

PEREZ ARBELAEZIA

Nº 14 - FEBRERO 2003

ISSN 0120-7717



Llerasia Lindenii Triana

Jardín Botánico José Celestino Mutis
Bogotá D.C., Colombia





ENRIQUE PÉREZ ARBELÁEZ

1896 – 1972

Fundador del Jardín Botánico José Celestino Mutis

Publicación del Jardín Botánico José Celestino Mutis, dedicada a la memoria de su fundador, el doctor Enrique Pérez Arbeláez, quien consagró su vida a institucionalizar la tradición científica de Colombia y a fomentar la investigación, divulgación y defensa de nuestros recursos naturales.



Mutisia clematis L.

Planta ornamental nativa tomada como emblema del Jardín Botánico. Debe su nombre a la exaltación que el ilustre botánico Linneo quiso hacer en homenaje a José Celestino Mutis, designado con el nombre de Mutisia.

Es una planta trepadora con zarcillos, hojas tomentosas en tonalidades verde grisáceo y flores pendulares, que con su color rojo vivo atraen insectos y colibríes.



ALCALDÍA MAYOR
DE BOGOTÁ D.C.

Alcalde Mayor

Antanas Mockus Sívickas

**JARDÍN BOTÁNICO
"JOSÉ CELESTINO MUTIS"**

Junta Directiva

Julia Miranda Londoño
Luz Stella Vargas Hernández
Alberto Gómez Mejía
Germán Andrade Pérez
Mónica Gómez de Espinosa
Marco Palacios Rozo

Director

Enrique Uribe Botero

Secretaria General

Catalina Nagy Patiño

Jefe de Planeación

Jaime Rudas Ll.

Subdirección Educativa y Cultural

María Margarita Gaitán Uribe

Subdirección Científica

María Elvira Madriñán Saa

Subdirección Técnica Operativa

Francisco Sánchez Hurtado

PEREZ ARBELAEZIA

Número 14 - Febrero de 2003

Publicación anual

PEREZ - ARBELAEZIA es la publicación científica y tecnológica
del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis.

PEREZ - ARBELAEZIA publica artículos, originales e inéditos, que cubran temas de investigación en ciencias puras o aplicadas sobre botánica, ecología, conservación, ciencias biológicas, recursos naturales renovables y medio ambiente, al igual que ensayos, revisiones, conferencias y reuniones que contribuyan a la profundización del conocimiento y constituyan aportes significativos al objeto de su temática.

Comité Editorial

Francisco Sánchez Hurtado
Gustavo Morales Liscano

Editor

César Escallón Estupiñán

Comité Científico

César Barbosa Castillo	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – Ideam
José Luis Fernández Alonso	Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia
Jesús Orlando Vargas Ríos	Departamento de Biología Universidad Nacional de Colombia
Fabio González Garavito	Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia
Rocío del Pilar Cortés Ballén	Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales Universidad Distrital Francisco José de Caldas
Santiago Madriñán Restrepo	Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes

Ilustración Carátula

Llerasia Lindenii Triana

La especie, representada en arbolitos de hasta 6 metros, habita en los cerros que se extienden alrededor de la Sabana de Bogotá. Su rango de distribución altitudinal la sitúa entre los 2.600 y los 3.500 metros.

PEREZ - ARBELAEZIA

Publicación anual

© 2003 - Jardín Botánico José Celestino Mutis

ISSN 0120-7717

*La reproducción total o parcial de un artículo debe citar la fuente.
Corresponde a los autores la total responsabilidad de las ideas,
textos y conceptos emitidos en sus respectivos artículos.*

Canje

Óscar Ovalle Navarro

Biblioteca Enrique Pérez Arbeláez

Diseño y diagramación

Sanmartín Obregón & Cía. Ltda.

Impresión

Sanmartín Obregón & Cía. Ltda.

Ilustración carátula

Ulexia Lindenii Triana

FLORA DE LA REAL EXPEDICIÓN BOTÁNICA

DEL NUEVO REINO DE GRANADA (1783-1816)

Tomo XLVII, Compuestas, Tribu Astereas, LÁMINA LI

1989, Ediciones de Cultura Hispánica, Madrid.

