

## Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. *in vitro*

### The effect of activated charcoal and indole acetic acid on the *in vitro* development of *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl and *Maxillaria nutans* Lindl. protocorm-like bodies

Jaime Alonso Pedroza-Manrique<sup>1</sup>, Lina Constanza Serrato-Muñoz<sup>2</sup>,  
Mileidy Castaño-Robayo<sup>3</sup>

#### Resumen

En esta investigación se pretende estimular el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro* utilizando diferentes concentraciones de ácido indol acético y carbón activado. El protocolo obtenido es una alternativa de la conservación de orquídeas que se encuentran en vías de extinción, y además permite contribuir con el mejoramiento medioambiental. En la evaluación del desarrollo vegetativo bajo condiciones *in vitro* de los protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*, orquídeas en vías de extinción, se obtuvo que solamente *Maxillaria nutans* alcanzará su desarrollo exitoso mediante el cultivo *in vitro* en el medio Murashige y Skoog (1962), donde se evaluó el efecto de la interacción entre el carbón activado (0,0; 0,5, 1,0 % (p/v)) y el ácido indol acético (0,0; 0,5; 1,0 mg/L-1). El medio de cultivo empleado fue enriquecido con sacarosa al 3% y el Myo inositol al 0,1 g/L-1. Los protocormos de *Masdevallia coccinea* evidenciaron que se encontraban inmaduros, situación por la cual no lograron su desarrollo vegetativo en el experimento planteado, en atención a que se encontraban en el periodo de latencia. Por esta razón, es de gran importancia tener en cuenta que las cápsulas de las orquídeas deben estar bien maduras, a fin de garantizar que los protocormos que se forman *in vitro* sean maduros y completen con facilidad su morfofisiología. Mientras que los protocormos de *Maxillaria nutans* dieron un mayor rendimiento en su desarrollo vegetativo. En esta investigación se determinó que el efecto de la interacción de 0,5% de carbón activado con 0,5 mg/L-1 de AIA es positivo sobre la tasa de crecimiento para el desarrollo de los protocormos de *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro*.

**Palabras clave:** *Masdevallia coccinea*, *Maxillaria nutans*, *in vitro*, carbón activado, AIA.

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

2 Licenciada en Biología, Universidad Distrital Francisco José Caldas.

3 Licenciada en Biología, Universidad Distrital Francisco José Caldas.

## Abstract

When evaluating the protocorm growth of endangered orchids *Masdevallia coccinea* and *Maxillaria nutans* in *in vitro* conditions, only *Maxillaria nutans* achieved successful development by *in vitro* culture in Murashige and Skoog (1962); the effect of the interaction between activated carbon (0.0, 0.5, 1.0% (w / v)) and indole acetic acid (0.0, 0.5, 1.0 mg/L-1) was evaluated. Culture medium was enriched with 3% sucrose and 0.1 g/L-1 myo-inositol. *Masdevallia coccinea* protocorms were revealed to be immature, meaning that they could not achieve vegetative development in the planned experiment as they were in their latency period. It should thus be noted that orchid capsules should be ripe to ensure that protocorms formed *in vitro* are mature and easily complete their morphophysiological development. However, *Maxillaria nutans* protocorms gave higher yield during their vegetative development. This research found that the interaction effect of 0.5% activated carbon with 0.5 mg/L-1 IAA was positive on growth rate for *Maxillaria nutans* protocorm development in *in vitro* conditions. The protocol obtained in this investigation represents a conservation alternative for endangered orchids and can contribute towards environmental improvement.

**Key words:** *Masdevallia coccinea*, *Maxillaria nutans*, *in vitro*, activated charcoal, IAA.

Recibido: febrero 15 de 2010

Aprobado: octubre 25 de 2010

## Introducción

La familia Orchidaceae es una de las más abundantes del mundo, y la belleza de sus flores representa un gran potencial para la industria ornamental; aparecieron sobre la faz de la tierra hace unos 100 a 200 millones de años en el archipiélago de Borneo, y desde allí se extendieron a todos los continentes (Rivera, 1998). En los trópicos es donde se concentra el mayor número de ellas, y es precisamente en estas regiones donde se ha producido el mayor impacto ecológico provocado por el hombre en los últimos años. Las amenazas que directa o indirectamente afectan a las orquídeas son la deforestación, los incendios forestales, el trasiego ilegal de plantas, el manejo inapropiado de especies (Zambrano, 2000; Cupitra, 2009; Escudero e Iriondo, 2009; Magdaleno, 2009; Zamora, 2009).

En este trabajo se realizó el cultivo *in vitro* de dos especies de orquídeas: *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*, plantas terrestres húmicas endémicas de Colombia que se encuentran en vías de extinción, con la categoría global “En peligro” (EN), como consecuencia de su reducción poblacional mayor al 50% en

los últimos 30 años, debido a altos niveles de recolección y a una disminución en la calidad del hábitat (Instituto Alexander von Humbolt, 1997; Okada, 2001; Calderón, 2007; Sarmiento, 2009). Estas especies son poco cultivadas ya que su crecimiento y desarrollo son lentos, por tanto, se pretende realizar cultivos en medio *in vitro* para acelerar su desarrollo, preservar estas especies y conservarlas. La realización del cultivo *in vitro* se generó a partir de la siembra de protocormos (pequeños cuerpos isométricos), en un medio nutritivo llamado Murashige & Skoog (1962), el cual le proporciona macro y micronutrientes a las semillas, desplazando las funciones del hongo en la relación simbiótica. Este medio fue enriquecido con el AIA, la hormona que desencadena el enraizamiento y la elongación de la planta, y el carbón activado que sirve de sustrato y absorbe los fenoles oxidantes en la misma.

Con esta técnica se pretende estandarizar un protocolo para el desarrollo de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*; siendo estas dos especies no cultivadas en condiciones de laboratorio, cuya multiplicación ha estado sujeta a los métodos convencionales de propagación vegetativa *in vivo*, el establecimiento de un pro-

protocolo encaminado al crecimiento y desarrollo de protocormos de *Masdevallia* y *Maxillaria* bajo condiciones de cultivo *in vitro* requiere de la evaluación de diversos factores que tanto de forma individual como integrada determinan el éxito del *vitro-cultivo*, dentro de estos factores se encuentran los medios de cultivo en cuanto a su composición nutritiva y reguladores del crecimiento, así como las condiciones de incubación como luz y temperatura.

La implementación de un diseño experimental mediante el cultivo *in vitro* pretende evaluar el efecto del carbón activado y del fitorregulador ácido indol acético (AIA), sobre la tasa de crecimiento y desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*, buscando encontrar las concentraciones óptimas en que estas sustancias se deben adicionar a los medios de cultivo para obtener un resultado favorable respecto al desarrollo de estas plantas bajo condiciones de cultivo *in vitro*. De igual forma, es importante tener en cuenta el estado de desarrollo de las cápsulas de orquídeas que se utilizan en estos procesos, a fin de garantizar el desarrollo morfofisiológico de los protocormos que se logran generar tan pronto las semillas de las orquídeas germinan de forma asimbióticamente bajo condiciones *in vitro*.

