

# Establecimiento *in vitro* de protocormos de *Prosthechea* sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético

Arlette Ivone Gil Clavijo<sup>1\*</sup>, Diego Fernando Contreras Pico<sup>2</sup>,  
Luis Carlos Gutiérrez Rojas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Cundinamarca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Ingeniería Agronómica, Grupo de investigación PROSAFIS, Diagonal 18 N° 20-29, Fusagasugá, Colombia.

\*Autor para correspondencia: arlettegil@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidad de Cundinamarca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Ingeniería Agronómica, semillero de investigación SEMINAC, Diagonal 18 N° 20-29, Fusagasugá, Colombia.

***In vitro* establishment of *Prosthechea* sp. protocorms under different concentrations of naphthalene acetic acid.**

## ABSTRACT

*Prosthechea* sp. is a wild orchid craved by the color and shape of its flowers that is disappearing from the environment because of deforestation and its removal from the population present in the rural area of the Fusagasugá municipality (Cundinamarca, Colombia). The effect of four concentrations (0; 1,5; 3 and 4 mg/l<sup>-1</sup>) of Naphthalene acetic acid (NAA) was proved on the development of *Prosthechea* sp. protocorms. The bioassay was conducted under *in vitro* conditions for 42 weeks, in an asymbiotic relationship. The rooting media supplemented with 1,5 mg/l<sup>-1</sup> NAA had no effect on root formation, however the protocorms proliferation was presented by adventitious gemmation in 80%. The concentrations of 3 and 4 mg/l<sup>-1</sup> NAA had a development of seedlings in 70% and 65% respectively, introducing abundant thick roots and root hairs. It was observed the triple response in the treatments with the highest NAA concentrations because of the ethylene synthesis, affecting the root geotropism. This research will serve as basis for future multiplication and conservation projects, contributing to the preservation of the wild flora and genetic resources with great ecological and economic potential such as orchids.

**Key words:** micropropagation, asexual reproduction, auxins.

**Editor:** Hernández Fernández, J.

**Citation:** Gil, A., Contreras, D & Gutiérrez, L. (2016). Establecimiento *in vitro* de protocormos de *Prosthechea* sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético. *Revista Mutis* 6(1), 6-15, doi: <http://dx.doi.org/10.21789/22561498.1108>

**Received:** January 29, 2016; **Accepted:** April 11, 2016; **Published on line:** May 31, 2016.

**Copyright:** ©2016 Gil, A., Contreras, D & Gutiérrez, L. This is an open-access article, which permits unrestricted use, distributions and reproduction in any me=diu, provided the original author and source are credited.

**Competing Interests:** The authors have no conflict of interest.

## RESUMEN

*Prosthechea* sp. es una orquídea silvestre apetecida por el color y forma de sus flores, que está desapareciendo paulatinamente en el municipio de Fusagasugá (Cundinamarca, Colombia) a causa de la deforestación y extracción por parte de la población presente en la zona rural. Se probó el efecto de cuatro concentraciones (0; 1,5; 3 y 4 mg/l-1) de ácido naftalenacético (ANA) sobre el desarrollo de protocormos de *Prosthechea* sp. El cultivo se llevó a



cabo bajo condiciones in vitro durante 42 semanas, de manera asimbiótica. El medio de enraizamiento suplementado con 1,5 mg/l-1 de ANA tuvo un efecto nulo sobre la formación de raíces, sin embargo, se presentó proliferación de protocormos por gemación adventicia en un 80 %. Las concentraciones de 3 y 4 mg/l-1 de ANA obtuvieron desarrollos de plántulas en 70 y 65 % respectivamente, al presentar abundantes raíces gruesas y pelos radicales. Se observó la respuesta triple en los tratamientos con mayor concentración de ANA debido a la síntesis de etileno, afectando el geotropismo de la raíz. Esta investigación servirá como base para futuros proyectos de multiplicación y conservación, contribuyendo con la preservación de la flora silvestre y los recursos genéticos con gran potencial ecológico y económico como lo son las orquídeas.