Cortesía del Instituto Colombiano de Antropología e Historia ICAN

Jardín Botánico José Celestino Mutis

Av. (Cll.) 57 No. 61-13 • Tel.: 437 7060 • Fax: 630 5075

bogotanic@jbb.gov.co • www:jbb.gov.co

CONTENIDO

Presentación	7
Cambio en la cobertura vegetal del bosque húmedo tropical, Parque Natural Nacional Tinigua, Colombia	
Juan Pablo Giraldo Gómez	9
Composición, heterogeneidad espacial y conectividad de paisajes de las áreas rurales del Distrito Capital de Bogotá, Colombia	
Gabriel Eduardo Páramo Rocha	25
Estudios preliminares sobre el efecto de las poliaminas putrescina y espermidina en la micropropagación de <i>Stanbopea wardii</i> Lodd ex Lind (Orchidaceae)	
Claudia Patricia González Rojas y Germán Pachón Ovalle	73
Ecología del paisaje y dinámica de la vegetación en el sector medio del páramo de Sumapaz – Localidad 20 del Distrito Capital, corregimientos de Nazareth y Betania	
Leyla M. Montenegro-Calderón, Gabriel Martínez, Óscar Rivero y Sandra Zapata	93
Ecología de las especies invasoras	
Héctor Felipe Ríos y Orlando Vargas	119
El pastoreo de ganado y su impacto en los ecosistemas naturales: el caso de los páramos andinos	
Orlando Vargas Ríos, Julia Premauer, Marcela Zalamea y Camilo Cárdenas	149

PRESENTACIÓN

Constituye motivo de gran satisfacción para la Dirección del Jardín Botánico presentar esta corta nota con ocasión de la entrega número 14 de la revista *Perez - Arbelaezia*. En esta edición la revista presenta, en seis artículos, los resultados de investigaciones dirigidas a cubrir aspectos relacionados con el conocimiento y afectación de los componentes de nuestra biodiversidad. Tres de los trabajos de investigación han sido adelantados en la región de la Sabana de Bogotá, sobre las montañas que la rodean: el artículo presentado por el biólogo Gabriel Eduardo Páramo Rocha, sobre las relaciones del paisaje en las áreas rurales del Distrito Capital; el artículo encabezado por el profesor Orlando Vargas Ríos, cubriendo aspectos de los disturbios ocasionados por pastoreo en los páramos andinos, y el de la profesora Leyla Montenegro, en el tema de la ecología del paisaje, constituyen no sólo la expresión del apoyo efectivo de las directivas del Jardín Botánico para el desarrollo de la investigación sino que también traducen el esfuerzo de los investigadores por avanzar en el conocimiento botánico, ecológico y ambiental de una de las secciones del sistema regional andino de mayores condiciones adversas para los paisajes originales en sus suelos, cerros, quebradas, ríos y humedales. Un tema muy amplio y por lo mismo complejo, como lo es el de las especies invasoras, es desarrollado con claridad por el biólogo Hector Felipe Ríos. El tema de la protección de la naturaleza en parques nacionales es abordado por el biólogo Juan Pablo Giraldo Gómez, quien con el apoyo de la Universidad de los Andes de Bogotá y del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, Ideam, logra presentar un análisis en los cambios de cobertura vegetal en el Parque Natural Nacional Tinigua. Los temas de laboratorio también hacen parte de este número de la revista: los biólogos Claudia Patricia González Rojas y Germán Pachón Ovalle, presentan su trabajo sobre el efecto de las poliaminas en la micropropagación de la especie *Sthanopea wardii*, una orquídea que hoy enfrenta la amenaza de extinción.

El nivel técnico y el rigor científico de los aportes presentados en este número de la revista *Perez - Arbelaezia* hacen factible su aplicación en la restauración y habilitación ecológica de áreas de la Sabana de Bogotá y sus cerros, en el rescate de las especies y en el desarrollo de prácticas conservacionistas. El proyecto editorial de la revista *Perez - Arbelaezia* nos permite testimoniar la forma en que la gestión para la investigación, la conservación y la comunicación oportuna del conocimiento generado van de la mano en el Jardín Botánico, en ese orden de ideas nos permite mostrar como se perfilan los logros de las políticas distritales y nacionales para la conservación de la flora silvestre y

sistemas ecológicos de la Región Andina de Colombia, para el mejoramiento de las condiciones medioambientales del país, la ciudad y su área de influencia.

A partir del presente número la revista contará con el apoyo de un Comité Científico integrado por los profesores Fabio González Garavito y José Luis Fernández Alonso, del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia; Orlando Vargas Ríos del Departamento de Biología de la misma Universidad; Rocío del Pilar Cortés Ballén, de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas; César Eduardo Barbosa Castillo, del Instituto de Hidrología Meteorología y Estudios Ambientales, Ideam, y Santiago Madriñán Restrepo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes. La revista *Perez - Arbelaez* se honra con la nómina que integra este Comité Científico a cuyos miembros presenta un saludo especial.

Expresamos nuestro agradecimiento a quienes han contribuido a mejorar y a darle continuidad a este proyecto editorial que mantiene con su nombre el más vivo homenaje a la memoria del fundador de la institución.

