

# Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*

## The effect of activated charcoal, indol acetic acid (IAA) and benzylaminopurine (BAP) on *Epidendrum elongatum* Jacq protocorm-like body (PLB) development in *in vitro* conditions

Jaime Alonso Pedroza-Manrique<sup>1</sup>

---

### Resumen

El desarrollo vegetativo de los protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq., una orquídea endémica y en vías de extinción, se logró eficazmente mediante el cultivo *in vitro* en el medio Murashige y Skoog (1962), donde se evaluó el efecto de la interacción entre los siguientes tres factores: carbón activado (0,0; 0,5; 1,0% (w/v)); ácido indol acético (0,0; 0,5; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>); bencil amino purina (0,0; 0,5; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>). El medio de cultivo empleado fue enriquecido con sacarosa al 3%, y el Myo inositol al 0,1 g.L<sup>-1</sup>. En este estudio se evaluó que el efecto sobre la tasa de crecimiento de la interacción del carbón activado en concentraciones de 0,5 y 1,0% con 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIA es positivo para el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones *in vitro*, mientras que la interacción del BAP, tanto en concentraciones de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> y 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, muestra resultados no tan favorables en cuanto al grado de desarrollo de los protocormos estudiados. Este estudio describe un protocolo que permite alcanzar más de 270.000 plántulas en excelente desarrollo vegetativo dentro de 30 semanas, a partir de una cápsula de esta importante orquídea. Este protocolo es un modelo de conservación para especies que se encuentran en vías de extinción, y además permite la propagación a gran escala de *Epidendrum elongatum*.

**Palabras clave:** orquídea, *Epidendrum elongatum*, germinación *in vitro*, carbón activado, AIA, BAP.

### Abstract

The vegetative development of protocorm-like bodies (PLB) from *Epidendrum elongatum* Jacq. (an endemic and endangered orchid) was effectively achieved through *in vitro* culture in Murashige and Skoog medium (1962); the effect of the interaction between the following three factors was studied: activated charcoal (0.0, 0.5, 1.0% (w/v)), indol acetic acid (0.0, 0.5, 1.0 mg.L<sup>-1</sup>), benzylaminopurine (0.0, 0.5, 1.0 mg.L<sup>-1</sup>). The culture medium being

---

1 Biólogo. Esp. M. Sc. Profesor Asociado. Universidad Distrital Francisco José Caldas. ipedroza@udistrital.edu.co

used was enriched with 3% sucrose and 0.1 g.L<sup>-1</sup> myo-inositol. This study revealed that the effect of 0.5% and 1.0% activated charcoal concentrations interacting with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> AIA on PBL growth rate was positive for *E. elongatum* PBL development *in vitro* conditions, whereas the interaction of BAP (at both 0.5 mg.L<sup>-1</sup> and 1.0 mg.L<sup>-1</sup> concentration) did not produce such favourable results regarding the degree of development of the PLB being studied. This study describes a protocol leading to more than 270,000 seedlings enjoying excellent vegetative growth being obtained within 30 weeks from a single capsule from this important orchid. This protocol represents a model for conserving endangered species and promotes large-scale *Epidendrum elongatum* propagation.

**Key words:** Orchids, *Epidendrum elongatum*, germination, *in vitro*, activated charcoal, IAA, BAP.

Recibido: enero 27 de 2009

Aprobado: mayo 20 de 2009

## Introducción

En Colombia las orquídeas prosperan desde los páramos hasta altitudes sobre el nivel del mar, y desde zonas muy secas hasta bosques muy lluviosos, distribuidas en diferentes ambientes naturales, ofreciendo una gran diversidad de especies que incrementan la riqueza de la flora del país (Pedroza et ál., 2005). *Epidendrum elongatum* es una orquídea endémica de la zona altoandina en Colombia, Venezuela, Perú, Brasil y Bolivia, que habita entre los 600 y 3200 msnm (Díaz et ál., 2004; Böer, 2005; Rodríguez et ál., 2006). Actualmente, esta orquídea se encuentra en vías de extinción como consecuencia de su disminución en número, debido a la pérdida de su hábitat y la alta presión de colección (Instituto Alexander von Humbolt, 1997). La biodiversidad (ecosistemas, especies y genes) actualmente se encuentra amenazada, fundamentalmente por los modelos de desarrollo y los sistemas tecnológicos utilizados en los procesos productivos. Estas presiones atraviesan diferentes ámbitos, entre ellos es importante señalar lo institucional, lo jurídico, lo económico y lo cultural. Actualmente, la principal amenaza es la colonización de extensas superficies de ecosistemas naturales que destruyen y fragmentan el hábitat de las especies; algunas pueden buscar espacios que les den mejores oportunidades, pero otras no tienen esa capacidad y desaparecen irremediablemente (Rueda, 2007).

Es importante tener en cuenta que la demanda de recursos para la industria y el sustento

humano ha originado la transformación y pérdida de los ecosistemas naturales. Industrias como la extracción de materiales minerales han alterado la estructura y el funcionamiento de estos sistemas como consecuencia de la eliminación del suelo y la vegetación. En la actualidad existen 144 predios de minería a cielo abierto dentro de la Reserva Forestal de los Cerros Orientales de Bogotá, donde se presenta esta problemática. Debido a esto, las entidades ambientales distritales se han visto en la necesidad de iniciar proyectos de diagnóstico y recuperación en estas áreas degradadas (Arias y Barrera, 2007).

En este contexto, es indispensable realizar la conservación de plantas expuestas a estos riesgos medioambientales; por otro lado, no se han reportado investigaciones acerca del desarrollo de protocolos de propagación o conservación de *E. elongatum*. Por esta razón, la propagación a gran escala de esta especie es una necesidad indispensable para evitar su erradicación, teniendo en cuenta que es una especie de gran valor ecológico y en vías de extinción. Para la conservación de esta especie en vías de extinción es importante establecer métodos de propagación rápida y a gran escala. En el caso de una orquídea que se encuentre en vías de extinción, es inevitable acudir a métodos artificiales de propagación (por ejemplo, metodologías *in vitro*), donde el cultivo de semillas es una estrategia de propagación masiva sin la destrucción del material de origen (Krikorian, 1991; Zettler et ál., 2001). De esta forma, la ger-

minación *in vitro* permite la producción de gran número de plántulas en un corto periodo de tiempo, y se logra reducir en un 85% aproximadamente el tiempo de germinación de semillas de orquídea, que *in vivo* puede requerir un período de tiempo cercano a los 3 años (Devesa, 1997). De hecho, varios métodos han sido reportados para la micropropagación de orquídeas (Dixon, 1987; Margara, 1988; Shimasaki y Uemoto, 1991; Arditi y Ernst, 1993; Seeni y Latha, 1994; Nayak et ál., 1998; Chan y Chang, 2000; Takahashi et ál., 2000; Murthy y Pyati, 2001; Zettler et ál., 2001; Bowles et ál., 2002; Peláez, 2002; Pyati et ál., 2002; Park et ál., 2002; Chen et ál., 2002; Martín, 2003; Chen y Chang, 2004).