**Palabras clave:** micropropagación, reproducción asexual, auxinas.

## INTRODUCCIÓN

En el libro rojo de especies endémicas amenazadas de Colombia, dedicado únicamente a la familia Orchidaceae, se catalogan tres géneros con seis especies en peligro crítico (CR) y siete géneros con 64 especies en peligro (EN), además de incluir 18 géneros en diferentes categorías de riesgo (Salazar-Holguín *et al.*, 2010). Muchas de estas especies son endémicas y se encuentran amenazadas por la deforestación y el deterioro del hábitat, la recolección excesiva y el aumento de la frontera agrícola, factores que contribuyen a la desaparición de estas orquídeas de su medio natural (Calderón, 2007).

Dentro de las medidas propuestas para la conservación de las orquídeas están los programas de propagación artificial de especies en peligro de extinción (Arditti & Ernst, 1993). En condiciones naturales, las semillas dependen obligadamente del establecimiento de una simbiosis con un hongo específico para que pueda ser llevado a cabo el proceso de germinación, de esta compleja interacción depende el éxito en las primeras etapas de desarrollo, que podría tardar varios años, lo que la hace un medio limitado de propagación (Izco *et al.*, 2004).

Las semillas de las orquídeas tienen una estructura muy simple que consiste de un embrión reducido a unas pocas células y rodeado de una testa usualmente transparente y carente de endospermo (Arditti & Abdul, 2000). Las semillas de las orquídeas son diminutas, extremadamente livianas y producidas en gran número. El número de semillas por fruto puede variar desde 20 hasta 4'000.000 (Ruiz *et al.*, 2008).

La alta producción de semillas ha sido descrita como una característica común de aquellas plantas que tienen requerimientos muy específicos en la germinación, tales como micotrofia (Roy *et al.*, 2011). En condiciones naturales las semillas requieren necesariamente la presencia e infección de un hongo simbiote que actúa a manera de "endospermo" exógeno y le proporciona la fuente de carbohidratos y nutrientes necesarios para el proceso de germinación (Otero & Bayman, 2009). Esta asociación micorrízica es típica de las orquídeas, donde el flujo de carbono va del hongo a la planta y no al revés (Barba *et al.*, 2001).

Durante la germinación el embrión aumenta su volumen para llenar el espacio interior de la testa hasta romperla y emerger (fase 1). A continuación se forma una estructura tuberizada (o masas de células indiferenciadas) llamada protocormo, con apariencia esférica ovoide y de color verde (fase 2). Siempre posee micorriza sobre la cual, eventualmente, se desarrollarán los primordios caulinares y radicales (fases 3 y 4) (Ávila-Díaz *et al.*, 2009).

El protocormo es una estructura organógena particular que procede del embrión, compuesta generalmente de una yema terminal y una corona de rizoides (Sai-prasad & Polisetty, 2003). El cuerpo consiste de largas células parenquimáticas que acumulan sustancias de almacenamiento (Chugh *et al.*, 2009). Las raíces, siempre adventicias, se forman más tardíamente en la base de los nudos de los tallos con hojas. El protocormo está recubierto de una epidermis que puede llegar a producir otros protocormos por gemación adventicia a partir de los tejidos superficiales (Margará, 1988).

El protocormo puede continuar creciendo durante semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie, hasta alcanzar la edad apropiada para producir raíces y hojas; el abastecimiento por parte del hongo de los azúcares y nutrientes necesarios cesa en el momento en el que la planta joven tiene la

capacidad de producirlos por sí misma (McKendrick, 2000). Esto indica que el protocormo tiene la función de actuar como un órgano de almacenamiento de nutrientes que más adelante permite la aparición de los brotes foliares y radicales (Pedroza-Manrique & Alonso, 2009).

La emergencia de los protocormos en la ontogénesis de las orquídeas puede ser considerado como un paso necesario en la transición de la reproducción sexual a la asexual, presente de manera exclusiva en este grupo de plantas (Mahendran & Narmatha, 2012). Debido a esta facilidad, los protocormos se han utilizado como explantes en trabajos de embriogénesis somática y organogénesis directa e indirecta, cuyas técnicas son aplicadas ampliamente en la micropropagación vegetativa (Tuong *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008).

