana* (Cuatrecasas), frailejón del Parque Natural La Ranchería- Boyacá, Colombia. Agronomía Colombiana, 27 (3): 349-358.
- Ríos D, Avilés F, Sánchez M, Escobar R, Pereira G. 2005. Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño *Castanea sativa*. Mill. Agricultura Técnica (Chile), 65 (3): 258-264.

- Saldívar P, Laguna A, Gutiérrez F, Domínguez M. 2010. Ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry. *Agronomía Mesoamericana*, 21 (2): 327-331.
- Sánchez A. 2004. Análisis morfométrico y demográfico de *Espeletia pycnophylla* Cuatrecasas, en un gradiente altitudinal provincia de Carchi-Ecuador [Tesis Pregrado]. [Bogotá (Colombia)]: Universidad de los Andes. p. 93.
- Sánchez C, Cely G. 2003. Evaluación del estado de conservación de la vegetación en la reserva Ranchería, Paipa, Boyacá [Tesis de Pregrado]. [Tunja (Colombia)]: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. p. 147.
- Saucedo S, Ramos L, Varas E, Carmigniani F. 2008. Propagación clonal *in vitro* de Piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades *champaka* y *hawaiiana*. *Ciencia y Tecnología*, 1 (1): 49-54. Fecha de acceso 12 de diciembre de 2012. Disponible en: <http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_articulo9.pdf>.
- Schumüller T. 2004. Cytokinin. In: Lennarz W, Lane M, editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Berlin (Germany): Academic Press Elsevier Science. p. 1-7.
- SOGEOCOL (Sociedad Geográfica de Colombia - Academia de Ciencias Geográficas). 2003. El Páramo de Sumapaz un ecosistema estratégico para Bogotá [Internet]. Sociedad Geográfica de Colombia Academia de Ciencias Geográficas. Fecha de acceso: 10 de febrero de 2013. Disponible en: <<http://www.sogeocol.edu.co/documentos/Paramos.pdf>>.
- Suárez I, Espitia M, Pertuz I. 2006. Efecto de auxinas y citocininas en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Fitotecnia Colombiana*, 6 (2): 1-8.
- Uribe M, Sandoval M, Méndez A, Mora F, Delaveau C. 2011. *In vitro* rooting of *Beilschmiedia berteriana*, endemic to the South Central area of Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 38 (1): 107-115.
- Vázquez C, Orozco A, Rojas M, Sánchez M, Cervantes V [Internet]. 1997. Fondo de Cultura Económica México. D. F. Fecha de acceso: 13 de Noviembre de 2013. Disponible en: <<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/lcpt157.htm>>.
- Watkinson J, Pill W. 1998. Gibberellic acid and presowing chilling increase seed germination of indiangrass (*Sorghastrum nutans* (L.) Nash). *HortScience*, 33 (5): 849-851.