Enrique Uribe Botero
Director Jardín Botánico

Estudios preliminares sobre el efecto de las poliaminas putrescina y espermidina en la micropropagación de *Stanhopea wardii* Lodd ex Lind (Orchidaceae)

Por

CLAUDIA PATRICIA GONZÁLEZ ROJAS * Y GERMÁN PACHÓN OVALLE**

Resumen

Stanhopea wardii es una de las muchas especies de orquídeas que se encuentran en vía de extinción y para la cual no existe un protocolo de micropropagación. El presente estudio evalúa el efecto de las poliaminas (putrescina y espermidina) como reguladores del crecimiento en el desarrollo de una técnica de propagación masiva para la especie. A tal efecto, se diseñaron y realizaron tratamientos con diferentes concentraciones y combinaciones de las sustancias indicadas. Secciones foliares y ápices radicales de plantas mantenidas en invernadero fueron utilizados como fuente de explantes vegetativos. Semillas obtenidas por autopolinización permitieron además evaluar el efecto de estas poliaminas en el proceso de germinación asimbiótica. Se obtuvo incremento en la longitud (elongación) y en el diámetro de los ápices radicales, fase preliminar para la inducción de embriones somáticos a partir de los explantes. Los tratamientos más efectivos, para la inducción de crecimiento, fueron Put 500 (μM), Spd 1.000 (μM) y Put 1.000 (μM), Spd 1.000 (μM). La germinación asimbiótica de las semillas fue estimulada con la aplicación de las poliaminas presentando una disminución del tiempo de germinación y favoreciendo el desarrollo de las plántulas. Los resultados obtenidos aportan elementos para el diseño y establecimiento de un protocolo de micropropagación de la especie.

Palabras clave

Orquídeas, *Stanhopea wardii*, micropropagación, embriogénesis somática, poliaminas.

* Bióloga, Pontificia Universidad Javeriana. clao_pgr@latinmail.com

** Biólogo Ph.D. Universidad de los Andes. lgpachon@uinicca.edu.co

INTRODUCCIÓN

Se considera que el territorio de Colombia posee una riqueza que oscila entre 3.000 y 3.500 especies de orquídeas, lo que representa cerca del 15% del total de especies del mundo. Solamente en un área de 5 km en la reserva La Planada, localizada al occidente del departamento de Nariño, han sido registradas 220 especies de esta familia (Dressler, 1981; Orejuela, 1987; McNeely *et al.*, 1990). Sin embargo, un altísimo porcentaje de esa riqueza natural se encuentra reportada como amenazada o en vía de extinción. La megadiversidad del país, como fenómeno biogeográfico y ecológico, frente a los patrones culturales y económicos de utilización de las tierras y los recursos ha conducido a que los ecosistemas y, en consecuencia, sus especies estén enfrentando procesos que los pueden conducir a su desaparición, (Andrade *et al.*, 1992).

En la lista elaborada, por el Instituto de Investigaciones Biológicas "Alexander Von Humboldt", (2000), para plantas colombianas amenazadas o en peligro de extinción, se incluye un alto número de especies de orquídeas. La necesidad e importancia de proteger este grupo de plantas, desde hace varios años, ha motivado investigaciones dirigidas a lograr su propagación masiva con el fin de poder garantizar la preservación del material genético y, con ello, la supervivencia de las especies que lo conforman. En tal sentido, se ha recurrido al diseño de métodos para la germinación asimbiótica de semillas en medios de cultivo aséptico y a la propagación vegetativa *in vitro*, mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales, (Arditti, 1992).

La técnica de cultivo de tejidos vegetales constituye una herramienta importante en la propagación de plantas ya que con ella se refuerzan los métodos convencionalmente utilizados. En términos generales, el cultivo *in vitro* se concibe como el crecimiento de células, tejidos u órganos en condiciones controladas, para conducir a la regeneración de tejidos organizados o desorganizados y/o a plántulas (Roca y Mroginski, 1991). En la micropropagación *in vitro* de orquídeas, los reguladores de crecimiento vegetal juegan un papel decisivo gracias a la influencia que muestran en los procesos de división y elongación celular: la aplicación de auxinas y citoquininas tienen influencia en la proliferación de protocormos y en la estimulación del crecimiento y desarrollo de plántulas de algunos géneros de orquídeas (George, 1996).

Investigaciones recientes han demostrado que las poliaminas pueden actuar como reguladores del crecimiento y desarrollo en las plantas. Putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) son las poliaminas más comunes y fisiológicamente activas; éstas son aminos alifáticos policationicos que por las características físico-químicas de sus moléculas pueden unirse a otras moléculas de cargas negativas tales como ácidos nucleicos, proteínas o fosfolípidos y regular así procesos que inciden sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como la germinación, la división y la diferenciación celular, la embriogénesis, la iniciación, desarrollo floral y el enraizamiento, (Galston y Kaur-Sawhney, 1990b; Slocum y Flores, 1991).