Las orquídeas, una vez germinan, ya sea en condiciones naturales o bajo condiciones de cultivo *in vitro*, producen una estructura muy pequeña con forma de tubérculo conocida como protocormo, la cual normalmente es desarrollada por el embrión, y que actúa como un órgano de almacenamiento que una vez formado inicia un proceso de crecimiento hasta haber almacenado la cantidad de nutrientes necesaria para permitir la aparición de los primeros brotes foliares y de la raíz, es decir, de una plántula propiamente dicha. Ante esta situación, en este estudio se describe por primera vez el efecto de la interacción entre los siguientes tres factores: el carbón activado, el ácido indol acético y la bencil amino purina, en la germinación de *E. elongatum*. Con la germinación de semillas de *E. elongatum*, bajo condiciones *in vitro*, se contribuye con el establecimiento de un protocolo para la propagación masiva de esta especie, como una herramienta para su conservación ecológica, manteniendo la variabilidad natural que se presenta en los procesos de propagación sexual o generativa para el establecimiento de bancos de germoplasma (Okada, 2001) y para su potencial explotación sostenida, que a largo plazo podría ampliarse hacia la comercialización, teniendo en cuenta que la certificación de que una especie ha sido propagada artificialmente puede facilitar su exportación (Zambrano, 2000; Rivera, 1998).

## Materiales y métodos

El establecimiento del protocolo de germinación bajo condiciones *in vitro* de *Epidendrum elongatum*, se obtiene siguiendo los siguientes pasos:

- a) **Colección de cápsulas.** Se colectaron cápsulas maduras de 8 meses de edad, de *E. elongatum*, resultantes de la polinización natural, en el Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, Cundinamarca, durante los meses de noviembre y diciembre del 2007.
- b) **Desinfección de las cápsulas.** Las cápsulas fueron desinfectadas en solución de detergente durante 10 min, y enseguida enjuagadas con agua destilada estéril. Posteriormente, las cápsulas se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio al 0,5% por 10 min, y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril, bajo condiciones asépticas en el laboratorio.
- c) **Siembra de las semillas bajo condiciones *in vitro*.** Las semillas fueron retiradas de las cápsulas y se colectaron en cajas de Petri. Luego se sembraron en los medios de cultivo MS enriquecidos con 3% de sacarosa, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de Myo-inositol, 10,0 g.L<sup>-1</sup> de fécula de maíz (Maizena<sup>®</sup>), y 3,0 g.L<sup>-1</sup> de Agar. El pH de todos los medios fue ajustado a 5,8 antes de ser esterilizados a una presión de 1,06 kg/cm<sup>2</sup> por 20 min.
- d) **Incubación de las unidades experimentales.** Los cultivos fueron incubados en luz blanca (20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> dada por luz fluorescente) (tubos fluorescentes de luz día FL-20D/18, 20 W, China Electric Co., Taipei), a 20 ± 2 °C hasta alcanzar pequeños protocormos redondos (2,5 mm en diámetro) con un fotoperiodo de 16 h. De una cápsula de *E. elongatum* se logra la germinación de aproximadamente 270.000 semillas de manera asimbiótica bajo condiciones de cul-

tivo *in vitro*, alcanzando el estado de protocormo entre las treinta semanas después de la siembra, momento en el cual se inicia el estudio del desarrollo de los protocormos, de acuerdo con el diseño experimental.

- e) **Evaluación del desarrollo de los protocormos.** En esta fase del trabajo de investigación se seleccionó el material vegetal después de los cuatro meses de germinación que en ese momento se encontraba en el estado de protocormo sin desarrollo de un vástago o con un desarrollo del vástago no superior a los 2 milímetros de longitud. Durante la implementación del diseño experimental, en la totalidad de los tratamientos fueron recultivados en el medio MS donde se evaluaron los siguientes tres factores: carbón activado (0,0; 0,5; 1,0% (w/v)), ácido indol acético (0,0; 0,5; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) y bencil amino purina (0,0; 0,5; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>), para un total de 27 tratamientos (cuadro 1). La medición de la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones del cultivo *in vitro* se realizó de forma cualitativa, ya que someter estas plantas a una medición exacta implicaría extraerlas del medio de cultivo exponiéndolas a una alta probabilidad de contaminación. La medición cualitativa de la tasa de crecimiento y desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* tuvo cinco niveles de crecimiento: nulo, bajo, medio, alto y muy alto. Para efectos del análisis estadístico, a cada uno de los anteriores niveles de valoración cualitativa se le asignó en concordancia un valor cuantitativo (cuadro 2).

### ***Análisis estadístico***

Los protocormos fueron distribuidos de acuerdo con un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3 x 3 x 3. Tres concentraciones de carbón activado (0,0; 0,5; 1,0% (w/v)), tres concentraciones de AIA (0,0; 0,5; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>), y tres concentraciones de BAP

(0,0; 0,5; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>), para un total de 27 tratamientos que evaluaron el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum*. En cada uno de los 27 tratamientos se trabajaron diez réplicas, donde cada réplica estaba representada por un frasco de cultivo con 10 protocormos, para un total de 270 frascos. Los datos fueron estadísticamente analizados empleando la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1985) a fin de establecer el mejor tratamiento con respecto al estado de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum*. El análisis estadístico permite evidenciar el efecto interactivo entre el carbón activado, el AIA y el BAP.

## **Resultados y discusión**

Tan pronto ocurre la germinación de las semillas de la orquídea *E. elongatum*, en los protocormos se forma un primordio caulinar a partir del cual se desarrolla un vástago que puede alcanzar diferentes longitudes antes de la aparición de los primeros brotes foliares y radiculares. En este contexto, el efecto del carbón activado, el ácido indol acético y la bencil amino purina en el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* señaló diferencias estadísticas altamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre los 27 tratamientos evaluados, que a continuación son analizados.

### ***Efecto del carbón activado***

Durante la implementación del diseño experimental se encontró que los tratamientos con carbón activado en concentraciones del 0,5 y del 1,0% mostraron una tasa media de crecimiento mucho mayor que la que se observó en aquellos tratamientos donde no se empleó carbón activado. En la figura 1 se observan marcadas diferencias entre los tratamientos con carbón activado y sin carbón activado en cuanto a la tasa de desarrollo de los protocormos. Además, de las dos concentraciones de carbón activado empleadas en la realización de este trabajo de investigación, la que mejores resultados arrojó fue la del 0,5%. Esto indica que el carbón activado es una sustancia que al ser