## Materiales y métodos

La evaluación del efecto del AIA y del carbón activado en el desarrollo de los protocormos bajo condiciones *in vitro* de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*, se obtiene siguiendo los siguientes pasos:

1. **Colección de cápsulas.** El material vegetal se obtuvo mediante cápsulas de las dos especies de orquídeas colectadas en el páramo de Guasca localizado en el departamento de Cundinamarca, en la región del Guavio, a cincuenta kilómetros al nordeste de la ciudad de Bogotá D. C. Tiene una temperatura promedio de 15 °C y se encuentra a una altitud de 2.700 metros sobre el nivel del mar, ubicán-

dose entre los pisos térmicos frío y páramo. *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*, para el cultivo de semillas bajo condiciones *in vitro*, se encuentran entre los 7 y los 8 meses a partir de la polinización, para lograr obtener un mayor porcentaje de embriones viables, que se verá representado en un porcentaje de germinación alto, menor tiempo de germinación y desarrollo de los protocormos de buen vigor.

2. **Desinfección de las cápsulas.** Las cápsulas fueron desinfectadas en solución de detergente comercial Axió® en polvo 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.
3. **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®) 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.
4. **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. Las semillas de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans* así germinadas alcanzan el estado de protocormo a las 24 semanas después de la siembra, momento en el cual se inicia el estudio

del desarrollo de los protocormos, de acuerdo con el diseño experimental

- 5. Evaluación del desarrollo de los protocormos.** En esta fase del trabajo de investigación se seleccionó el material vegetal, después de los seis 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 mm de longitud. La totalidad de los tratamientos fue recultivado en medio MS donde se evaluaron los siguientes dos factores: carbón activado (0,0; 0,5; 1,0% (w/v) y ácido indol acético (0,0; 0,5; 1,0 mg/L<sup>-1</sup>) para un total de 9 trata-

mientos (tabla 1). La medición de la tasa de desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans* bajo condiciones del cultivo *in vitro* se realizó evaluando la respuesta morfológica de los protocormos ante la alteración de concentraciones de ácido indol acético y carbón activado.

La medición cualitativa de la tasa de crecimiento y desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans* tienen cinco niveles: nulo, bajo, medio, alto y muy alto. Para efectos del análisis estadístico, a cada uno de los niveles de valoración cualitativa se la asignará, en concordancia, un valor cuantitativo (tabla 2).

**Tabla 1.** Combinación de concentraciones de la auxina A.I.A y carbón activado en un diseño completamente al azar con arreglo factorial (3x3) para estimular el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*

Carbón activado (%)	Ácido indol acético mg/L <sup>-1</sup>	Tratamiento
0,0	0,0	1
	0,5	2
	1,0	3
0,5	0,0	4
	0,5	5
	1,0	6
1,0	0,0	7
	0,5	8
	1,0	9

**Tabla 2.** Correspondencia cuantitativa para cada uno de los niveles de valoración cualitativa dispuestos para la medición de la tasa de crecimiento y desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans* bajo condiciones de cultivo *in vitro*

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

## Análisis estadístico

Los protocormos fueron distribuidos de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3 x 3. Tres concentraciones de carbón activado (0,0; 0,5; 1,0 % (p/v)) y tres concentraciones de AIA (0,0; 0,5; 1,0 mg/L<sup>-1</sup>), para un total de 9 tratamientos, cada uno con 10 réplicas, donde cada réplica estaba representada por un frasco de cultivo con 10 protocormos que evaluaron el desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*, para un total de 90 frascos. Las diferencias entre las medias fueron establecidas 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 *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans*. El análisis estadístico permite evidenciar el efecto interactivo entre el carbón activado y el AIA.

## Resultados y discusión

El efecto del carbón activado y del ácido indol acético en el desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans* señaló diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre los 9 tratamientos evaluados, que a continuación son analizados.

### *Adaptación de protocormos de Masdevallia coccinea bajo condiciones in vitro*

Los protocormos de la especie *M. coccinea* fueron sembrados en cada uno de los tratamientos, en los cuales no se evidenció ningún crecimiento durante las 21 semanas de adaptación, a esto se le atribuye que las semillas de orquídeas son muy pequeñas y contienen muy pocas o ninguna reserva alimenticia; debido al pequeño tamaño de las semillas no hay éxito en la germinación bajo condiciones ambientales (Flórez y Pedroza, 2006). Los protocormos de *Masdevallia coccinea* se encontraban inmaduros, situación por la cual no lograron su desarrollo vegetativo en el experimento donde se deseaba

conocer el efecto de la interacción entre el carbón activado y el ácido indol acético. Por esta razón, es de gran importancia tener en cuenta que las cápsulas de las orquídeas deben estar bien maduras, a fin de garantizar que los protocormos que se forman *in vitro* serán maduros y su desarrollo fisiológico responda con facilidad tan pronto han superado el periodo de latencia (Pedroza, 2008). Ante esta situación, es importante tener en cuenta que la cápsula de la especie *Masdevallia coccinea* llega a dos tercios de su madurez; de hecho, cuando presentan una coloración verde-violeta las cápsulas son inmaduras, situación que restringe la germinación de sus semillas; al contrario, cuando las cápsulas presentan coloración amarilla-violeta están maduras y sus semillas se encuentran adecuadas para su germinación.

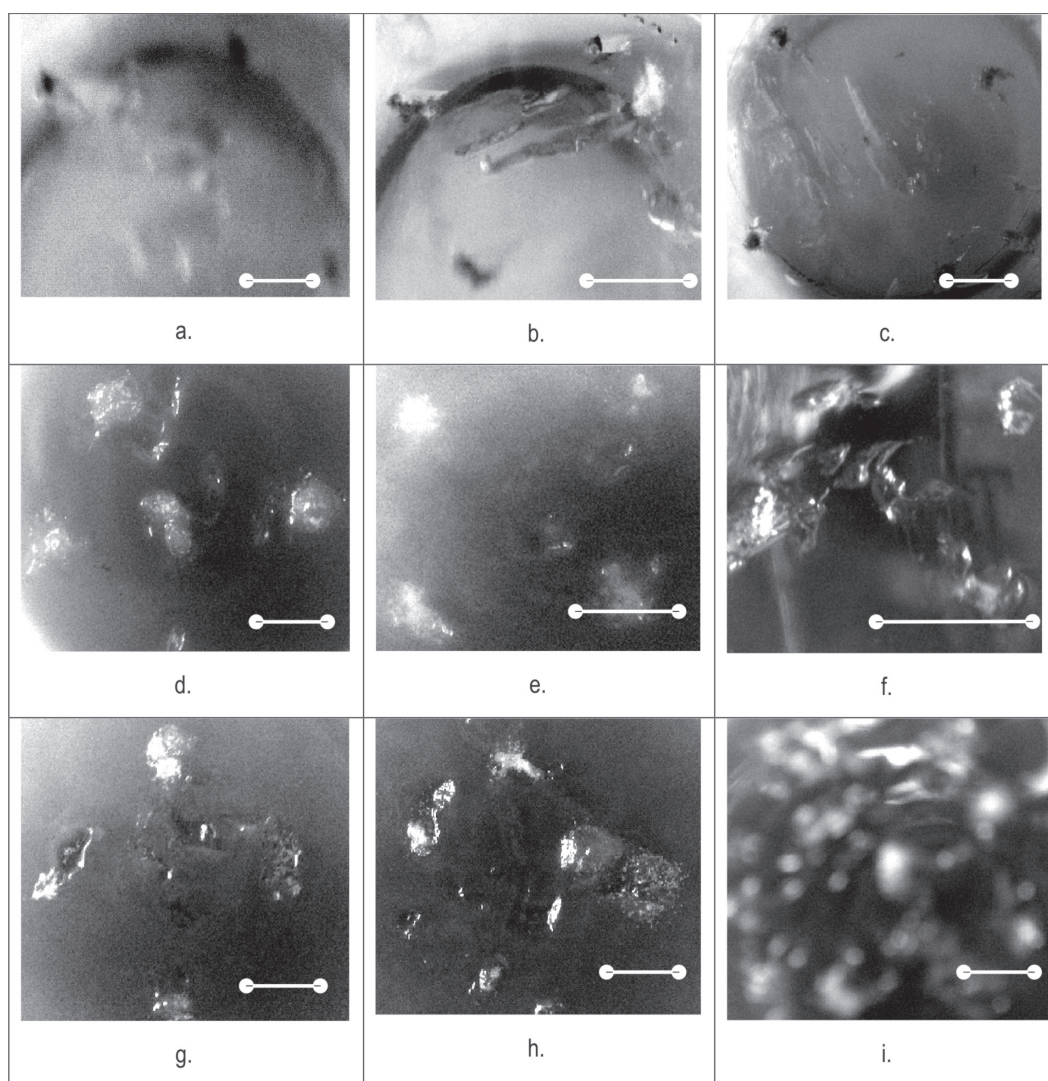
En este contexto, el cultivo bajo condiciones *in vitro* es una alternativa que facilita la germinación de todas las semillas de las cápsulas de las orquídeas que se encuentran bien maduras. De esta forma, la germinación *in vitro* permite la producción de gran número de plántulas en un corto periodo de tiempo, y se logra reducir en un 85% aproximadamente el tiempo de germinación de semillas de orquídea, que *in vivo* puede requerir un periodo de tiempo cercano a los 3 años (Devesa, 1997). Por esta razón, se evidenció que las cápsulas de *Masdevallia coccinea* no estuvieron suficientemente maduras, situación por la cual los embriones tienen muy pocas posibilidades de desarrollo vegetativo en un medio asimbiótico que necesita unas condiciones especiales diferentes a los demás medios asimbióticos. Varias investigaciones coinciden con el hecho de que los embriones inmaduros necesitan más reservas alimenticias para su posterior adaptación al medio y para lograr un adecuado desarrollo, este medio debe ser rico en sacarosa con niveles más elevados a los que se usan en otros medios basales (30% de sacarosa), incluso afirman que estos medios pueden ser enriquecidos con reguladores tipo auxina que facilitan el desarrollo de los embriones inmaduros. Además, las cápsulas deben estar en un tiempo adecuado de maduración, que