Debido a que en los medios de cultivo diseñados para la micropropagación de orquídeas se han aplicado balances hormonales en los cuales no se han incluido poliaminas y que *Stanhopea wardii* es una de las especies de orquídeas que se reporta como amenazadas o en vía de extinción (Instituto Alexander Von Humboldt, op.cit.) para la cual no existe aún un protocolo de propagación masiva, se propuso esta investigación para evaluar y comparar el efecto de poliaminas, putrescina y espermidina, como reguladores del crecimiento en el desarrollo de una técnica de micropropagación para esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad INCA de Bogotá y en la Fundación Orquídeas del Tolima, Colombia.

Se emplearon plantas adultas (cinco y seis años) de *Stanhopea wardii* en estado vegetativo, mantenidas bajo polisombra. De ellas se seleccionaron raíces aéreas adheridas a pseudobulbos o troncos, meristemos axilares y hojas jóvenes sanas, como explantes vegetativos. Además, se emplearon semillas obtenidas por autopolinización. Para la obtención de los explantes, bajo condiciones de asepsia, los ápices radicales previamente desinfectados, se cortaron cerca de 2 mm de raíz incluyendo la punta.

Las puntas de raíz, tomadas de la parte aérea de las plantas, con una longitud aproximada de 10 mm, fueron desinfectadas mediante inmersión en una solución de agua destilada, con 1 gota/100ml de Tween (80 y antioxidante: ácido ascórbico 150 ppm y ácido cítrico 100 ppm.), durante 15 minutos; transcurrido este tiempo y en condiciones asépticas, con la utilización de la cabina de flujo laminar, se realizó una inmersión en etanol al 70%, por 3 segundos, de inmediato las raíces fueron sumergidas en una solución de Hipoclorito de sodio, NaClO, al 2,5%, durante 5 minutos, al cabo de los cuales se realizó una nueva inmersión en NaClO al 5%, durante 10 minutos. Para terminar, los ápices radicales se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Las cápsulas o frutos de las orquídeas empleadas fueron desinfectadas siguiendo los protocolos descritos por Arditti (op. cit.) y George (op. cit.). Se lavaron las cápsulas con abundante agua y los restos de pedúnculos fueron retirados. Éstos se colocaron en una solución jabonosa concentrada, durante 30 minutos y luego se realizaron tres enjuagues con agua destilada. Una vez efectuado este procedimiento, en el cuarto de siembra y dentro de una cabina de flujo laminar, los frutos se sometieron a inmersión en etanol al 70%, durante 5 minutos, y enseguida en una solución de NaClO al 5%, por 20 minutos. Finalmente, las cápsulas fueron lavadas tres veces en agua destilada estéril.

Para la obtención de las semillas, en condiciones asépticas se colocó la cápsula, previamente desinfectada, sobre una caja de petri. Con ayuda de pinzas y un bisturí, se realizaron dos cortes transversales en los extremos de la cápsula. Luego, se practicó, a lo largo de una de las estrías, un tercer corte. En este último corte, al abrir la cápsula en dos partes, se dejan por completo expuestas las estructuras internas y las semillas, las que aparecen en forma de un polvillo fino. Debido al diminuto tamaño de las semillas, manejar y determinar su número para la siembra por frasco constituye una labor bastante difícil, razón por la cual fue necesario recurrir a métodos de cuidadoso manejo. Para el efecto se colocaron las semillas en una pequeña cantidad de agua destilada estéril y con una pipeta de 0,5 ml, se recogieron suspendidas entre el agua y luego se inocularon alícuotas iguales en los frascos con los medios de cultivo.

Para el establecimiento de los explantes y la germinación de semillas se utilizó el medio basal de Vacin y Went modificado por Sagawa y Kunisaki (1991), suplementado con tiamina, 1 mg/l, piridoxina, 0,5 mg/l, sacarosa, 20 g/l y agar, 7g/l. Se utilizaron soluciones de putrescina (Put) y espermidina (Spd) en concentraciones de 0, 500µM y 1.000 µM solas y combinadas (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Tratamientos con poliaminas evaluados durante la etapa de establecimiento de ápices radicales.

Spd	Put	0m M	500m M	1000m M
0mM		T1	T2	T3
500mM		T4	T6	T8
1000mM		T5	T7	T9

Tabla 2. Tratamientos con poliaminas evaluados durante la germinación de semillas de *Stanhopea wardii*.

Spd	Put	0m M	500m M
0mM		T1	T2
500mM		T3	T4

Después de adicionar las sustancias, el medio de cultivo se dispensó en recipientes de vidrio con una capacidad de 250 ml, a los que fueron adicionados 15 ml del medio en cada recipiente.

Durante el desarrollo del trabajo, en todos los casos, el pH del medio se mantuvo ajustado a 5,8, antes de esterilizar en autoclave a 15 lb/pulg² con una temperatura de vapor aproximada de 121,5 C°, durante 15 minutos.