**Cuadro 1.** Efecto del carbón activado, AIA, BAP en el desarrollo de protocormos de *E. elongatum*.

| Carbón activado (%) | Ácido indol acético (mg.L <sup>-1</sup> ) | Bencil amino purina (mg.L <sup>-1</sup> ) | Tratamientos |    |
|---------------------|---|---|--------------|----|
| 0,0                 | 0,0                                       | 0,0                                       | 1            |    |
|                     |   | 0,5                                       | 2            |    |
|                     |   | 1,0                                       | 3            |    |
|                     | 0,5                                       | 0,5                                       | 0,0          | 4  |
|                     |   |   | 0,5          | 5  |
|                     |   |   | 1,0          | 6  |
|                     | 1,0                                       | 1,0                                       | 0,0          | 7  |
|                     |   |   | 0,5          | 8  |
|                     |   |   | 1,0          | 9  |
| 0,5                 | 0,0                                       | 0,0                                       | 10           |    |
|                     |   | 0,5                                       | 11           |    |
|                     |   | 1,0                                       | 12           |    |
|                     | 0,5                                       | 0,5                                       | 0,0          | 13 |
|                     |   |   | 0,5          | 14 |
|                     |   |   | 1,0          | 15 |
|                     | 1,0                                       | 1,0                                       | 0,0          | 16 |
|                     |   |   | 0,5          | 17 |
|                     |   |   | 1,0          | 18 |
| 1,0                 | 0,0                                       | 0,0                                       | 19           |    |
|                     |   | 0,5                                       | 20           |    |
|                     |   | 1,0                                       | 21           |    |
|                     | 0,5                                       | 0,5                                       | 0,0          | 22 |
|                     |   |   | 0,5          | 23 |
|                     |   |   | 1,0          | 24 |
|                     | 1,0                                       | 1,0                                       | 0,0          | 25 |
|                     |   |   | 0,5          | 26 |
|                     |   |   | 1,0          | 27 |

**Cuadro 2.** Correspondencia cuantitativa para cada uno de los niveles de valoración cualitativa dispuestos para la medición de la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones del cultivo *in vitro*.

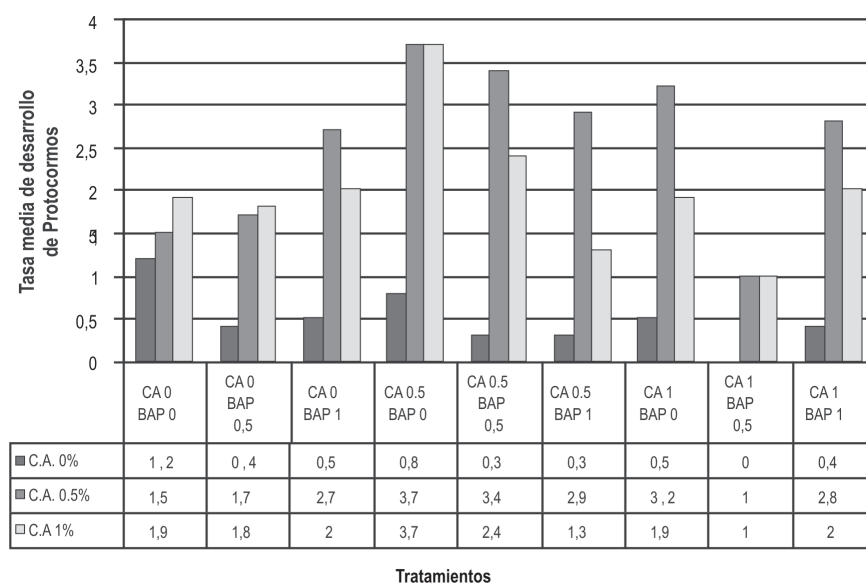
| Nivel cuantitativo | Nivel cualitativo |
|--------------------|-------------------|
| 0                  | Nulo              |
| 1                  | Bajo              |
| 2                  | Medio             |
| 3                  | Alto              |
| 4                  | Muy Alto          |

adicionada al medio de cultivo en concentraciones del 0,5% incide de manera positiva sobre la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Este resultado es evidente al comparar el desarrollo caulinar, foliar y radicular que presentaron los protocormos sembrados en medios de cultivo con carbón activado respecto a los que fueron sembrados en medios sin carbón activado. Luego de haber transcurrido un periodo de

tiempo de tres meses en el cuarto de crecimiento bajo las mismas condiciones de incubación, fue indudable que la mayor tasa de desarrollo de las estructuras anteriormente mencionadas se presentó en aquellos tratamientos en que el medio de cultivo fue enriquecido con carbón activado, al igual que los resultados obtenidos en la germinación y el desarrollo de los protocormos de *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. (Orchidaceae) (Pedroza y Micán, 2006).

Estos resultados coinciden con lo propuesto por Margara (1998), quien afirma que el carbono activado administrado en bajas concentraciones a los medios de cultivo, dosis que pueden variar desde los 0,5 a 5,0 g.L<sup>-1</sup>, estimula los procesos de desarrollo morfológico en diferentes orquídeas. De igual forma, los reportes de Vij et ál. (1994) y Chen et ál. (1999), observaron que el carbón activado mejora el desarrollo tanto de los de protocormos como de las plántulas de orquídeas, especialmente en concentraciones inferiores a 2 g.L<sup>-1</sup> en el desarrollo de plántulas de *Dendrobium* (Zhou et ál., 1995).

También se observó que el uso de carbón activado en los medios de cultivo favorece un mayor desarrollo del sistema radical en las



**Figura 1.** Tasa media de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* respecto a la concentración de carbón activado de acuerdo con los niveles de crecimiento propuestos para su evaluación.

orquídeas, porque el oscurecimiento del medio de cultivo, gracias a la acción del carbón activado, favorece la formación de un mayor número de raíces positivamente geotrópicas. De otra parte, Pierik (1990) señala que el uso de carbón activado como componente del medio de cultivo en algunos casos tiene un efecto inhibitor, debido a que puede absorber diferentes sustancias tales como hormonas vegetales y reguladores de crecimiento, además de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos, contenidos tanto en el medio de cultivo como liberados por las mismas plantas ya que el efecto de las hormonas vegetales reguladoras del crecimiento empleadas en la realización de este trabajo de investigación, y particularmente el de la auxina AIA, se vio potencializado en los medios de cultivo enriquecidos con carbón activado al 0,5 y al 1,0%.

Además de favorecer los procesos de crecimiento en las orquídeas, y de potencializar el efecto de los fitorreguladores, se observó que el carbón activado adicionado a los medios de cultivo es un agente químico que ejerce un control positivo de la oxidación tanto en el medio de cultivo como en el tejido vegetal propiamente dicho, reduciendo considerablemente la pérdida de material vegetal por necrosis consecuente con la oxidación. De acuerdo con Roca y Mroginski (1993), la oxidación de algunos compuestos químicos como taninos, fenoles y polifenoles es uno de los aspectos de más difícil manejo dentro del cultivo *in vitro*, y es causal de la inhibición de las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de proteínas, y de la respuesta de la planta a las diferentes hormonas y reguladores del crecimiento. Por esta razón, la oxidación de los tejidos vegetales cultivados bajo condiciones *in vitro* termina con la supresión total de toda respuesta de crecimiento y desarrollo del tejido, y una posterior necrosis del mismo. Doods y Roberts (1999) afirman que la oxidación puede ser controlada mediante la adición de diferentes agentes antioxidantes al medio de cultivo, y dentro de ello uno de los más destacados es el carbón activado.