no sea muy verde, porque las semillas quedan en un estado de latencia en el cual no se logra alcanzar una etapa mínima de desarrollo; es decir, difícilmente llegan a desarrollarse cuerpos protocórmicos y una diferenciación celular a partir de la cual pueda surgir un embrión bien desarrollado (Dixon, 1987; Margara, 1988; Shimasaki y Uemoto, 1991; Arditti y Ernst, 1993; Seeni y Latha, 1994; Nayak *et al.*, 1998; Chan y Chang, 2000; Takahashi *et al.*, 2000; Murthy

y Pyati, 2001; Zettler *et al.*, 2001; Bowles *et al.*, 2002; Peláez, 2002; Pyati *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Martin, 2003; Chen y Chang, 2004).

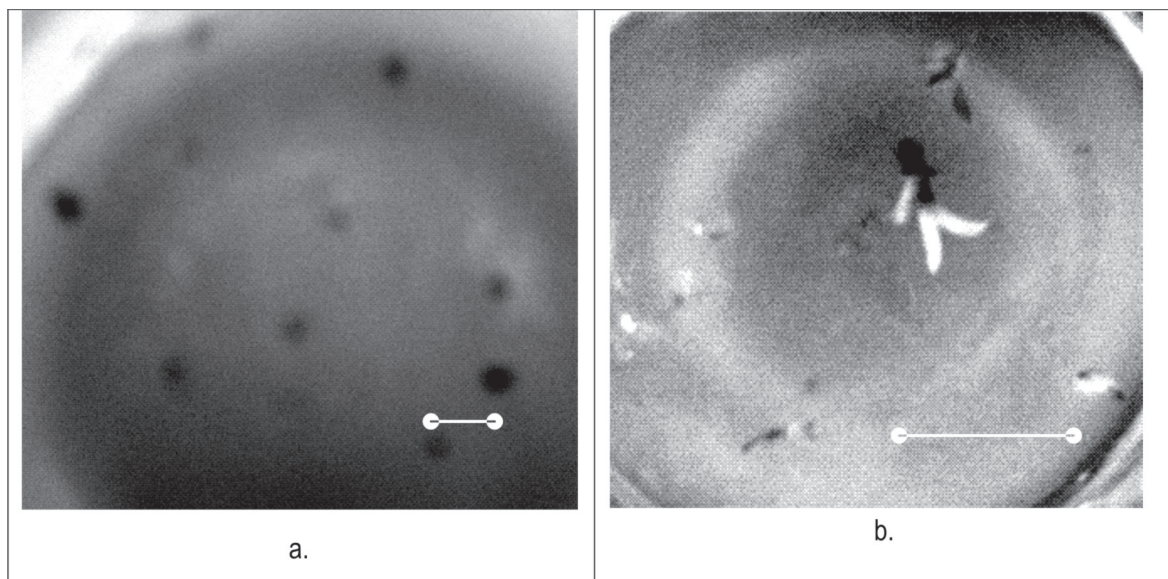
Durante esta etapa inicial no se observaron cambios positivos en el desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* en los diferentes tratamientos con carbón activado y la auxina AIA (figura 1). Posteriormente, se pro-



**Figura 1.** Efecto de CA y AIA sobre el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea*. Adaptación a los diferentes tratamientos durante las 21 semanas posteriores a la siembra. a) tratamiento 1 barra = 1  $\mu\text{m}$ ; b) tratamiento 2, barra = 2  $\mu\text{m}$ ; c) tratamiento 3, barra = 1  $\mu\text{m}$ ; d) tratamiento 4, barra = 1  $\mu\text{m}$ ; e) tratamiento 5, barra = 2  $\mu\text{m}$ ; f) tratamiento 6, barra = 3  $\mu\text{m}$ ; g) tratamiento 7, barra = 1  $\mu\text{m}$ ; h) tratamiento 8, barra = 1  $\mu\text{m}$ ; i) tratamiento 9, barra = 1  $\mu\text{m}$ .

cedió a sembrarlas en un medio nutritivo libre de hormonas y carbón activado (tratamiento 1), utilizando fécula de maíz en un porcentaje del 1% (figura 2), como aporte de nutrientes para la semilla, ya que contiene glutamina que es especialmente necesaria para el crecimiento de embriones inmaduros, puesto que es una importante fuente de nitrógeno (Pierik, 1990).

En términos generales, los protocormos de *Masdevallia coccinea* se conservaron en este medio durante los seis meses posteriores a la siembra, mostrando un crecimiento nulo en todas las fases de desarrollo y en todas las réplicas, tanto en crecimiento de rizoides, como en raíces y primordios foliares, como se muestra en la tabla 3.



**Figura 2.** Protocormos de *Masdevallia coccinea* con el tratamiento de fécula de maíz al 1%. El total de las réplicas muestra un crecimiento nulo y se oxidan con gran facilidad. a) barra = 2  $\mu$ m; b) barra = 30  $\mu$ m.