En 1824 se observó por primera vez la asociación entre la semilla y el hongo simbiote. Solo hasta 1899 se establecieron los requerimientos de la micorriza para la germinación de las semillas de orquídeas. Experimentos realizados por Knudson en la germinación de *Cattleya shoroederae* Rchb.f. x *Cattleya gigas* Rchb.f. (1918) y *Cattleya labiata* Lindl. x *Cattleya aurea* Lindl. (1919), permitieron confirmar que estas semillas pueden germinar sin el hongo si se usan cierto tipo de azúcares simples y nutrientes en el medio de cultivo (Wing Yam & Arditti, 2009).

Los métodos de cultivos *in vitro* se presentan como una alternativa para suplir las condiciones necesarias para el desarrollo de las semillas de orquídea, ya sea facilitando la simbiosis o en medios asimbióticos donde se desplaza el papel del hongo simbiote (Chang & Chang, 1998). Mediante diversas técnicas y medios de cultivo se logra estimular el proceso germinativo y también acortar el tiempo de desarrollo de las plántulas, por lo que es necesario crear protocolos de propagación *in vitro* con la expectativa de ser aplicados en programas de multiplicación masiva de especies en peligro de extinción, y contribuir sustancialmente también a proyectos de conservación y posteriormente a planes de reintroducción al medio natural (Rodríguez *et al.*, 2009).

El uso específico de ácido naftalenacético en las etapas de germinación y desarrollo de las semillas de orquídea en medio *in vitro*, permite aumentar la tasa de germinación y reducir el tiempo de desarrollo de los protocormos, cualidades buscadas para un eficiente

método de propagación a gran escala (Pedroza-Manrique & Micán-Gutiérrez, 2006). Por ejemplo, con *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. fue posible obtener cerca de 330.000 plántulas en 40 semanas, mientras que con *Comporettia falcata* Poepp. & Endl. se obtuvieron 160.000 plántulas en 21 semanas, en ambos casos a partir de una sola cápsula (Pedroza-Manrique *et al.*, 2005).

El cultivo de orquídeas en el municipio de Fusagasugá es raramente dado u ocasionalmente está presente en colecciones privadas, sin embargo se utilizan métodos vegetativos de propagación que a veces resultan ser limitados e ineficientes (Aubry, 2003). El objetivo de esta investigación fue establecer el desarrollo de protocormos de la orquídea *Prosthechea* sp. presente en la zona rural del municipio de Fusagasugá, bajo condiciones *in vitro* mediante la utilización de cuatro concentraciones de ácido naftalenacético, con el fin de ser usados como base para futuros proyectos de multiplicación y conservación que servirán como referente para otros trabajos en este género, contribuyendo con la preservación de la flora silvestre y los recursos genéticos con gran potencial ecológico y económico. En este caso, *Prosthechea* sp. es una especie útil por su uso en cruzamientos como patrones para híbridos intergenéricos (Arditti, 2008).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Las cápsulas de *Prosthechea* sp. se recolectaron de plantas silvestres en la vereda "La Aguadita" del municipio de Fusagasugá (Cundinamarca), por la carretera que conduce al parque "San Rafael", en el punto 4°23'32"N y 74°18'48"W, a una altitud de 1.909 msnm, temperatura media de 17 °C, humedad relativa media de 85 % y precipitación anual de 1.250 mm.

El tiempo de maduración de las cápsulas era desconocido, y se estableció su estado de madurez teniendo en cuenta el color de los tejidos (coloración amarillenta). Estas se colocaron en bolsas de papel debidamente marcadas y fueron trasladadas en nevera de icopor hacia el laboratorio para su posterior siembra, realizada 48 horas después.

La fase del cultivo *in vitro* se realizó en el laboratorio de propagación vegetal de la estación experimental agroforestal "Chilacas", ubicada en la carretera

Zipaquirá-Pacho, kilómetro 30, vereda “La Cabrera”, municipio de Pacho (Cundinamarca), ubicada a una altura de 2.050 msnm, temperatura media de 17,5 °C y humedad relativa del 75 %. Las instalaciones contaban con áreas especializadas y condiciones de asepsia.