Los cultivos fueron conservados en el cuarto de incubación, bajo condiciones de temperatura, iluminación y humedad relativa controladas, con un fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los tratamientos fueron aplicados bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x3 del cual resultan nueve tratamientos, con los reguladores del crecimiento putrescina y espermidina como factores en tres concentraciones 0μM, 500μM y 1000μM como niveles de los factores evaluados.

Se efectuaron tres repeticiones por tratamiento; en cada caso se emplearon 10 unidades experimentales y en cada una de ellas fue cultivado un explante (sección foliar o ápice radical).

La evaluación de los resultados se hizo mediante un análisis de varianza. Se aplicó la prueba de comparación múltiple de Scheffé para obtener un análisis comparativo que permitiera determinar cuáles tratamientos eran diferentes, en qué medida lo eran y cómo se agrupaban en función de esas diferencias.

RESULTADOS

Tratamiento con putrescina y espermidina sobre los ápices radicales

Los resultados obtenidos en el crecimiento de ápices radicales sobre medio de cultivo suplementado con poliaminas se muestran en las Figuras 1 y 2 (página siguiente).

En la Tabla 3 se presentan las medias de los explantes elongados, obtenidas durante el período de estudio, con relación a las diferentes concentraciones y combinaciones de poliaminas. A estas medias se les realizó un análisis de varianza y, a su vez, fueron comparadas mediante la prueba de rango múltiple de Scheffé, con 95% de confiabilidad. De acuerdo con la prueba de Scheffé, el mayor efecto sobre el cambio en la longitud de los ápices radicales se obtuvo con la aplicación de Put 500 μM (T2) y Put 1.000 μM Spd 1.000 μM (T9).

Con la aplicación de Spd 1.000 μM (T5) y Put 1.000 μM Spd 1.000 μM (T9), (Tabla 4), se registró el mayor efecto respecto al incremento en el diámetro del ápice. La utilización de Put 500 μM Spd 1.000 μM (T7), Put 500 μM Spd 500 μM (T6) y Put 1.000 μM Spd 500 μM (T8), respectivamente, mostró el menor efecto, tanto para elongación como para diámetro del ápice.



Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de putrescina y espermidina en la elongación y diámetro de los ápices radicales de *Stanbopea wardii*.

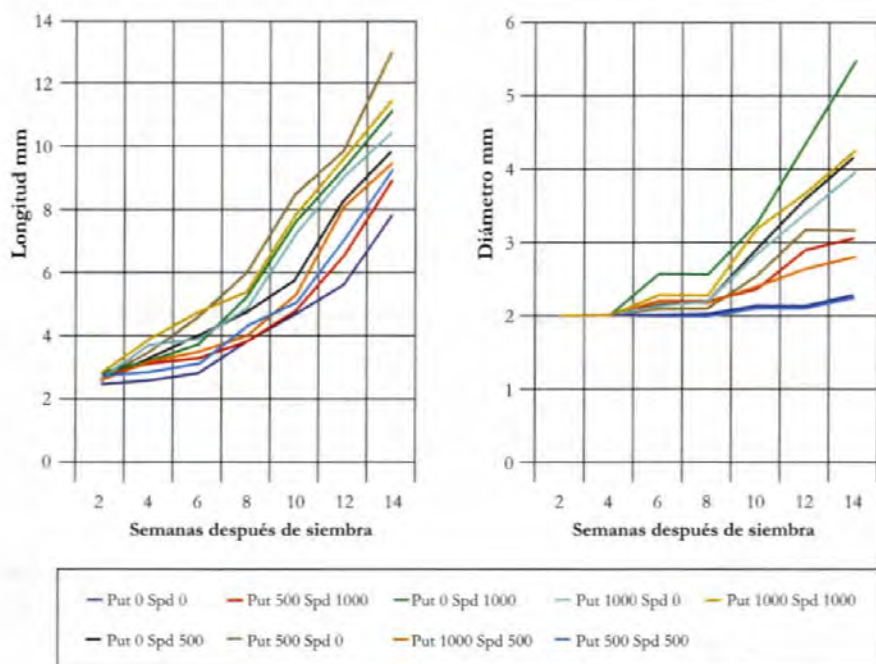


Figura 2. Respuesta de crecimiento en A. Elongación (longitud) B. Diámetro de ápices radicales a las diferentes concentraciones y combinaciones de poliaminas.

Tabla 3. Valores medios de crecimiento en elongación -longitud (mm)- presentado por los ápices radicales de *Stanbopea wardii*.