**Tabla 3.** Desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* en diferentes etapas; brote apical, rizoides y plántula en desarrollo utilizando medio basal MS con fécula de maíz al 1%

Semanas	Brote apical	Rizoides	Plántula en desarrollo
2	1	0	0
4	1	0	0
6	1	1	0
8	1	1	0
10	1	0	0
12	1	0	0

Los protocormos en este medio de cultivo lograron un desarrollo muy bajo de los brotes apicales y de los rizoides, mientras que las plántulas no alcanzaron su desarrollo vegetativo. De esta forma, todos los protocormos permanecieron en un periodo de latencia, porque requieren finalizar dicho periodo y enseguida lograr su desarrollo morfofisiológico. De hecho, el periodo de latencia corresponde al lapso que transcurre entre el momento de recibir el estímulo y manifestar su reacción fisiológica, porque la semilla logra reconocer las condiciones del medio que son apropiadas para el establecimiento de la plántula (Flórez y Pedroza, 2006).

En la sexta semana se detuvo el desarrollo de los protocormos de *Masdevallia coccinea* por el efecto del 30% de la oxidación, situación que inhibió su crecimiento. Probablemente, una de las causas para la oxidación es la temperatura, ya que los 20 °C en la incubación es el factor ambiental de mayor importancia que regula la germinación y el crecimiento de las plántulas (Taiz y Zeiger, 1998). Arditti y Ernst (1993), señalan que para las orquídeas, el desarrollo de la germinación *in vitro* se prefiere en un rango entre 20 y 25 °C de temperatura, con un óptimo alrededor de los 20 °C, con el mínimo posible de variación (Ospina y Dressler, 1979).

### **Adaptación de protocormos de *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro***

Los protocormos de *Maxillaria nutans* se desarrollaron favorablemente, observándose protocormos con alta presencia de clorofila y de gran tamaño a los cuatro meses posteriores a la siembra. Estos protocormos fueron adaptados a los 9 tratamientos con presencia de carbón activado y la auxina AIA, mostrando cambios positivos en todos los tratamientos en proporciones diferentes; en general, el cuerpo protocórmico en todas las réplicas de *Maxillaria nutans* presentó desarrollo y crecimiento.

Los resultados obtenidos en las siembras realizadas en la primera etapa permitieron determinar que las semillas de *M. nutans* requieren para su germinación la adición de reguladores de crecimiento tipo auxina en baja concentración. Estas observaciones coinciden con los planteamientos de Arditti y Ernst (1993), quienes manifiestan que la mayoría de los tejidos de orquídeas requieren auxinas y citoquininas para su crecimiento, aunque algunos trabajos muestran que no todas las orquídeas requieren de estas, especialmente para los procesos de germinación, como se evidencia en los casos en los que se presentó respuesta de desarrollo protocórmico en tratamientos que no contenían ningún regulador de crecimiento, como se manifestó en el tratamiento 4 (0,5% CA y 0,0 mg/l<sup>-1</sup> AIA), situación que coincide con los planteamientos de Montoya (1991), quien sugiere que generalmente los embriones son autónomos para la mayoría de los reguladores de crecimiento, por contener concentraciones endógenas de hormonas adecuadas para iniciar su desarrollo.

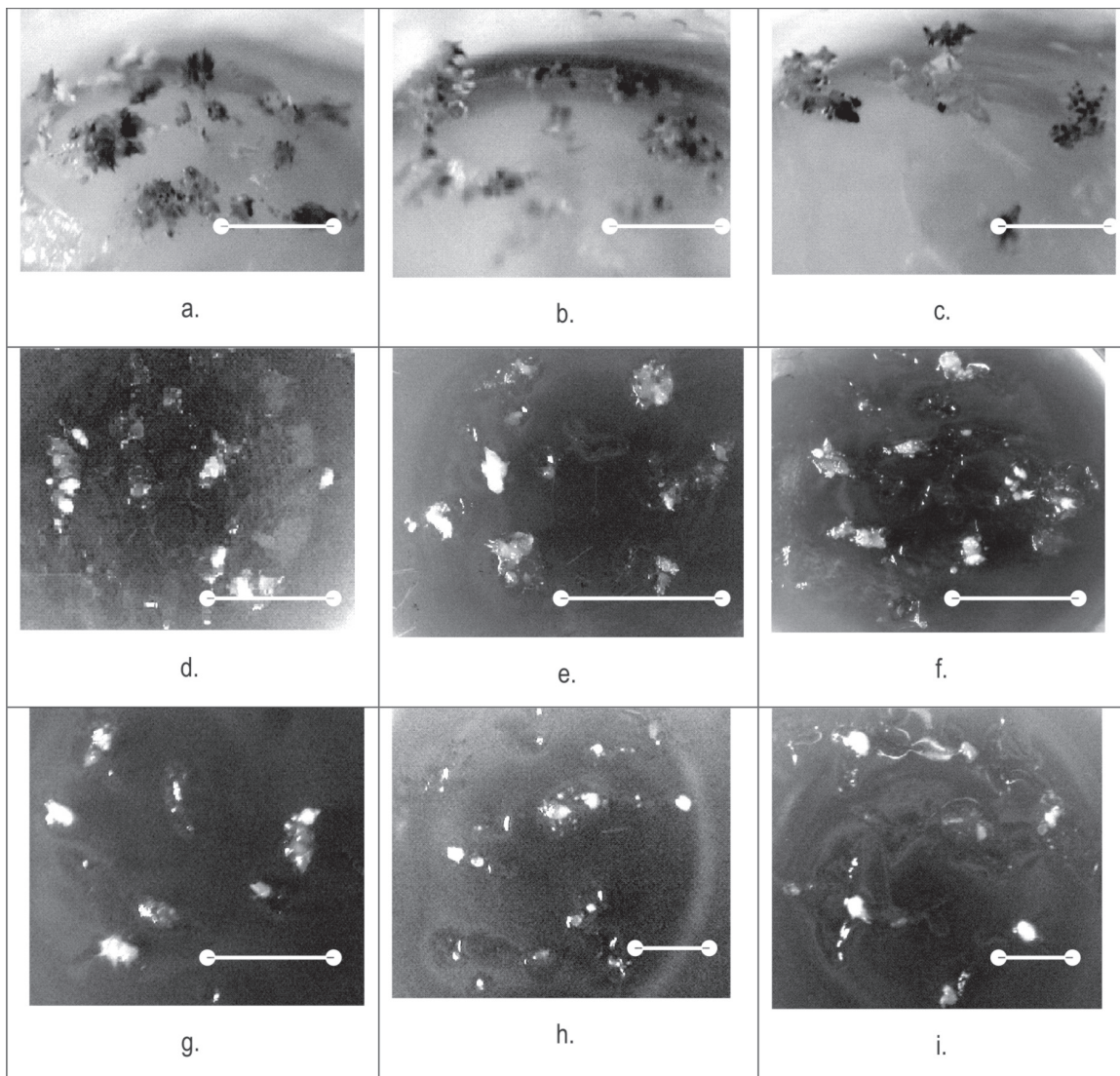
Es importante tener en cuenta que el ácido indol acético (AIA) es una auxina que se produce de forma natural en las plantas, sintetizada a partir de triptófano; se produce en los tejidos de la propia semilla, sin importarse de los tejidos de la planta madre, y su contenido aumenta en el periodo medio de la embriogénesis (Davies, 1987; Pedroza *et al.*, 2005). Morel (1973) considera que la mayor parte de los tejidos vegetales son incapaces de desarrollarse en medios que no contienen auxinas, aunque existen plantas que en condiciones *in vitro* no precisan de ellas, siendo plantas autótrofas para este tipo de sustancias (Pierik, 1990).