### Desinfección y siembra del material vegetal

En el laboratorio, las cápsulas recolectadas fueron lavadas superficialmente con abundante agua y jabón. Luego se desinfectaron durante 10 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 5 %. A continuación se enjuagaron dos veces con agua esterilizada y luego se sumergieron en alcohol al 70 % por 1 minuto. Posteriormente, se llevaron a la cámara de flujo laminar, donde se dejaron escurrir sobre servilletas estériles y finalmente fueron flameadas con el mechero de Bunsen. Las semillas extraídas asépticamente fueron esparcidas sobre la superficie del medio de cultivo, en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, que contenía cada uno 25 ml del medio de cultivo, de acuerdo al tratamiento.

### Diseño experimental

El ensayo se arregló en un diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos y 20 repeticiones, donde cada frasco de vidrio correspondió a la unidad experimental. Todos los medios fueron expuestos a 16 horas de fotoperíodo con luz blanca (lámpara fluorescente) y 8 de oscuridad, en cuarto de incubación a una temperatura de 25 °C. El tiempo total del experimento fue de 42 semanas.

El experimento se dividió en dos fases: Germinación de semilla y establecimiento de protocormos, y diferenciación y enraizamiento de protocormos.

#### *Germinación de semilla y establecimiento de protocormos.*

El medio de cultivo para la iniciación o germinación a base de sales Murashige y Skoog (MS) (1962), en concentración de 4,43 g/l<sup>-1</sup>, adicionado con fécula de maíz tal como se realizó con *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl., donde se agregaron 10 g/l<sup>-1</sup> y sin ningún regulador de crecimiento, de acuerdo con Pedroza-Manrique *et al.* (2010). Adicionalmente se utilizaron 4 g/l<sup>-1</sup> de agar, 30 g/l<sup>-1</sup> de sacarosa y myo-inositol en concentración de 0,1 g/l<sup>-1</sup>. El pH del medio se ajustó a 5,8.

### Diferenciación y enraizamiento de protocormos

Se tomaron como explantes los protocormos provenientes del medio de germinación y se subcultivaron en otro medio de cultivo, con cuatro niveles distintos de ácido naftalenacético (ANA) con el propósito de estimular el crecimiento y desarrollo radical. Este medio consistió en sales MS enriquecido con agua de coco, banano y manzana, 30 g/l<sup>-1</sup> de sacarosa y 4 g/l<sup>-1</sup> de agar. Los tratamientos comprendieron cuatro concentraciones diferentes de ANA (0; 1,5; 3 y 4 mg/l<sup>-1</sup>), para determinar su efecto sobre la formación de hojas y raíces. El medio se ajustó a un pH de 5,8 y se complementó con 2 g/l<sup>-1</sup> de carbón activado como antioxidante, para prevenir pérdidas por exudación de fenoles.

La respuesta de los protocormos en el medio de enraizamiento se evaluó cualitativamente a través de una escala con cuatro estados de desarrollo (tabla 1). A cada estado se relacionó un valor numérico para su posterior análisis estadístico. Esta evaluación se tomó de manera visual.

Tabla 1. Variable “respuesta” de protocormos de *Prosthechea* sp. a concentraciones de 0; 1,5; 3 y 4 mg/l<sup>-1</sup> de ANA.

Valor numérico	Respuesta
0	Muerte
1	Regeneración de protocormos
2	Primera raíz
3	Plántula (presencia de múltiples hojas primarias y raíces)

### Análisis estadístico

Se realizó análisis de contraste para observar las diferencias entre los tratamientos a través de la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), para un grado de significancia ( $\alpha$ ) de 0,05 (Milton, 2001). El análisis de variables categóricas se realizó a través del procedimiento CATMOD (Debnath, 2007; Debnath, 2008) del paquete estadístico SAS®, versión 9.0.