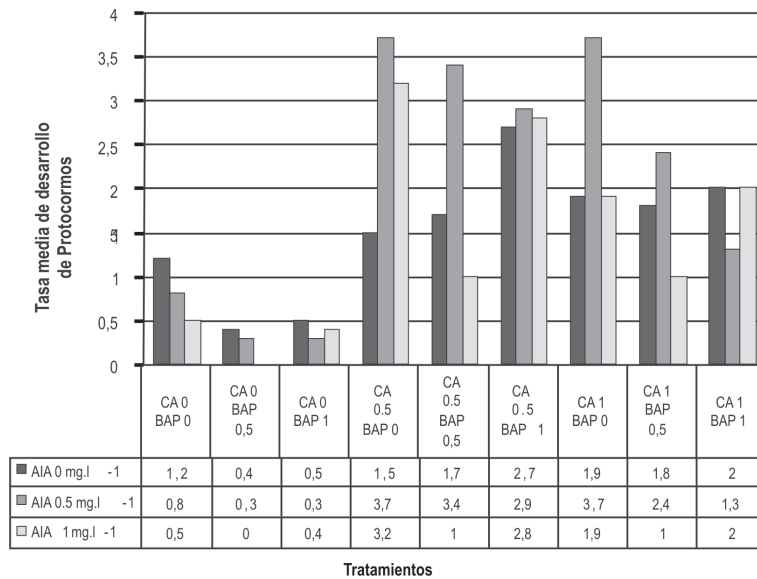
De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que la concentración de

carbón activado que mejor favorece el crecimiento de protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones de cultivo *in vitro* es del 0,5%. De hecho, después de que las semillas han germinado, la presencia del carbón activado sí es importante para garantizar un buen desarrollo fisiológico de las plántulas y de esta forma su supervivencia.

### Efecto del AIA

Durante la implementación del diseño experimental se encontró que la tasa media de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones *in vitro* fue mucho más alta en aquellos tratamientos que contenían AIA en concentraciones de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (figura 2). Además, se encontró que el efecto de este fitorregulador sobre el desarrollo de los protocormos se hace más evidente en aquellos tratamientos en que el medio de cultivo fue enriquecido con carbón activado en concentraciones del 0,5 y del 1,0%, y en aquellos tratamientos en que la concentración de BAP fue de  $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

A pesar de que Rojas y Ramírez (1987) señalan que el desarrollo de orquídeas bajo condiciones *in vitro* exige la presencia en el medio de cultivo de diversos fitorreguladores, en concentraciones equilibradas, requiriéndose auxinas, citoquininas y en ocasiones giberelinas, los resultados de este trabajo muestran que los protocormos de *E. elongatum* presentan un mayor índice de crecimiento en aquellos tratamientos en los que solo se le adicionó al medio de cultivo la auxina AIA en una concentración de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Salisbury y Ross (2000) afirman que las auxinas o cualquier otro tipo de fitorregulador son fisiológicamente funcionales cuando se encuentran en pequeñas cantidades, y que una alta concentración de estas sustancias ejerce un efecto negativo sobre las plantas porque su exceso, en lugar de inducir una respuesta específica por parte del tejido vegetal, produce toxicidad en el mismo. Al aumentar la concentración de AIA de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  bajo las mismas condiciones de cultivo, la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* se hizo menor.



**Figura 2.** Tasa media de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* con respecto a la concentración de la auxina AIA, de acuerdo con los niveles de crecimiento propuestos para su evaluación.

Los protocormos de *E. elongatum* que fueron sembrados en medios de cultivo enriquecidos con AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup> y carbón activado al 0,5 y 1,0%, presentaron un mayor nivel de elongación del vástago, un mayor desarrollo del sistema radical en cuanto a cantidad y longitud de las raíces, acompañado de un desarrollo normal de las estructuras foliares de la planta. En términos generales, el empleo de AIA y del carbón activado en las concentraciones anteriormente mencionadas, propicia que en un tiempo determinado la planta presente un mayor crecimiento en longitud y un mayor grado de desarrollo estructural. De acuerdo con Pierik (1990), estos resultados coinciden con las respuestas fisiológicas que normalmente son desencadenadas por la presencia de auxinas.

Salisbury y Ross (2000) afirman que las auxinas en bajas concentraciones favorecen el crecimiento primario de la planta, y estimulan los procesos de multiplicación celular y la formación de raíces adventicias mientras que inhiben el desarrollo de las yemas axilares. El hecho de que los medios de cultivo en los cuales se adicionaron 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIA, resultan más favorables para el crecimiento de los protocormos seleccionados se debe a que la presencia de auxinas

como el AIA en los medios de cultivo estimula la elongación celular y la expansión de los tejidos (Pierik, 1990). Por esta razón, el notable crecimiento de los protocormos de *E. elongatum* observado en los medios enriquecidos con AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup> se puede explicar porque las auxinas en concentraciones relativamente bajas modifican la extensibilidad celular al producir factores que ablandan la pared celular. Uno de estos factores podría ser la acidificación del espacio apoplástico promoviendo un aumento de la longitud en la planta (Acosta et ál., 2000). Además, el efecto de elongación que ejerce la auxina AIA sobre la planta, no solo es evidente desde el punto de vista del crecimiento primario del vástago sino también desde el punto de vista del crecimiento del sistema radicular porque diversos estudios han demostrado que las auxinas estimulan la rizogénesis en el cultivo de tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro* (Cañas, 1993). Lo anterior está en concordancia con lo propuesto por Álvarez y Sagawa (1965) quienes señalan que los efectos de las auxinas en el cultivo de orquídeas bajo condiciones *in vitro* incluyen la formación y elongación de la raíz.

A pesar de que Pierik (1990) establece que el AIA puede ser añadido a los medios de cul-