Se pudo evidenciar que a las tres semanas de realizada la siembra de los protocormos, los tratamientos 1, 2, 3, 7 y 8 no presentaron diferencias significativas en cuanto al crecimiento del brote apical, observando valores cuantitativos (0-1) nulo-bajo, mientras que en los tratamientos 4, 5 y 6 el desarrollo fue de nivel bajo a medio (0-2) y en el tratamiento 9 no se evidenció ningún cambio (0) como se observa en la



figura 3. Con respecto al tratamiento 9 se evidenció que no hubo un desarrollo morfológico porque la semilla necesita perder sustancias inhibitoras de la germinación para así iniciar su desarrollo (Jann y Amen, 1980). Los protocormos en esta etapa empiezan a adaptarse al medio asimbiótico y se evidencia desarrollo morfológico, donde se inicia la multiplicación

y el crecimiento celular, y por tanto hay desarrollo apical y fisiológico, porque hay hidratación en los tejidos, absorción de oxígeno, intensificación de las actividades enzimáticas y de digestión de nutrientes (Pedroza, 2008). En general, en la tercera semana de adaptados los cuerpos protocórmicos a los diferentes tratamientos con el carbón activo y la auxina



**Figura 3.** Desarrollo de protocormos de *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro*. Adaptación de los protocormos en los diferentes tratamientos. Se observa crecimiento de brote apical a la semana 3 posterior a la siembra. a) Tratamiento 1, barra = 20  $\mu\text{m}$ ; b) Tratamiento 2, barra = 20  $\mu\text{m}$ ; c) Tratamiento 3, barra = 20  $\mu\text{m}$ ; d) Tratamiento 4, barra = 30  $\mu\text{m}$ ; e) Tratamiento 5, barra = 40  $\mu\text{m}$ ; f) Tratamiento 6, barra = 30  $\mu\text{m}$ ; g) Tratamiento 7, barra = 30  $\mu\text{m}$ ; h) Tratamiento 8, barra = 10  $\mu\text{m}$ ; i) Tratamiento 9, barra = 10  $\mu\text{m}$ .

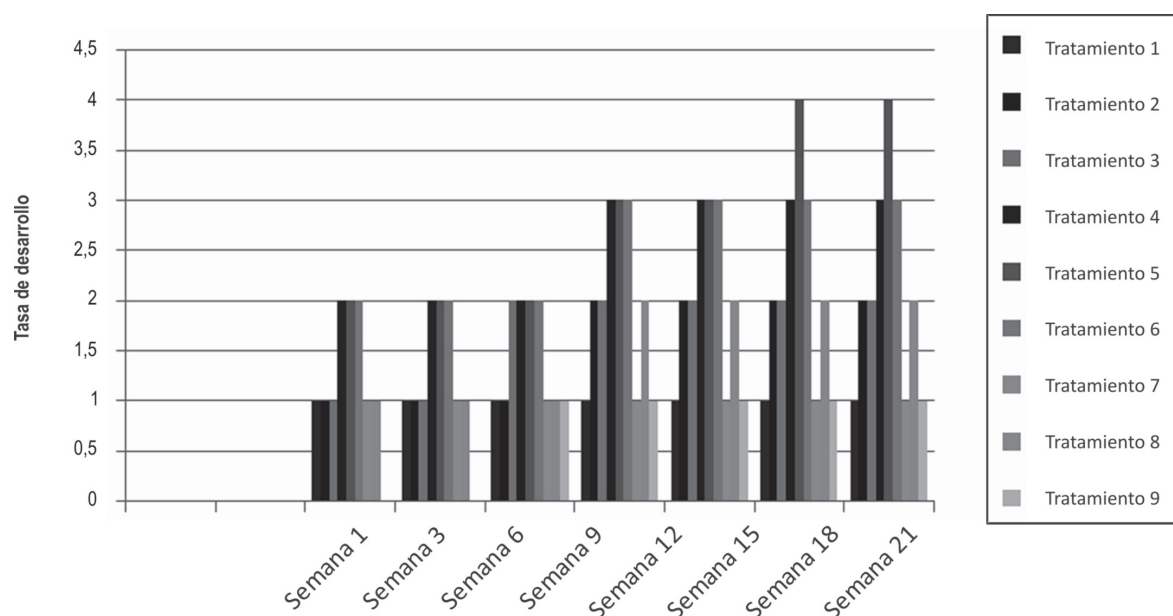
ácido indol acético no se observan diferencias altamente significativas, lo cual demuestra que los protocormos después de adaptados siguen un desarrollo normal igual para los diferentes medios con crecimiento de brote apical y presencia de clorofila, que indica que han empezado a fotosintetizar dichos protocormos en desarrollo y además están utilizando todos los materiales de reserva presentes en el medio nutritivo.

Entre las semanas 6 y 9 no se evidenciaron cambios significativos, a diferencia del tratamiento 3 que pasó de nivel bajo a medio (1-2). En el tratamiento 9 se observó un crecimiento bajo del brote apical. Estos protocormos evidencian un desarrollo lento, porque sus semillas son de tamaño pequeño y no permiten una rápida absorción de los nutrientes del medio basal y de las hormonas, como en las auxinas donde el movimiento de nutrientes es lento a través de los tejidos (Pierik, 1990; Salisbury y Ross, 2000).

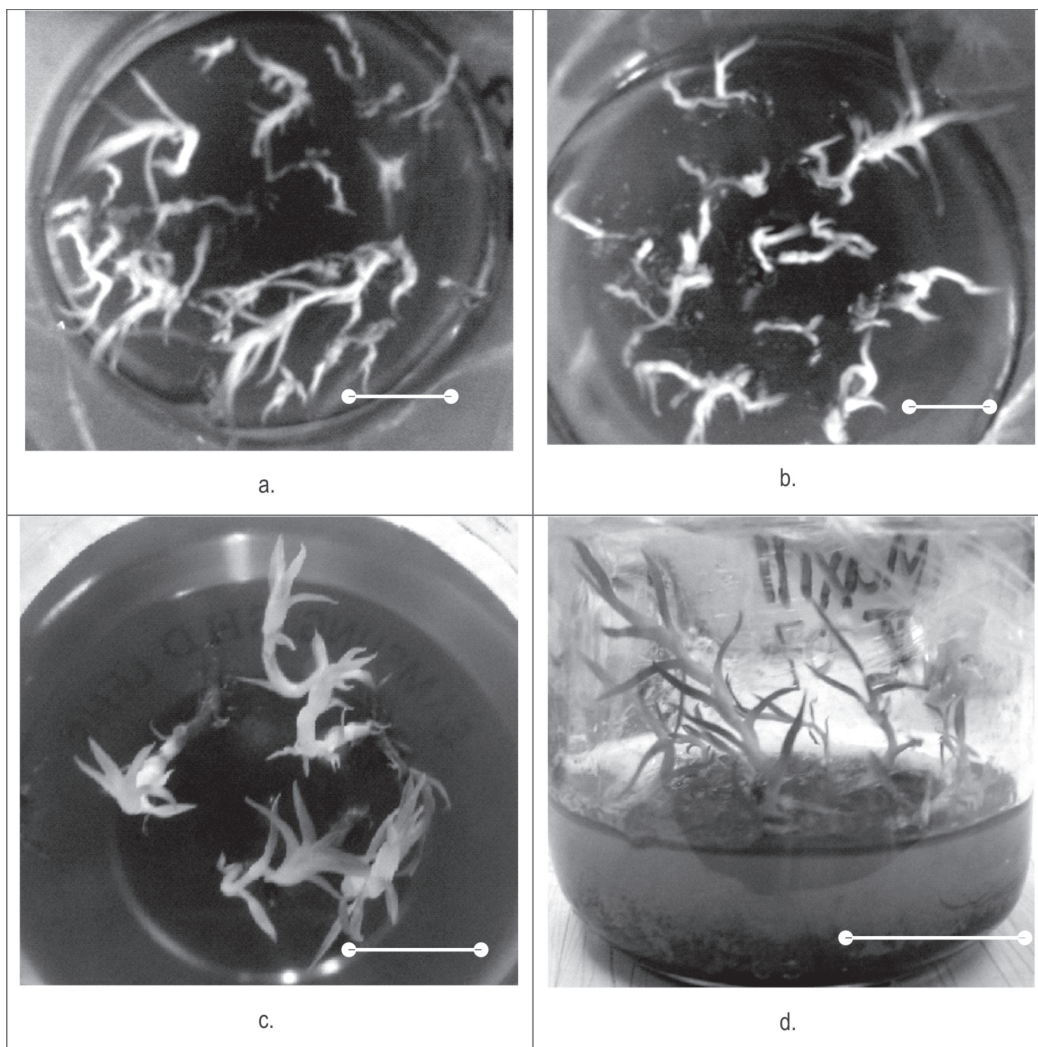
De igual forma, entre las semanas 12 y 15, el tratamiento 2 se encuentra en mejor desarrollo llegando a un nivel medio (2), los tratamien-