## RESULTADOS

### Germinación de semilla y establecimiento de protocormos

El tiempo de incubación de las semillas de *Prosthechea* sp. para la fase de germinación y establecimiento de protocormos fue de 21 semanas (figura 1). Casos similares ocurrieron con semillas de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl.,

donde el tiempo de germinación se llevó a cabo en 24 semanas (Pedroza-Manrique *et al.*, 2010), en *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. tomó 31 semanas (Pedroza-Manrique & Micán-Gutiérrez, 2006) y en *Epidendrum elongatum* Jacq., cerca de 30 semanas (Pedroza-Manrique & Alonso, 2009). Sin embargo, se han reportado tiempos de germinación de 9 semanas en *Cymbidium elegans* Lindl., según Pant & Pradhan (2010).



Figura 1. Protocormos de *Prosthechea* sp. desarrollados *in vitro* bajo diferentes concentraciones de ANA.

### 1. Diferenciación y enraizamiento de protocormos

Esta fase duró 21 semanas, período que permitió observar diferentes respuestas de diferenciación y en-

raizamiento de los protocormos de *Prosthechea* sp. entre los tratamientos evaluados, de acuerdo con el análisis de frecuencias (tabla 2) con las cuatro concentraciones de ANA en el medio de cultivo.

Tabla 2. Análisis de frecuencias de acuerdo a la respuesta de protocormos según la concentración de ANA en la orquídea *Prosthechea* sp.

Tratamiento (mg/l <sup>-1</sup> ANA)	Muerte (%)	Regeneración protocormos (%)	Primera raíz (%)	Plántulas (%)
0	90	0	0	0
1,5	20	80	0	0
3	0	15	15	70
4	0	20	15	65

Los resultados mostraron que en el medio de cultivo sin la adición de ANA (0 mg/l<sup>-1</sup>) se obtuvo el mayor porcentaje de muerte de protocormos (90 %), sin regeneración de alguno de ellos ni presencia de raíces ni plántulas.

El medio de cultivo adicionado con 1,5 mg/l<sup>-1</sup> de ANA presentó muerte de protocormos en un 20 %, pero obtuvo el mayor porcentaje en la regeneración de estos, en un 80 %. El crecimiento de los protocormos se caracterizó por la proliferación de nuevos

protocormos formando agregados sobre la superficie del medio, donde no hubo formación de estructuras radicales. La adición de pequeñas cantidades de auxina estimuló la regeneración secundaria de protocormos en *Prosthechea* sp. sin la formación de estructuras radicales, lo cual sugiere que el medio con  $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$  de ANA promovió inicialmente la formación de callo en esta especie.

La regeneración secundaria de protocormos también se presentó en los tratamientos con 3 y  $4 \text{ mg/l}^{-1}$  de

ANA pero en porcentajes más bajos, con 15 y 20 % respectivamente. Los protocormos desarrollados en los medios con 3 y  $4 \text{ mg/l}^{-1}$  de ANA se desarrollaron en plántulas con la formación de múltiples raíces, presentes en un 70 y 65 % respectivamente. En estos tratamientos el crecimiento radical obtuvo un aumento pronunciado en diámetro, tornándose grueso y cubierto por vellosidades (figura 2).



Figura 2. Plántulas de *Prosthechea* sp. desarrolladas a partir de protocormos bajo diferentes concentraciones de ANA.

El desarrollo radical fue superior al desarrollo foliar, con múltiple enraizamiento y longitud variable. En las plántulas obtenidas en los tratamientos con 3 y  $4 \text{ mg/l}^{-1}$  de ANA se observó la respuesta triple, correspondiente a la interacción etileno-auxina, donde se obtuvo el cambio de dirección en el alargamiento de las raíces. Sobre las raíces aéreas se formó el velamen, tejido característico de las raíces de orquídeas.

En el análisis de contraste chi-cuadrado no se presentaron diferencias entre los tratamientos de 3 y  $4 \text{ mg/l}^{-1}$  de ANA, al contrario del tratamiento con  $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$  de ANA que sí presentó diferencias estadísticas con respecto a ellos (tabla 3). Como no hubo regeneración de protocormos para el tratamiento sin ANA ( $0 \text{ mg/l}^{-1}$ ), este no se tuvo en cuenta para dicho análisis de contraste.