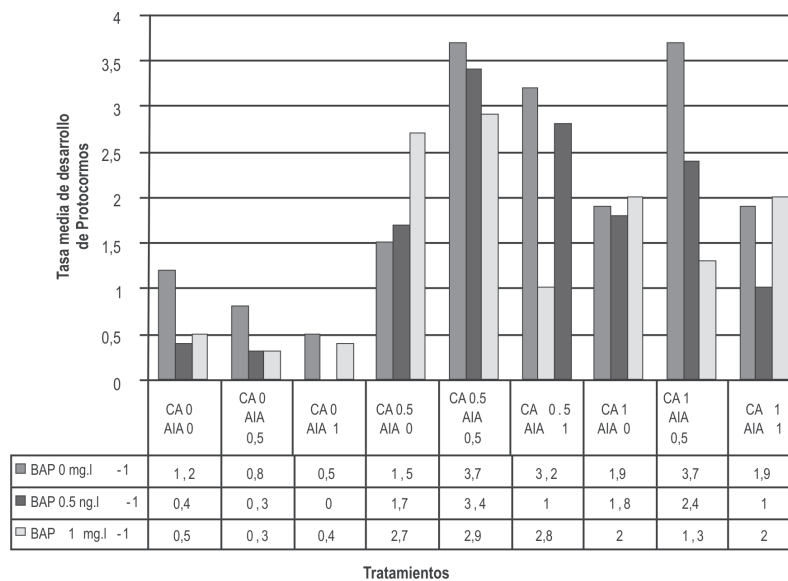


tivo en concentraciones que varían de 0,01-1,0 mg.L<sup>-1</sup>, este trabajo de investigación permitió determinar que la concentración óptima de AIA que debe ser adicionada a un medio de cultivo que promueva el buen desarrollo de protocormos de *E. Elongatum* bajo condiciones de cultivo *in vitro* es de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. Aunque este trabajo de investigación no incluyó concentraciones de este fitorregulador superiores a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, en el diseño experimental los resultados obtenidos permiten inferir que la adición de AIA al medio de cultivo dentro de un rango de concentraciones superiores a ésta no favorecerá el desarrollo de este tipo de orquídeas bajo condiciones *in vitro*. Tras un periodo de incubación de tres meses a partir de la siembra se observó que los tratamientos con el AIA en concentración de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> en presencia de carbón activado al 0,5 y 1,0%, mostraron los mejores resultados en cuanto a la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. Elongatum* se refiere.

### Efecto de la BAP

Durante la implementación del diseño experimental se encontró que la tasa media de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum*

bajo condiciones *in vitro* fue mucho más alta en aquellos tratamientos que no contenían BAP (figura 3). Además, se observó que el desarrollo de los protocormos cultivados se vio reducido en los tratamientos que contenían esta citoquinina en concentraciones del 0,5 y 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, con excepción de aquellos tratamientos en donde la concentración de AIA fue de 0,0 mg.L<sup>-1</sup>. Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se encontró que la citoquinina bencil amino purina no ejerce un efecto relevante sobre la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones de cultivo *in vitro*. De hecho, los tratamientos en que se adicionó este fitorregulador en concentraciones de 0,5 y 1,0 mg.L<sup>-1</sup> presentaron un nivel inferior de desarrollo con respecto a los tratamientos en los que la concentración de BAP fue de 0,0 mg.L<sup>-1</sup>. De acuerdo con los resultados presentados en la figura 3, esta citoquinina no tuvo un efecto positivo sobre la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* cuando se empleó de manera conjunta con el AIA, pero sí cuando fue adicionada en concentraciones de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> a un medio de cultivo con carbón activado al 0,5% y carente de auxinas. En au-



**Figura 3.** Tasa media de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* con respecto a la concentración de la citoquinina BAP de acuerdo con los niveles de crecimiento propuestos para su evaluación.

sencia de AIA, el BAP indujo una respuesta de desarrollo en los protocormos que fueron cultivados en medios con carbón activado al 0,5%, que aunque no fue tan alta como la observada en los tratamientos que contenían 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIA, fue significativamente buena dentro de la tasa media de crecimiento.

El nivel de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* en medios de cultivo con carbón activado al 0,5% y AIA en concentración de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, difiere del nivel de desarrollo observado en los medios de cultivo con las mismas concentraciones de carbón activado y BAP. Los protocormos que se desarrollaron en medios de cultivo que únicamente contenían carbón activado y BAP presentaron un mayor desarrollo de las estructuras foliares, aunque con menos desarrollo del vástago, que los que fueron cultivados únicamente con carbón activado y AIA. También se observó el desarrollo de vástagos secundarios de menor tamaño cuando se adicionó BAP a los medios de cultivo enriquecidos con carbón activado.

Estos resultados coinciden con lo propuesto por Rojas (1993), quien afirma que las citoquininas inhiben la elongación del tallo pero estimulan el alargamiento de las hojas. Además, dichos resultados también son consecuentes con lo afirmado por Pérez y Martínez (1994), quienes señalan que dentro de los efectos fisiológicos de las citoquininas está la eliminación de la dormancia de las yemas axilares, promoviendo la formación de vástagos laterales. De acuerdo con Krikorian (1991), el BAP es la citoquinina sintética que más se utiliza actualmente en el cultivo de tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro*, y según Rozell (1983), si es adicionada al medio de cultivo en concentraciones de 0,03 a 3,0 mg.L<sup>-1</sup>, estimula los procesos de multiplicación celular, razón por la cual los tratamientos en los que se implementó su uso en ausencia de AIA mostraron buenos resultados en cuanto a la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* se refiere. De hecho, cuando se cultivó *Epidendrum radicans* y *Dendrobium formosum* en medios enriquecidos con la citoquinina BAP, se logró un adecuado

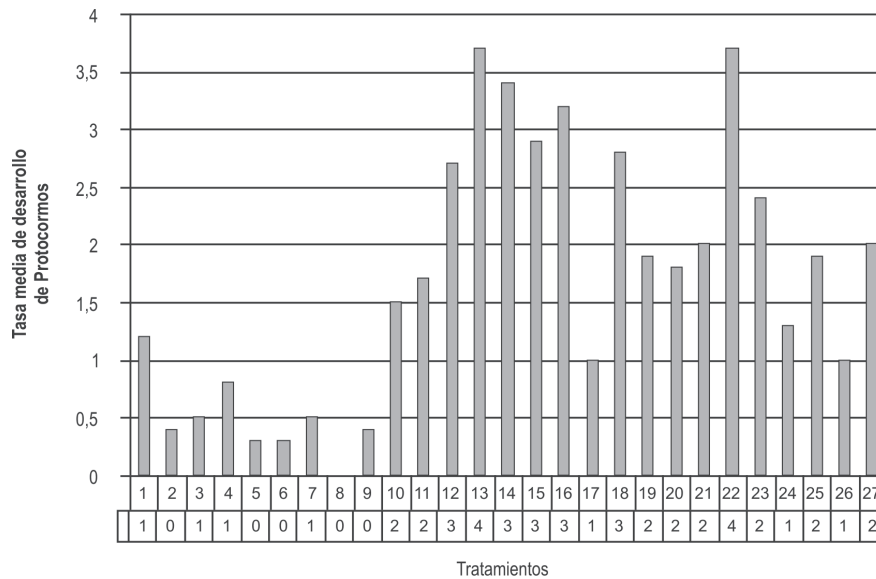
desarrollo de los protocormos (Li-Ru et ál., 2002; Saiprasad y Raghuvveer, 2003).

### ***Efecto de la interacción del carbón activado, el AIA y el BAP***

Durante la implementación del diseño experimental se encontró que la mayor tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* cultivados bajo condiciones *in vitro* fue presentada por los tratamientos 13 y 22, que contenían 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIA y 0,5 y 1% de carbón activado. La figura 4 muestra que la tasa media de crecimiento de los protocormos cultivados, de acuerdo con los niveles propuestos para su evaluación, fluctuó considerablemente entre los diferentes tratamientos, encontrándose niveles muy altos de desarrollo así como niveles nulos de crecimiento. Lo anterior indica que la respuesta morfogénica de los protocormos cultivados guarda una estrecha relación con la concentración en que estas tres sustancias fueron adicionadas al medio de cultivo y con la interacción presentada entre ellas.