tos 5 y 6 comienzan a mostrar un nivel alto en el desarrollo del brote apical. En los tratamientos 5 y 6 se muestra la madurez morfológica, ya que las distintas estructuras de la semilla han completado su desarrollo y el embrión ha llegado a su máximo desarrollo. En términos generales, durante las 21 semanas los tratamientos que mostraron mayor crecimiento apical fueron los tratamientos 5 y 6, con niveles de nulo a muy alto (0-4). Los de menor desarrollo fueron los tratamientos 1, 7 y 9, los cuales se encontraron entre nulo y bajo (0-1) siendo su crecimiento muy lento y poco diferenciado (figura 4).

En general, el desarrollo de la plántula fue óptimo para los tratamientos 4, 5 y 6 con niveles de nulo-alto (0-3), teniendo un desarrollo favorable para la plántula; sin embargo, el tratamiento que mostró mejores resultados fue el tratamiento 5, con concentraciones del carbón activado al 0,5% y de la auxina AIA de 0,5 mg/l<sup>-1</sup> (figura 5). De hecho, el carbón activado y el AIA estimulan y mejoran los procesos de desarrollo morfogénico de los protocormos y de las plántulas de diferentes orquídeas (Vij *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1999; Margara, 1998). En la semana 21 se observó un crecimiento



**Figura 4.** Tasa de desarrollo del brote apical de los protocormos de *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro* durante 21 semanas en 9 tratamientos

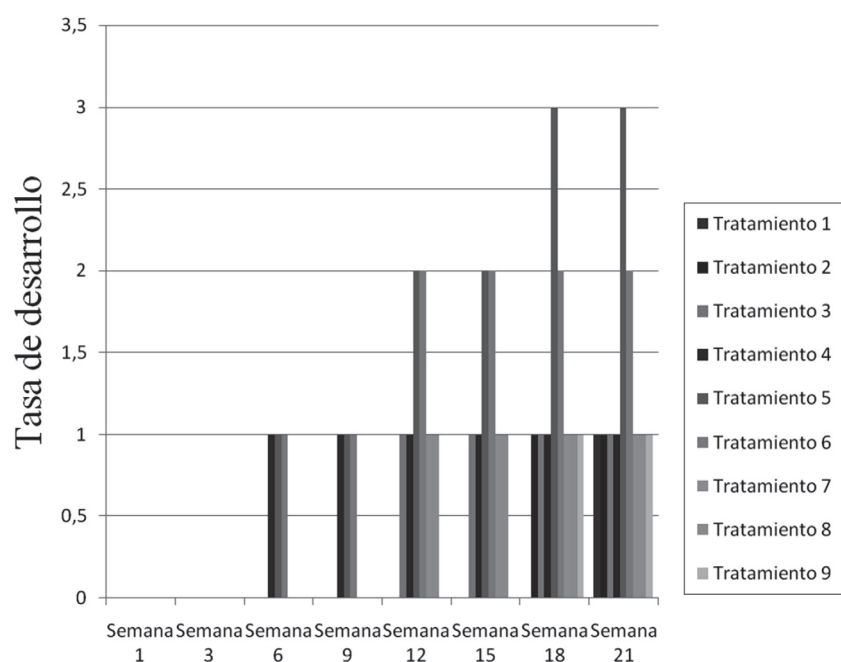


**Figura 5.** Desarrollo de protocormos de *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro* en el tratamiento 5; plántulas con máximo desarrollo. a) Edad de la plántula: 6 meses, barra = 260 µm; b) Edad de la plántula: 6 meses, barra = 240 µm; c) Edad de la plántula: 12 meses, barra = 380 µm; d. Edad de la plántula: 18 meses, barra = 420 µm.

nulo-bajo (0-1) del desarrollo de rizoides entre los tratamientos 1, 2 y 9; los tratamientos con un efecto más favorable en el desarrollo de rizoides fueron el 5 y 6, que mostraron niveles de nulo-alto (0-3) y nulo-medio (0-2), respectivamente. De esta forma, se evidencia que la interacción entre el carbón activado al 0,5% y la auxina AIA al 0,5 mg/L y 1,0 mg/L favorecieron la inducción y el desarrollo de las raíces de los protocormos de *Maxillaria nutans*, de acuerdo con sus interacciones fisiológicas en el desarrollo de los protocormos (figura 6).

Asimismo, la temperatura óptima lograda para la germinación de semillas de *Maxillaria nutans* coincide con las estimaciones de Pierik (1990), quien sugiere que la temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo *in vitro* es generalmente 20-25 °C más alta que la correspondiente para el crecimiento *in vivo*, aunque la temperatura en los recipientes de cultivo es 25 °C más alta que en la cámara de crecimiento, debido al efecto de la irradiación. Salisbury y Ross (2000) señalan que, a veces, una variación de pocos grados da lugar a un cambio signifi-





**Figura 6.** Tasa de desarrollo de los rizoides de los protocormos de *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro*, en los 9 tratamientos durante 21 semanas de evaluación.

cativo en la tasa de crecimiento, teniendo en cuenta que cada especie posee en cualquier etapa de su ciclo de vida, y para cualquier conjunto de condiciones de estudio, una temperatura mínima por debajo de la cual no crece, una temperatura óptima (o rango de temperaturas) a la cual crece a máxima velocidad, y una temperatura máxima por encima de la cual la planta no crece e incluso puede morir.

La oxidación fenólica es un factor importante que puede ocasionar serios problemas en el establecimiento y la supervivencia de los explantes de la mayoría de las especies. Cuando los tejidos son dañados se liberan compuestos fenólicos que se manifiestan con un ennegrecimiento del medio de cultivo alrededor del explante, que se puede extender a todo el medio, provocar daños al crecimiento y hasta la muerte del explante.