Tabla 3. Análisis de contraste chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con un grado de significancia ( $\alpha$ ) de 0,05 para concentraciones de ANA sobre desarrollo de protocormos de *Prosthechea* sp.

Contraste	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
$1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ vs. $3 \text{ mg/l}^{-1}$	3	51,16	<0,0001
$1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ vs. $4 \text{ mg/l}^{-1}$	3	41,58	<0,0001
$3 \text{ mg/l}^{-1}$ vs. $4 \text{ mg/l}^{-1}$	3	0,15	0,9858

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Germinación de semilla y establecimiento de protocormos

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio para *Prosthechea* sp., estos indican que los tiempos para germinación y establecimiento de protocormos son variables y característicos de cada especie de orquídea. Lo más relevante en cada caso es la obtención de protocormos con forma de pequeñas esferas de 2,5 mm de diámetro aproximadamente. Tanto en *Oncidium stramineum* Lindl. como en *Brassia verrucosa* Bateman ex Lindl., se formaron protocormos de entre 2 y 3 mm de diámetro (Flores-Escobar *et al.*, 2008; Flores-Escobar *et al.*, 2011).

### Diferenciación y enraizamiento de protocormos

Dentro del ciclo natural de desarrollo, el embrión de las orquídeas pasa al estado de protocormo y luego se desarrolla directamente a plántula (Flores-Escobar *et al.*, 2008; Jhonson *et al.*, 2007; Salazar & Cancino, 2012; Yamazaki & Kazumitsu, 2006). Se ha observado la sobreproducción de protocormos en muchos explantes de orquídeas cultivadas *in vitro*, mediante la adición de pequeñas cantidades de ANA, como en *Laelia speciosa* Kunth. con 0,5 mg/l<sup>-1</sup>, en *Cymbidium elegans* Lindl. con 0,5 mg/l<sup>-1</sup> y en *Melissa officinalis* Lindl. con 0,09 mg/l<sup>-1</sup>, el cual fue capaz de mejorar la producción de brotes foliares, aunque no promovió rizogénesis (Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2006; Pant & Pradhan, 2010).

Este comportamiento se debe a que el protocormo en condiciones naturales, es el órgano de almacenamiento compuesto por grandes células parenquimatosas que acumulan sustancias por largos períodos de tiempo hasta que las condiciones ambientales sean las adecuadas para la emergencia de las primeras hojas y raíces (Vinogradova & Andronova, 2002).

Resultados similares de regeneración secundaria de protocormos se encontraron en *Laelia speciosa* Kunth. con 1 mg/l<sup>-1</sup> de ANA, en *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. con 0,2 mg/l<sup>-1</sup> de ANA y en *Cymbidium* sp. con 0,1 mg/l<sup>-1</sup> de ANA (Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2008).

El ANA en concentraciones adecuadas puede favorecer la formación de raíces adventicias, tal como se encontró en *Coelogyne stricta* (D. Don) Schltr., donde pseudobulbos cultivados bajo 1 y 2 mg/l<sup>-1</sup> de ANA probaron ser los más efectivos en la generación del número de raíces por plántula (Basker & Bai, 2006). El etileno, sintetizado como consecuencia de elevadas cantidades de auxina en el medio, también participa en la diferenciación radical y está implicado en la inducción de raíces laterales y adventicias (Taiz & Zeiger, 2006).

Las auxinas de todos los tipos estimulan la producción de etileno en muchos tipos de células vegetales, en especial cuando se agregan cantidades elevadas de auxinas (Salisbury & Ross, 1994). La respuesta triple tiene implicaciones mecánicas, porque en condiciones naturales la acumulación de etileno en tejidos radiculares ayuda a perforar y guiar el crecimiento en suelos compactos (Montaldi, 1995). Sin embargo, se ha encontrado también que en bajas dosis el gas puede estimular la elongación de la raíz (Azcón-Bieto & Talón, 2000). Además las auxinas favorecen el crecimiento vertical o apical, por lo que estas raíces pudieron haber respondido al alargamiento por la presencia del ANA en el medio. Caso similar se observó en *Phaius tankervilleae* Rchb.f. donde la mayor extensión de las raíces se dio en presencia de 0,1 mg/l<sup>-1</sup> de ANA (Sultana *et al.*, 2012).