De esta forma, los tratamientos sin carbón activado, T1 al T9, presentaron la tasa media de desarrollo más baja de todo el diseño experimental. Por otra parte, los tratamientos con carbón activado al 0,5%, T10 al T18, presentaron la tasa media de crecimiento más alta del experimento, mientras que los tratamientos con carbón activado al 1,0%, T19 al T27, con excepción del tratamiento 22 que mostró muy buenos resultados, presentaron resultados intermedios. Los resultados obtenidos muestran que la tasa media de desarrollo de los protocormos cultivados más alta del diseño experimental se presentó en los tratamientos que contenían AIA en concentraciones de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> y carbón activado al 0,5 y al 1,0%, lo cual indica que el efecto de este fitorregulador se ve potencializado con la interacción del carbón activado en las concentraciones mencionadas.

Además, si se compara el efecto de esta auxina en concentraciones de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, entre los tratamientos que contenían y no contenían carbón activado, se aprecia que existen dife-



**Figura 4.** Tasa media de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* para cada uno de los tratamientos del diseño experimental, de acuerdo con los niveles de crecimiento propuestos para su evaluación.

rencias altamente significativas en cuanto a la tasa media del desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* cultivados bajo condiciones *in vitro*. Los protocormos cultivados en medios de cultivo con AIA, en concentraciones de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> y carbón activado al 0,5 y al 1,0%, en concordancia con los niveles propuestos para la evaluación de la tasa de crecimiento, mostraron un desarrollo muy alto, mientras que los que fueron cultivados en medios de cultivo con igual concentración de AIA pero sin carbón activado, mostraron un nivel bajo de desarrollo.

Además de demostrar que la interacción del carbón activado y el AIA en las concentraciones ya mencionadas resulta positiva para el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum*, los resultados obtenidos también muestran que la interacción del AIA con el BAP, bajo las mismas concentraciones de carbón activado, no resultó del todo positiva para el desarrollo de estos protocormos; a pesar de que en los tratamientos en los que se implementó el uso simultáneo de estos dos fitoreguladores se observaron niveles aceptables de desarrollo, nunca fueron superiores a los observados en

aquellos tratamientos donde solo se implementó el uso de AIA.

Cuando las concentraciones de AIA y carbón activado fueron de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> y 0,5% respectivamente –que de acuerdo con los resultados de este trabajo fueron las mejores para el desarrollo de protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones *in vitro*–, el efecto del BAP sobre la tasa de desarrollo fue inversamente proporcional a la concentración en que este fitoregulador fue adicionado al medio de cultivo, mostrando el máximo nivel de desarrollo en ausencia de esta citoquinina. A pesar de que los mejores resultados se obtuvieron en ausencia de BAP, la tasa media de desarrollo de los protocormos cultivados en el medio con BAP en concentraciones de 0,5 y 1,0 mg.L<sup>-1</sup> fueron significativamente altas.

Por otra parte, los resultados obtenidos entran en oposición con las afirmaciones realizadas por quienes señalan que la actividad de diferentes hormonas y reguladores del crecimiento puede ser inhibida por el uso de carbón activado, debido a que esta sustancia tiene la capacidad de absorber una gran variedad de

compuestos químicos, tanto de origen orgánico como de origen inorgánico, presentes en el medio de cultivo o producidos directamente por la planta (Pierik, 1990). Este trabajo demostró que, en el desarrollo de protocormos de *E. elongatum*, el uso de carbón activado en los medios de cultivo no inhibe la actividad de los fitorreguladores AIA y BAP sino que, por el contrario, potencializa sus efectos.

Este trabajo demostró que en el desarrollo de protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones *in vitro*, un medio de cultivo enriquecido con carbón activo en concentraciones de 0,5 y 1,0%, y con AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, es el ideal para tal efecto, y que el uso de BAP no incidió de manera totalmente positiva sobre la tasa media del desarrollo de los protocormos cultivados. Después de la implementación del diseño experimental se determinó que la interacción del carbón activado al 0,5 y al 1,0% con el AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (T13 y T22), produjo el mejor resultado en cuanto a la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* se refiere (figura 5).

De acuerdo con el análisis de varianza realizado para el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones de cultivo *in vitro*, el valor del *F* calculado con los valores experimentales es de 42,34 para la tasa de desarrollo de los protocormos seleccionados, que al compararlo con el valor de *F* tabulado, para un nivel de significación de 0,01, es de 1,79 para 26 y 243 grados de libertad, por lo cual se puede afirmar con un 99% de nivel de confianza, que se presentaron diferencias altamente significativas entre la tasa de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* de cada uno de los 27 tratamientos.

Tras la implementación del diseño experimental se determinó que los tratamientos 13 y 22 presentaron la tasa media de desarrollo más alta y que, por tanto, la composición del medio de cultivo en estos tratamientos es la ideal para el desarrollo *in vitro* de protocormos de *E. elongatum*, razón por la cual una vez obtenidos estos resultados se resembró la totalidad del material vegetal bajo estos dos tratamientos, observándose que el cambio de medio de cultivo favore-