Una de las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica es agregar antioxidantes al medio de cultivo, los que son inhibidores de la polifenoloxidasas o ad-

sorbentes. Entre los más empleados se pueden citar los ácidos ascórbico, cítrico y málico y carbón activado (Pedroza y Micán, 2006). Thorpe *et al.* (1991) recomiendan la adición de carbón activado, de 0,1- 5%, en el medio de cultivo para evitar los efectos de la oxidación de los explantes. En general, se usa para absorber compuestos tóxicos de la microatmósfera gaseosa o los reguladores de crecimiento en exceso que están presentes en el medio de cultivo.

### **Establecimiento de concentraciones de carbón activado y ácido indol acético con el máximo desarrollo para *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro***

Al finalizar las 21 semanas se estandarizó el tratamiento con mayor desarrollo para la micropropagación de las réplicas; se adaptaron los vástagos en el tratamiento 5 con máximo desarrollo, que contenía carbón activado en un porcentaje de 0,5% y la auxina ácido indol acético al 0,5 mg/L<sup>-1</sup> (T5). De esta forma, el



carbón activado cambia el clima luminoso, porque oscurece el medio y como resultado de ello permite la formación de las raíces y el crecimiento puede ser modificado. Puede promover la embriogénesis somática. El carbón activado se usa en porcentajes de 0,2-3,0%, se produce por carbonización de la madera a alta temperatura en presencia de vapor (Pierik, 1990; Pérez y Martínez, 1994).

La adición al medio de cultivo de carbón activado es un método que ha sido empleado por una gran cantidad de investigadores y se ha demostrado que influye positivamente en la germinación y el crecimiento de las orquídeas sobre todo de aquellas que son propensas a la fenolización (Thompson, 1975; Singh, 1981; Pierik, 1990; Pedroza y Micán, 2006; Pedroza, 2009). Además, es importante tener en cuenta que la exudación de fenoles fitotóxicos durante el cultivo de tejidos de orquídeas constituye un serio problema para su cultivo *in vitro*, y que la vía más efectiva para solucionar este problema es realizar cambios frecuentes al medio de cultivo o añadir carbón activado.

Arditti y Ernst (1993), plantearon que entre las posibles explicaciones al efecto positivo que ejerce el carbón activado en el cultivo de tejidos de orquídeas se encuentra el aumento de la aireación del medio de cultivo. Una segunda razón es que absorbe el etileno, el cual puede inhibir el crecimiento y la diferenciación, y basado en el estudio de las características de absorción y cambios que se producen en el medio de cultivo durante el autoclavado el carbón activado absorbe el 5-hydroxymethylfurfural que se forma por la deshidratación de la sacarosa durante este proceso el cual es inhibidor del crecimiento así como productos fenólicos y carboxílico producidos por los tejidos. El carbón también puede absorber las hormonas vegetales y las vitaminas lo que explica por qué en ocasiones puede ser inhibidor del crecimiento. De igual forma, el carbón activado mejora el desarrollo tanto de los 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 al.*, 1995).

El papel central de la auxina es la estimulación de la producción de elongación celular, expansión de los tejidos y formación de raíces adventicias; además, inhibe la formación de vástagos axilares y adventicios, mientras que con altas concentraciones no se producen raíces y hay formación de callo (Azcon y Talon, 2000; Rietsema *et al.*, 1953; Lluna, 2006; Pedroza, 2008).

La función del carbón activado al 0,5% en este cultivo fue brindar un medio adecuado y estable a las plántulas para su desarrollo y crecimiento. Además, el carbón activado estabiliza el pH, pero señalan que en algunos casos tiene un efecto inhibidor debido a la absorción de reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, contenidos tanto en el medio como liberados por las plantas. Puede absorber compuestos orgánicos (auxinas-citoquininas) y pigmentos tóxicos (fenol-melanina) (Pedroza, 2008).

De acuerdo con el análisis de varianza (Anava) realizado para el número total de protocormos desarrollados de la especie *M. nutans* en los tratamientos evaluados, se presentaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos para el desarrollo de los protocormos en cada periodo en que se evaluó la germinación (tabla 4).

De este modo, se rechazó la hipótesis nula (Ho), y para hallar las diferencias que existían entre los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey, procedimiento conocido como diferencia mínima significativa honesta (DMSH). De esta forma, encontramos que el tratamiento 5 (CA 0,5%; AIA 0,5 mg/l<sup>-1</sup>) es el mejor para el desarrollo de protocormos de *M. nutans*, seguido de los tratamientos 6 (CA 0,5%; AIA 1,0 mg/l<sup>-1</sup>), 4 (CA 0,5%; AIA 0,0 mg/l<sup>-1</sup>), 2 (CA 0,0%; AIA 0,5 mg/l<sup>-1</sup>), 3 (CA 0,0%; AIA 1,0 mg/l<sup>-1</sup>), 7 (CA 1,0%; AIA 0,0 mg/l<sup>-1</sup>), 8 (CA 1,0%; AIA 0,5 mg/l<sup>-1</sup>), 1 (CA 0,0%; AIA 0,0 mg/l<sup>-1</sup>), siendo el tratamiento 9 (CA 1,0%; AIA 1,0 mg/l<sup>-1</sup>) el menos adecuado para el desarrollo de protocormos de esta especie de orquídea.

**Tabla 4.** Análisis de varianza Anava

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Valor de F tabla	
					F 0,05	F 0,01
Tratamientos	8	71,29	8,9	21.19	2,10	2,82
Error experimental	81	34,5	0,42			
Total	89	105,79				

Es importante tener en cuenta que es necesario recultivar las plántulas de orquídeas dos o tres veces, hasta que alcanzan el tamaño suficiente para ser trasplantadas a condiciones *ex vitro*. De igual forma, el tiempo en que las orquídeas duran en el medio de cultivo *in vitro* antes de ser cultivadas *ex vitro* es generalmente entre 6 meses a 2 años.

### Efecto de la interacción del carbón activado y el AIA

En el proceso de evaluación del desarrollo de los protocormos de *Maxillaria nutans* se encontró que el tratamiento 5 realizado con 0,5% de carbón activado y 0,5 mg/L<sup>-1</sup> de AIA, generó la mayor tasa de su desarrollo bajo condiciones *in vitro* (figura 4). Además, la tasa media del desarrollo de los protocormos cultivados, de acuerdo con los niveles propuestos para su evaluación, fluctuó considerablemente entre los diferentes tratamientos. Este resultado evidencia que la respuesta morfogénica de los protocormos cultivados tiene una estrecha relación entre las concentraciones del carbón activado y el AIA.

Adicionalmente, es importante resaltar que los tratamientos 1, 2, 3, 7, 8 y 9 sin carbón activado, presentaron la tasa media de desarrollo más baja de todo el diseño experimental. Los resultados obtenidos muestran que la tasa media de desarrollo de los protocormos

cultivados más alta del diseño experimental fue presentada por los tratamientos que contenían carbón activado al 0,5 % y AIA en concentraciones de 0,5 mg/L<sup>-1</sup> y 0,1 mg/L<sup>-1</sup> lo cual indica que el efecto de este fitorregulador se ve potencializado con la interacción del carbón activado en las concentraciones anteriormente mencionadas. Es importante tener un medio enriquecido con carbón activado en un porcentaje de 0,5% porque contrarresta la fenolización y evita la oxidación de los explantes; sin embargo, si se agrega un porcentaje mayor al 0,5%, las concentraciones del agar deben aumentar para que no se afecte el medio de cultivo. Los protocolos de cultivo *in vitro* varían de acuerdo con cada especie, ya que cada una se desarrolla y se adapta a las condiciones del cultivo *in vitro* de formas diferentes.