La falta de uniformidad en la respuesta del explante al medio se debe a varios factores como diferencias genéticas, competencia de nutrientes y microclimas al interior del vaso de cultivo (Vinogradova & Andronova, 2002).

El velamen desarrollado sobre las raíces consiste en una cobertura esponjosa de células muertas de color blanco, cuya función es la absorción hídrica, reduciendo la pérdida de agua y también está implicado en la protección mecánica de las raíces (Zotz & Winkler, 2013); es característico de las plantas con hábitos epífitos como las orquídeas y su presencia en medios *in vitro* se ha considerado un efecto secundario por la acción combinada del etileno y la auxina, tal como se obtuvo en esta investigación. Observaciones similares se registraron en *Cymbidium iridoides* D. Don. donde se presentaron raíces gruesas y con pelos radicales, en un medio con 1 mg/l<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA) (Pant & Swar, 2011).

## CONCLUSIONES

- La adición de ANA en el medio de cultivo *in vitro* para generación de protocormos y establecimiento de plántulas de *Prosthechea* sp. obtuvo resultados diferenciales en esta investigación, por lo que se hace necesario realizar estudios exhaustivos para implementar su utilización en la micropropagación de esta especie de orquídea.
- A partir de los resultados obtenidos en esta investigación se podrán realizar otros estudios del efecto de diferentes concentraciones de ANA sobre la obtención de protocormos y desarrollo de plántulas, con el objetivo de iniciar propagaciones masivas de *Prosthechea* sp. con fines de conservación de esta orquídea, inicialmente para la zona de influencia de Fusagasugá (Cundinamarca).

## AGRADECIMIENTOS

A la empresa GEOAMBIENTE-SAS por permitir la utilización de sus instalaciones para el desarrollo del experimento y al I.A. Luis Eduardo Vanegas por su colaboración en la realización de los cultivos *in vitro* en la fase experimental de esta investigación.

Al M.Sc. César Alfonso Ariza por su colaboración con los métodos estadísticos para el desarrollo de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arditti, J. & Ernst, R. (1993). *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley and Sons. 640 p.
- Arditti, J. & Abdul, A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications: Tansley review N° 110. *New Phytologist* 145, 367-421.
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of orchids*. 2 ed. Oxford, U.K.: Wiley-Blackwell. 1560 p.
- Aubry, Y. (2003). *Odontoglossum crispum*: An almost vanished species with a great legacy. *Newsletter of the central New York orchid society*, 4(7), 8-11.
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, L. & Salgado-Garciglia, R. (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 99, 335-343.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona: McGraw-Hill Interamericana/Edicions Universitat. 704 p.
- Barba, A., Luna, B. & Romero, J. (2001). *Micropropagación de plantas*. México D. F.: Trillas. 107 p.
- Basker, S. & Bai, N. (2006). Micropropagation of *Coleogyne stricta* (D. Don) Schltr. via pseudobulb segment culture. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 6(1), 31-35.
- Calderón, E. (ed). (2007). *Libro rojo de plantas de Colombia: Orquídeas*. Serie libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt – Ministerio del Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Colombia. Vol. 6, Primera parte. 828 p.
- Chang, C. & Chang, W. (1998). Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensiflorum* var. *misericors*. *Plant Cell Reports*, 17, 251-255.
- Chugh, S., Guha, S. & Rao, I. (2009). Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122, 507-520.
- Da Silva, S., Salgueiro, C., Aparecida, M., Da Silva, R. & Sato, A. (2006). *In vitro* propagation of *Melissa officinalis* L. and production of essential oil. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 2(2), 53-60.
- Debnath, S. C. (2007). Influence of indole-3-butyric acid and propagation method on growth and development of *in vitro*-and *ex vitro*-derived low-bush blueberry plants. *Plant Growth Regulation*, 51(3), 245-253.
- Debnath, S. C. (2008). Zeatin-induced one-step *in vitro* cloning affects the vegetative growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) micropropagules over stem cuttings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 93, 231-240.
- Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J., Gil-Vásquez, I. & Colinas-León, M. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo serie horticultura*, 14(3), 347-353.