Semanas después de Siembra	Put 0	Put 500	Put 1000	Put 0	Put 0	Put 500	Put 500	Put 1000	Put 1000
	Spd 0	Spd 0	Spd 0	Spd 500	Spd 1000	Spd 500	Spd 1000	Spd 500	Spd1000
2	2,45	NS2,56	NS 2,65	NS 2,57	NS 2,86	NS 2,77	NS 2,82	NS 2,69	NS 2,84
4	2,60	**3,50	**3,70	*3,30	*3,20	*2,88	*3,10	*3,22	**3,85
6	2,81	**4,60	*3,90	*4,00	*3,74	*3,12	*3,30	*3,53	**4,76
8	3,90	**6,00	*4,87	*4,73	*5,20	*4,30	*3,80	*4,02	**5,45
10	4,70	**8,45	*7,20	*5,76	*7,61	*5,00	*4,80	*5,25	**7,82
12	5,60	**9,80	*9,00	*8,25	*9,25	*7,00	*6,50	*8,00	**9,61
14	7,80	**12,90	*10,40	*9,78	*11,1	*9,22	*8,90	*9,47	**11,42

NS. denota una diferencia no significativa de acuerdo con la prueba Scheffe.

* Denota una diferencia significativa con un 95% de confiabilidad según la prueba Scheffe.

** Representa grupos homogéneos y las mayores medias.

Tratamiento con putrescina y espermidina en la germinación asimbiótica de semillas

En la Tabla 5 (página siguiente) y en la Figura 3 (pag. 81) se muestra el efecto de las poliaminas putrescina y espermidina sobre la germinación de las semillas de *Stanbopea wardii*. Como se observa, la germinación se presentó más rápidamente (séptima semana) con la aplicación de Put 500 μ M (T2), put 500 μ M y Spd 500 μ M (T4). En la novena semana, las semillas que se encontraban bajo el efecto de Spd 500 μ M (T3), empezaron a germinar y sólo en la semana catorce se observó respuesta en el tratamiento control.

Los mayores porcentajes de germinación (100%) se observaron con Put 500 μ M (T2), seguidos por Spd 500 μ M - Put 500 μ M 90% (T4) y Spd 500 μ M (T3); el tratamiento control, sin reguladores del crecimiento, indujo el 53% de germinación.

Para las variables porcentaje de germinación y emergencia de plántulas, los análisis estadísticos muestran una diferencia significativa con respecto al tratamiento control, ya que, como se observa en las Tablas 4 y 5, éstas semillas sólo alcanzaron la etapa de protocormo mientras que las tratadas con poliaminas se desarrollaron hasta plántulas. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con las diferentes poliaminas.

En la Figura 3 se indican los diferentes estadios de germinación y posterior formación de plántulas a partir de semillas de *Stanbopea wardii* que fueron tratadas con poliaminas. Al inicio de

Tabla 4. Valores medios del diámetro (mm) presentado por los ápices radicales de *Stanbopea wardii*.

Semanas después de Siembra	Put 0	Put 500	Put 1000	Put 0	Put 0	Put 500	Put 500	Put 1000	Put 1000
	Spd 0	Spd 0	Spd 0	Spd 500	Spd 1000	Spd 500	Spd 1000	Spd 500	Spd1000
2	2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2
4	2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2	NS 2
6	2	NS 2,1	NS 2,2	NS 2,2	**2,57	NS 2,1	NS 2,2	NS 2,2	NS 2,28
8	2	NS 2,1	NS 2,2	NS 2,2	**2,57	NS 2,1	NS 2,2	NS 2,2	NS 2,28
10	2,1	*2,8	*2,85	*2,9	*3,28	*2,55	*2,36	*2,4	**3,2
12	2,1	*3,57	*3,41	*3,62	*4,37	*3,17	*2,90	*2,65	**3,7
14	2,25	*3,81	*3,81	*4,2	*5,47	*3,17	*3,08	*2,8	**4,25

NS, denota una diferencia no significativa de acuerdo con la prueba Scheffe.

* Denota una diferencia significativa con un 95% de confiabilidad según la prueba Scheffe.

** Representa grupos homogéneos y las mayores medias.

Tabla 5. Valores medios de germinación en semillas de *Stanbopea wardii* con la aplicación de putrescina y espermidina.

Tratamiento	Concentración de Put μ M	Concentración de Spd μ M	Tiempo mínimo de germinación (semanas)	Porcentaje de germinación	Tiempo máximo de germinación (semanas)
1	—	—	53%	14	24
2	500		100%	7	14
3		500	90%	9	16
4	500	500	95%	7	14

la germinación, el embrión, observado microscópicamente, muestra agrupaciones indiferenciadas de células, (Figura 3-A). Luego, a los 80 días, los embriones presentaron una mayor diferenciación: las semillas empezaron a engrosar, asumiendo una conformación esférica, denominada estado de protocormo, (Figura 3-B). A los 120 días estos protocormos empezaron a tornarse verdes, por el desarrollo de clorofila, y más tarde desencadenaron la formación de numerosos puntos vegetativos, cuyo crecimiento y desarrollo dio origen a la formación de plántulas, (Figura 3-C y D).