En términos generales, en los protocormos bajo el tratamiento 5 de máximo desarrollo se logró la opción de emplear el protocolo como una alternativa para la recuperación de las poblaciones de *M. nutans* en los ecosistemas andinos colombianos, teniendo en cuenta que esta especie tiene una amplia distribución en ambientes abiertos, bastante iluminados, a fin de colonizar los lugares con intervención antropogénica (Perea, 1982; Tiago, 2005; Pedroza y Donado, 2006; Fernández y Hernández, 2007; Oliveira y van den Berg, 2007). En el protocolo establecido en este trabajo es importante tener en cuenta que la utilización de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es próspera a

fin de contribuir con la recuperación medioambiental y la comercialización de orquídeas.

## Conclusiones

El estudio de la evaluación de diferentes concentraciones del carbón activado (CA) y el ácido indol acético (AIA) en el desarrollo de protocormos de orquídeas *Masdevallia coccinea* y *Maxillaria nutans* bajo condiciones *in vitro*, permite concluir que los protocormos de *Masdevallia coccinea* no respondieron en su desarrollo morfofisiológico porque ellos se encontraban inmaduros en el periodo de latencia.

En el estudio del desarrollo de los protocormos de *Maxillaria nutans*, se encontró que el tratamiento 5 (0,5% carbón activado y 0,5 mg/l<sup>-1</sup> ácido indol acético) favorece el desarrollo de las plántulas completas en 18 semanas. El carbón activado es un importante sustrato en el desarrollo de los protocormos de orquídeas, ya que permite que los rayos de luz no lleguen directamente a los protocormos generando su enraizamiento.

## Agradecimientos

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

## Referencias bibliográficas

- Arditti, J., Ernst, R. 1993. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley and Sons. pp. 87-607.
- Azcón-Bieto J., Talón M. 2000. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana de España, S.A. 522 p.
- 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.
- Calderón, E. 2007. *Libro rojo de plantas de Colombia*. Volumen 6, *Orquídeas*, primera parte. Bogotá: ARFO, pp. 155-156.
- 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.
- Cupitra, O. S. 2009. Perturbaciones en la diversidad vegetal por pérdida de cobertura por implementación de modelos productivos en los municipios de Timba y Suárez en el departamento del Cauca. *Libro de Resúmenes: V Congreso Colombiano de Botánica*. San Juan de Pasto: Asociación Colombiana de Botánica. pp. 64.
- Davies, P. J. 1987. Plant hormones and their roles in plant growth and development. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers. 681 p.
- Devesa, J. A. 1997. Plantas con semilla. En: Jesús Izco (ed). *Botánica*. Madrid: McGraw-Hill. pp. 541-580.
- Dixon, K. 1987. Raising terrestrial orchids from seed. En: W. K. Harris (ed.). *Modern orchid growing for pleasure and profit*. Adelaide: Orchid Club of South Australia. pp. 47-100.
- Escudero, A., Iriondo, J. A. 2009. Restauración de poblaciones de plantas amenazadas. *Libro de Resúmenes: I Congreso Colombiano de Restauración Ecológica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- 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.
- Flórez, V., Pedroza, J. 2006. *Germinación y dormancia en semillas*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. pp. 49-52.
- Instituto Alexander von Humbolt. 1997. *Informe nacional sobre el estado de biodiversidad: Especies de plantas superiores amenazadas*. Colombia. 391 p.
- Jann R. C., Amen, R. D. [1980]. 2006. What is germination? En: V. Flórez, J. Pedroza. *Germinación y dormancia en semillas*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

- Lluna, R. 2006. Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. *Horticultura*, pp. 22-26.
- Magdaleno, F. 2009. Restauración de bosques riparios de ríos y humedales. *Libro de Resúmenes: I Congreso Colombiano de Restauración Ecológica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Margara, J. 1988. *Multipliación vegetativa y cultivo in vitro: los meristemos y la organogénesis*. Madrid: Mundi-Prensa. 232 p.
- Martin, K. 2003. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ispea malabarica* (Reich. f.) J. D. Hook, an endangered orchid. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 39: 322-328.
- Montoya, L. M. 1991. *Cultivo de tejidos vegetales*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. 77 p.
- 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* Bl, a terrestrial orchid. *Phytomorphology*, 48: 179-186.
- Okada, A. 2001. La biodiversidad y los peligros que la amenazan. En: Margarita Perea Dallos (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.
- Ospina, M., Dressler, R. L. 1979. *Orquídeas de las Américas*. Bogotá: Arco. 496 p.
- 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. 2008. *Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones in vitro*. Bogotá: Universidad Distrital FJC. pp. 186-194.
- Pedroza, J. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indol acético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1): 17-32.
- 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 *Comparettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 41: 838-843.
- Pedroza, J., Micán, Y. 2006. Asymbiotic 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. pp. 40.
- Perea, M. 1982. *Biotecnología agrícola mediante la utilización de los sistemas in vitro*. Bogotá: Zamora.
- Pérez G., Martínez, J. 1994. *Introducción a la fisiología vegetal*. Madrid: Mundi-Prensa. pp. 218.
- Pierik, R. L. M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa. 326 p.
- 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.
- Rietsema, J., Satina, S., Blakeslee, A. F. 1953. The effect of indol-3- acetic acid on *Datura embryos*. *Proc Nat Acad Sci*, 39: 924-933.
- Rivera, G. 1998. *Orquídeas: generalidades y cultivo*. Heredia: Efun. 266 pp.
- Salisbury, F., Ross, C. 2000. *Fisiología vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. España: Thomson editores Paraninfo. Pp. 573-574.
- Sarmiento, T. J. 2009. Colección CEPAC Orquídeas. En: C. G. Santos, J. L. Fernández, T. J. Sarmiento (eds.). *Colecciones especializadas para la conservación, CEPAC. Guía ilustrativa. Jardín Botánico José Celestino Mutis*. Bogotá, D.C.: Imprenta Nacional. pp. 165-172.
- 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.
- Sing, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *Am Orch Soc Bull*, 50 (4): 416-418.
- Steel, R., Torrie, J. 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2 ed. Bogotá: McGraw Hill. pp. 328-367.
- Taiz, L., Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. 2 ed. Sunderland: Sinanuer Associates. 792 pp.
- Takahashi, K., Ogiwara, I., Acoda, N. 2000. Seed germination of *Habenaria radiata* (Orchidaceae: Orchideae) *in vitro*. *Lindleyana*, 15: 59-63.
- Thompson, P. A. 1975. Germination of seeds of *Oncidium* and *Odontoglossum* species. *Orchid review*, 83: 375-379.
- Thorpe, T. A., Harry, I. S., Kumar, P. P. 1991. Application of micropropagation to forestry. En: *Micropropagation, technology and applications*. Debergh y Zimmermann (eds.). Kluwer Academic Press. pp. 311-316.
- 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. 139 p.
- 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-Arbelaeza*, 5 (11): 87-96.
- Zamora, R. 2009. Las interacciones ecológicas como motores de la restauración de la biodiversidad en hábitats degradados. *Libro de Resúmenes: I Congreso Colombiano de Restauración Ecológica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- 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.