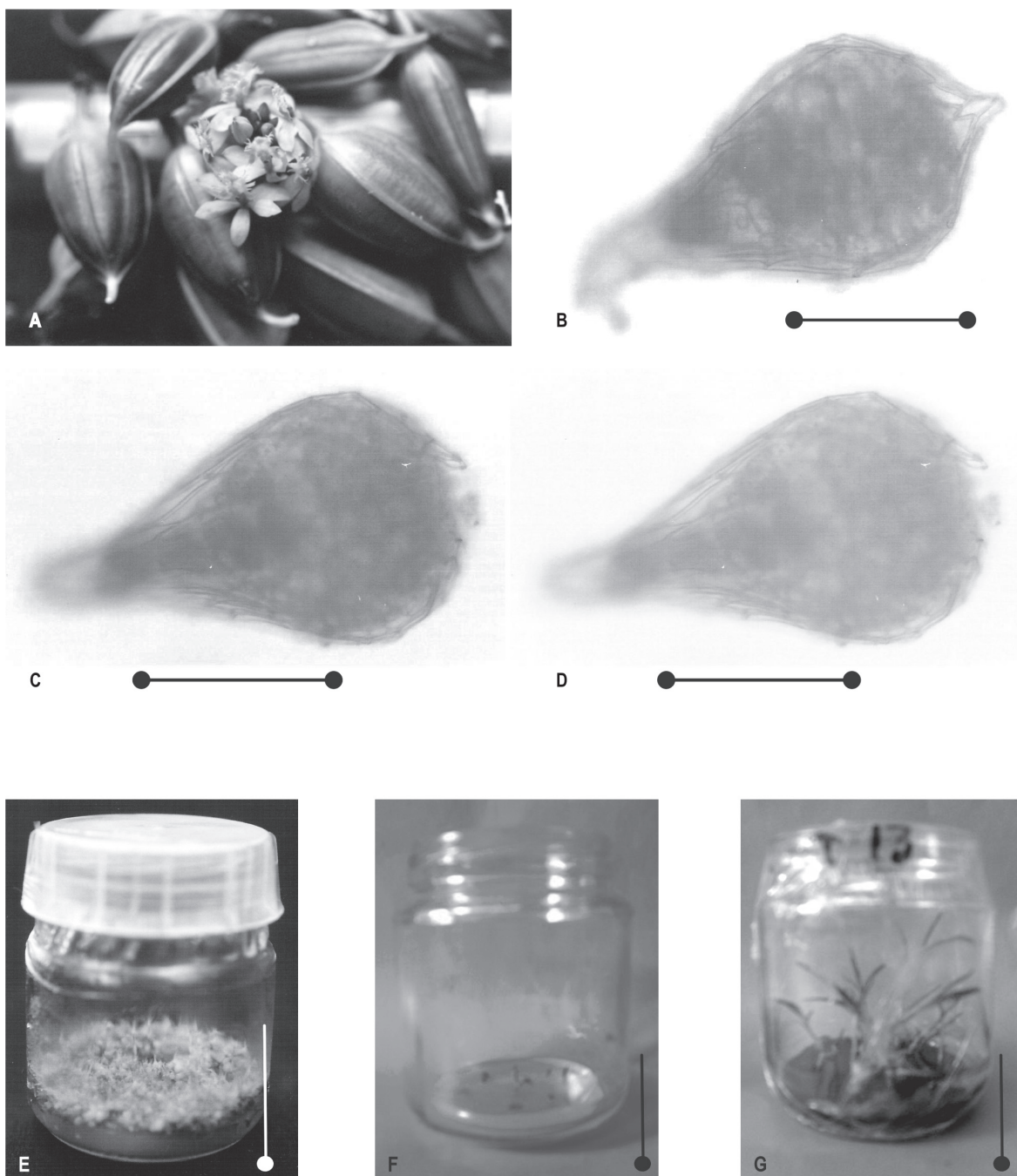
ció considerablemente el nivel del desarrollo de los protocormos de *E. elongatum*.

Mediante el establecimiento de los protocormos bajo los tratamientos de máximo desarrollo se obtuvo una reserva de este tipo de orquídeas que se podrá emplear en nuevos procesos de recuperación de las poblaciones de *E. elongatum* en los ecosistemas andinos colombianos, teniendo en cuenta que esta especie tiene una amplia distribución en ambientes abiertos, bastante iluminados, y que pueden soportar periodos de sequía prolongados, logrando colonizar los lugares con intervención antropogénica (Tiago, 2005; Pedroza y Donado, 2006; Fernández y Hernández, 2007; Oliveira y van de Berg, 2007). El protocolo establecido en este trabajo para el desarrollo de protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones *in vitro* facilita y potencializa la explotación sostenida a nivel comercial de este tipo de orquídea, sin que haya un impacto directo sobre las poblaciones naturales. Además, es importante tener en cuenta que la utilización de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales es favorable para los fines de exportación, si se tiene en cuenta que la reglamentación en materia de exportación de flora silvestre exime de toda regulación a las plantas propagadas bajo condiciones *in vitro*.

## Conclusiones

Los medios de cultivo en los que no se implementó el uso de carbón activado presentaron la tasa media de desarrollo más baja de todo el diseño experimental. El uso de carbón activado al 0,5 y al 1,0% en los medios de cultivo tiene un efecto positivo sobre la tasa media de desarrollo de los protocormos de *E. elongatum*, porque además de efectuar un control de la oxidación del medio y de los tejidos, estimula los procesos de desarrollo morfogénico como la formación de raíces en los protocormos cultivados y, además, potencializa los efectos fisiológicos del AIA.

El AIA en concentraciones de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> adicionado a un medio de cultivo enriquecido



**Figura 5.** Desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones *in vitro*.

A) Colección de las semillas a partir de las cápsulas.

B-D) Proceso germinativo de las semillas de *E. elongatum* (barra = 90 µm).

E) Semillas germinadas de *E. elongatum* (barra = 3 cm)

F-G) Inicio y final del desarrollo de los protocormos en el tratamiento 13  
(Carbón activado 0,5%; y 0,5 mg.L<sup>-1</sup> AIA) (barra = 2 cm).

con carbón activado al 0,5 y 1,0%, ejerce un efecto muy positivo sobre el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* cultivados bajo condiciones *in vitro* porque estimula los procesos de multiplicación celular, la elongación del vástago y el desarrollo del sistema radical. Además, el uso de AIA en concentraciones de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  en los medios de cultivo tiene un efecto menor sobre el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* cultivados bajo condiciones *in vitro* que el observado en los medios donde se usó AIA en concentraciones de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

El empleo simultáneo de AIA y BAP no ejerce un efecto del todo positivo sobre el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* cultivados bajo condiciones *in vitro*, porque en presencia de esta citoquinina los protocormos muestran un desarrollo que, aunque es aceptable, es inferior al observado en aquellos protocormos cultivados únicamente en presencia de AIA.

La interacción del carbón activado en concentraciones de 0,5 y 1,0% con  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA resulta positiva para el desarrollo de protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones *in vitro*, mientras que la interacción del BAP en concentraciones de  $0,5$  y  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  muestra resultados no tan favorables, en cuanto al grado de desarrollo de los protocormos se refiere. Los protocormos cultivados en medios de cultivo con carbón activado y BAP muestran un mayor grado de desarrollo en las estructuras foliares que los cultivados en medios de cultivo con carbón activado y AIA, pero a su vez muestran un menor grado de elongación del vástago.

El desarrollo de protocormos de *E. elongatum* bajo condiciones *in vitro* constituye una alternativa de solución, eficiente e innovadora, para los problemas que implican la recuperación y conservación de *E. elongatum* en los ecosistemas andinos colombianos, manteniendo la variabilidad natural que se presenta con los procesos de propagación masiva sexual mediante el uso de semillas.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Facultad de Ciencias y Educación de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