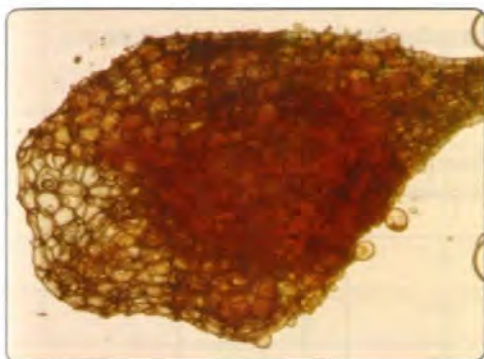


Fig. 3A Semilla en inicio de germinación 15 días después de la siembra en el medio de cultivo.

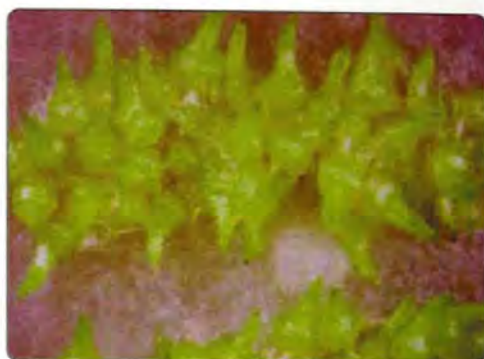


Fig. 3B Formación de protocormos a partir de semillas. 80 días

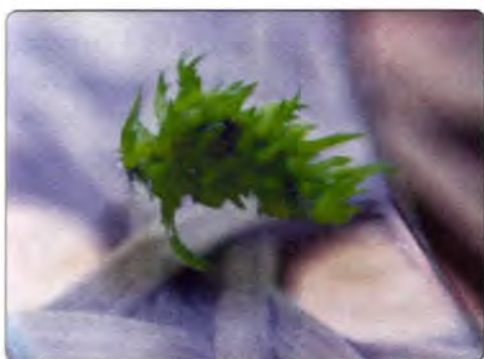


Fig. 3C Desarrollo de protocormos e inicio de formación de plántulas 120 días.



Fig. 3D Plántula de *Stanhopea wardii* 170 días después de siembra después de siembra

Figura 3. Germinación asimbiótica de *Stanhopea wardii* bajo el efecto de putrescina y espermidina. Estadios de germinación y formación de plántulas.

Los efectos de las poliaminas, putrescina y espermidina, sobre la emergencia de las plántulas se presentan en la Tabla 6. Tanto putrescina como espermidina promovieron la emergencia de casi el 100% de las plantas, mientras que con el tratamiento control sin reguladores del crecimiento, la emergencia de las plántulas no se alcanzó.

Con el análisis de varianza, realizado para la variable elongación de las plántulas, se rechaza la hipótesis nula donde todos los tratamientos son iguales. La prueba Scheffe indica que las aplicaciones de putrescina 500 μ M (T2) y putrescina 500 μ M y espermidina 500 μ M (T4) muestran las mayores medias de elongación en las plántulas, sin diferencias significativas entre ellas que convierten el conjunto en un grupo homogéneo.

Tabla 6. Valores medios del efecto de putrescina y espermidina sobre la emergencia y elongación de plántulas de *Stanhopea wardii*.

Tratamiento	Concentración de Put	Concentración de Spd	Emergencia de plántulas	Elongación de plántulas mm	Coloración
1	0	0	0%	0	
2	500	0	100%	16	VA
3	0	500	100%	12	VA
4	500	500	100%	19	VA

En las Figuras 4 y 5 se observa que las plántulas obtenidas por germinación asimbiótica de semillas tratadas con poliaminas, presentan un promedio de altura entre 12 y 17 mm. En contraste, con el tratamiento control, en el cual no se observaron respuestas de crecimiento, no se pudo evaluar esta variable por no presentarse emergencia y elongación en las plántulas, durante el tiempo de experimentación.

DISCUSIÓN

Efecto de la aplicación de putrescina y espermidina sobre el crecimiento de ápices radicales

Como se puede apreciar en las Figuras 1 y 2 (pag. 78), los ápices radicales tratados con poliaminas evidencian un mayor cambio en la longitud (elongación) y en el diámetro. Por su parte, en el tratamiento control, sin poliaminas, los ápices radicales se mantuvieron delgados y aunque elongaron, la longitud que alcanzaron en promedio fue menor a la obtenida por los ápices radicales que fueron tratados con poliaminas.

Los resultados muestran que la adición de poliaminas tiene influencia en la tasa de crecimiento de los ápices radicales y sugieren que el patrón de crecimiento de los ápices radicales se ve afectado por la clase y concentración del tipo de poliamina utilizada. La aplicación de putrescina, promueve la elongación, y la aplicación de espermidina, promueve el incremento en el diámetro. Como se observa en las figuras indicadas, con putrescina 500 μ M, (T2), se obtienen ápices radicales de 12,9 mm de longitud y con espermidina 1.000 μ M, (T5), se observan ápices radicales con 5,4 mm de diámetro.