- Flores-Escobar, G., Gil-Vásquez, I., Colinas-León, M. & Mata-Rosas, M. (2011). Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. *Revista Chapingo serie horticultura*, 17(1), 5-8.
- Izco, J., Bruges, M., Costa, M., Devesa, J., Fernández, F., Gallardo, T., Limona, X., Prada, C., Talavera, S. & Valdés, B. (2004). *Botánica*. 2ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 906 p.
- Johnson, T., Stewart, S., Dutra, D., Kane, M. & Richardson, L. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) - preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 90(3), 313-323.
- Mahendran, G. & Narmatha, B. (2012). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 135, 40-44.
- Margara, J. (1988). *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro*. Meristemos y organogénesis. Madrid: Ediciones Multiprensa. 17 p.
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Scotland, U.K.: Ceiba Foundation for Tropical Conservation. (pp. 4-9).
- Milton, J. S. (2001). *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España. pp. 247-254.
- Montaldi, E. (1995). *Principios de Fisiología Vegetal*. La Plata: Ediciones DUR. 298 p.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Otero, J. & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270-276.
- Pant, B. & Pradhan, S. (2010). Micropropagation of *Cymbidium elegans* Lindl. through protocorm and shoot tip culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. Conference, December 3-5, Bangladesh. pp. 123-130.
- Pant, B. & Swar, S. (2011). Micropropagation of *Cymbidium iridioides*. *Nepal Journal of Science and Technology*, 12, 91-96.
- Pedroza-Manrique, J., Fernández-Lizarazo, C. & Suarez-Silva, A. (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41(6), 838-843.
- Pedroza-Manrique, J. & Micán-Gutiérrez, Y. (2006). Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 42(6), 543-547.
- Pedroza-Manrique, J. & Alonso, J. (2009). 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*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 17-32.
- Pedroza-Manrique, J., Serrato-Muñoz, L. & Castaño-Robayo, M. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indolacético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 86-102.
- Rodríguez, J., Gómez, A., Pasqual, M., Rodríguez, F. & Aparecida, F. (2009). Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. *Ciencia Rural*, 39(3), 772-777.
- Roy, A., Patel, R., Sajeev, S. & Deka, B. (2011). Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff Ex. Lindl. (Blue Vanda): an *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 128, 325-331.
- Ruiz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H., Azpíroz, R. & Moreno, M. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Encyelia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 77, 203-215.

- Saiprasad, G. & Polisetty, R. (2003). Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39, 42-48.
- Salazar-Holguín, F., Benavides-Molineros, J., Trespalacios-González, O. & Pinzón, L. (2010). *Informe sobre el Estado de los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente*. Instituto de investigación de recursos biológicos "Alexander von Humboldt". Bogotá D. C.
- Salazar, S. & Cancino, G. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 53-59.
- Salisbury, F. & Ross, C. (1994). *Fisiología Vegetal*. México D. F.: Grupo Editorial Iberoamericana S. A. 759 p.
- Sultana, N., Jahan, T., Baraj, T., Akhter, M. & Ara, N. (2012). Tissue culture propagation of tropical orchid (*Pathus tankervilleae*) plant. *Journal of Innovation & Development Strategy (JIDS)*, 6(1), 81-85.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. 4th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates Publishers.
- Tuong, L., Takamura, T. & Tanaka, M. (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*, 166, 1443-1449.
- Vinogradova, T. & Andronova, E. (2002). Development of orchid seed and seedlings. En *Orchid biology: reviews and perspectives*, VIII. Springer Science. 599 p.
- Wing, T. & Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Review Article. *Plant Biotechnology Reports Impact Factor*, 3, 1-56.
- Yamazaki, J. & Kazumitsu, M. (2006). In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98(6), 1197-1206.
- Zhao, P., Wu, F., Feng, F. & Wang, W. (2008). Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 44, 178-185.
- Zotz, G. & Winkler, U. (2013). Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia*, 171(3), 733-741.