## Referencias bibliográficas

- Acosta, E., Sánchez, B., Bañón, A. 2000. Auxinas. En: Azcon, B. y Talon, M. (eds). Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid: McGraw-Hill, 2000, pp. 305-322.
- Álvarez, M., Sagawa, Y. 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). *Caryologia*, 18: 251-261.
- Arditti, J., Ernst, R. 1993. Micropropagation of orchids. New York: John Wiley and Sons, pp. 87-607.
- Arias, M. A., Barrera, J. I. 2007. Caracterización florística y estructural de la vegetación vascular en áreas con diferente condición de abandono en la cantera Soratama, localidad de Usaquén, Bogotá. *Universietas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias Edición especial II*. 12: 25-45.
- Böer, T. 2005. O epifitismo vascular em florestas do sudeste do Brasil. Teses apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal. Campinas, SP.
- Bowles, M., Jacobs, K., Zettler, L., Delaney, T. 2002. Crossing effects on seed viability and experimental germination of the federal threatened *Platanthera leucophoea* (orchidaceae). *Rodora* 104: 14-30.
- Cañas, B. M. 1993. Metodologías *in vitro* de vegetales. Bucaramanga: UIS.
- Chan, C., Chang, W. C. 2000. Micropropagation of *Cymbidium ensifolium* var. *Misericors* through callus-derived rhizomes. *In vitro Cell. Dev Biol Plant* 36: 517-520.
- Chen, J., Chang, Wei-Chin. 2004. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* shimadzu. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 290-293.
- Chen, L.; Pan, R.; Chen, R. 1999. Effects of media, growth regulators and dividing on the growth of *Cymbidium sinense* protocorm cultured *in vitro*. *J. Trop. and Subtrop. Bot.* 7:59-64.
- Chen, T., Cheng, J. T., Chang, W. 2002. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal

- explants of *Paphiopedilum* orchids. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 38:595-597.
- Devesa, J. A. 1997. Plantas con semilla. En: Izco, J. (ed). Botánica. Madrid: McGraw-Hill, pp. 541-580.
- Díaz, J. A., Solano, F., Sánchez, L. R., Espinosa, F. O. 2004. Riqueza y distribución de las orquidáceas en la provincia de Pamplona. *Revista Bistua*.
- Dixon, K. 1987. Raising terrestrial orchids from seed. En: Harris, W. K. (ed.). *Modern orchid growing for pleasure and profit*. Adelaide: Orchid Club of South Australia, Inc., pp. 47-100.
- Doods, J., Roberts, W. 1999. Experiments in plant tissue culture. Atlanta: Plant Science Letters, pp. 83-85.
- Fernández, J. L., Hernández, M. 2007. Catálogo de la flora vascular de la cuenca alta del río Subachoque (Cundinamarca, Colombia). *Caldasia* 29 (1): 73-104.
- Instituto Alexander von Humbolt. 1997. Informe nacional sobre el estado de biodiversidad: Especies de plantas superiores amenazadas. Colombia.
- Krikorian, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W., Mroginski, L. (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT, pp. 96-125.
- Li-Ru, C., Jen-Tsung, C., Wei-Chin, C. 2002. Efficient production of protocorm like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. *In vitro Cellular & Developmental Biology: Plant* Columbia 38 (5): 441-445.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*: los meristemas y la organogénesis. Madrid: Mundi-Prensa.
- Martin, K. 2003. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ispaea malabarica* (Reich. f.) J. D. Hook, an endangered orchid. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 39: 322-328.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Murthy, H., Pyati, A. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 223-226.
- Nayak, N., Rath, S., Patnaik, S. 1998. High frequency plant regeneration from alginate encapsulated protocorm-like bodies of *Spatholottis plicata* BI, a terrestrial orchid. *Phytomorphology* 48: 179-186.
- Okada, A. 2001. La biodiversidad y los peligros que la amenazan. En: Perea Dallos M. (ed.). *Biotecnología agrícola: un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*. Bogotá: Editora Guadalupe, pp. 29-41.
- Oliveira, C., van den Berg. 2007. Análise comparativa de áreas de campo rupestre da cadeia do espinhaço (Bahia e minas gerais, Brasil) baseada em espécies de orchidaceae. *Sitientibus série ciências biológicas* 7 (3): 199-210.
- Park, S. Y., Murthy, H. N., Paek, K. Y. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 168-172.
- Pedroza, J., Donado, W. 2006. Efecto de la fertilización con calfos, malezas acuáticas y gallinaza en la adaptación de seis especies pioneras para revegetalización de zonas erosionadas del municipio de Bojacá, Cundinamarca. Parte I: Análisis de crecimiento con información primaria. *Revista Científica* 8: 93-110.
- Pedroza, J., Fernández, C., Suárez, A. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comperettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 838-843.
- Pedroza, J., Micán, Y. 2006. A symbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 543-547.
- Peláez, J. M. 2002. Embriogénesis somática en *Epidendrum ruizianum* (Orchidaceae). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
- Pérez G., Martínez, J. 1994. Introducción a la fisiología vegetal. Madrid: Mundi-Prensa.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa.
- Pyati, A., Murthy, H., Hahn, E., Paek, K. 2002. *In vitro* propagation of *Dendrobium macrostachyum* Lindl. - A terrestrial threatened orchid. *Indian J Exp Biol* 40: 620-623.
- Rivera, G. 1998. Orquídeas: generalidades y cultivo. Heredia: Efunia.
- Roca, W. M., Mroginski, L. A. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT.
- Rodríguez, E., Vásquez, R., Rojas, R. 2006. Nuevas adiciones de angiospermas a la flora del Perú. *Rev Peru Biol* 13(1): 129-138.

- Rojas, M. 1993. Fisiología vegetal aplicada. 4 ed. México: McGraw-Hill.
- Rojas, M., Ramírez, H. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas. México: Limusa.
- Rozell, J. F. 1983. Influence of Azotobacteraceae and triacanol on orchid protocorm and seedlings growth. Denton. Thesis (Master of Science). North Texas State University. Department of Biology.
- Rueda, R. 2007. Recopilación de la información sobre la biodiversidad de Nicaragua. Costa Rica: Inbio.
- Saiprasad, G. V., Raghuveer, P. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In vitro Cellular & Developmental Biology: Plant*. Columbia 39 (1): 42-47.
- Salisbury, E., Ross, C. 2000. Fisiología vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. España: Thomson editores Paraninfo.
- Seeni, S., Latha, P. 1994. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 29: 167-172.
- Shimasaki, K., Uemoto, S. 1991. Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 25: 49-52.
- Steel, R., Torrie, J. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. 2 ed. Bogotá: McGraw Hill, pp. 328-367.
- Takahashi, K., Ogiwara, I., Acoda, N. 2000. Seed germination of *Habenaria radiata* (Orchidaceae: Orchideae) *in vitro*. *Lindleyana* 15: 59-63.
- Tiago, B. 2005. O epifitismo vascular em florestas do sudeste do Brasil. Teses apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal. Campinas, SP.
- Vij, S. P., Kondo, K., Pathak, P. 1994. Regeneration potential of *Cymbidium pendulum* (Roxb) Sw. Nodal explants: a study *in vitro*. *J Orch Soc India* 8: 19-23.
- Zambrano, H. 2000. Estado de la legislación en materia de flora silvestre. *Pérez-Arbelaezia* 5 (11): 87-96.
- Zettler, L., Stewardt, S., Bowles, M., Jacobs, K. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. *Am Midland Nat* 145: 168-175.
- Zhou, H., Li, S., Qian, X. H., Gong, H. F. 1995. Effects of some factors on plantlet growth of *Dendrobium* in tissue culture. *Journal of Zhejiang Agricultural University* 21: 622-624.