El cambio en elongación y el diámetro que presentaron los ápices radicales puede atribuirse al aumento del número de células, debido a sucesivas divisiones celulares, y al incremento del volumen de cada célula, por expansión y elongación celular; el resultado general se evidencia

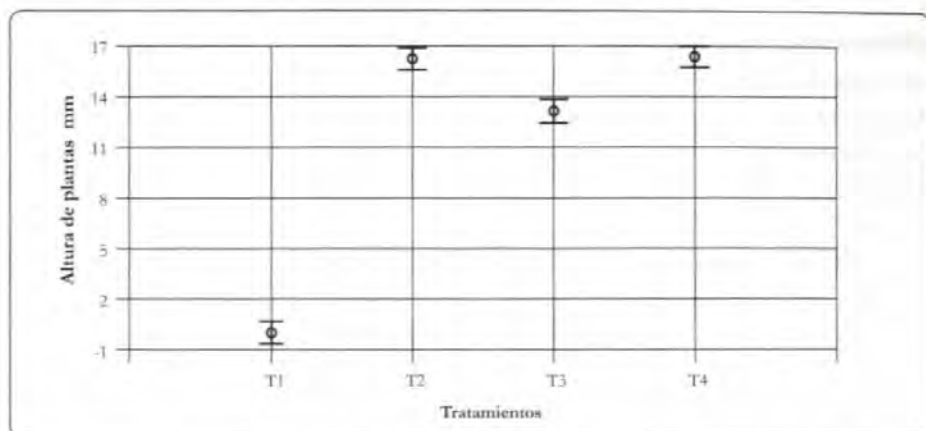


Figura 4. Respuesta de crecimiento en altura de plántulas de *Stanbopea wardii* germinadas in vitro bajo el efecto de putrescina y espermidina.



Figura 5. Efecto de putrescina y espermidina en la germinación y formación de plántulas de *Stanbopea wardii*

en el crecimiento de los ápices radicales, lo que representa la capacidad de respuesta del explante a la aplicación de un estímulo específico, en este caso el efecto de putrescina y espermidina.

El efecto sobre el crecimiento en los ápices radicales, probablemente se debe a que con la aplicación exógena de poliaminas se incrementan los niveles endógenos de estas hormonas. En principio, la carga positiva de los grupos amino de las poliaminas se pueden unir a los fosfolípidos o a otros sitios aniónicos de la membrana, situación que altera la estabilidad y permeabilidad de ésta y admite que las poliaminas entren a actuar a nivel del núcleo y a combinarse con su DNA y RNA, con lo cual influyen sobre los procesos de transcripción y traducción que activan la mitosis y, desde luego, inducen la división y elongación celular. Finalmente, los efectos se traducen en el crecimiento de los ápices radicales, (Galston & Kaur-Sawhney, 1990a; Slocum & Flores, op. cit.; Egea-Cortines & Mizrahi, 1991).

En diferentes estudios se ha podido comprobar una relación directa entre el aumento en los niveles de poliaminas y la activación de la síntesis de DNA y RNA. De la misma manera, se ha demostrado que la transición de G1 a S parece estar regulada por el aumento de los niveles de poliaminas. Este aumento en los niveles de poliaminas, durante la fase premitótica, sugiere que las poliaminas se encuentran directamente relacionadas con la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Cohen *et al.*, 1984; Bagni, 1989). También se ha encontrado que tejidos con crecimiento activo, como las zonas meristemáticas, presentan altos niveles de espermidina y espermina y que su concentración tiende a disminuir de modo gradual a lo largo de la zona de elongación (Flores *et al.*, op. cit.; Galston y Flores, 1991).

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación han sido reportados en trabajos realizados en diferentes géneros de la familia de las orquídeas, como *Cyrtopodium* (Sánchez, 1988), *Bletilla* (Yam, 1991) y *Catasetum* (Kerbaui, 1993). En dichos estudios se utilizaron diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas; los ápices radicales después de 6 a 9 meses de cultivo, mostraron, como fase preliminar a la formación de Protocorm Like Bodies (PLBs), un crecimiento evidenciado en la elongación y en el diámetro de estos explantes. En la familia *Orchidaceae* la formación de PLBs, a partir de diferentes explantes, es considerado como la inducción de embriogénesis somática. Los protocormos que se desarrollan, después de la germinación de una semilla de orquídea, tienen muchas semejanzas con los "cuerpos protocórmicos" formados a partir de diferentes explantes de orquídeas; entre las semejanzas a que se hace referencia, se encuentran: la formación de células más pequeñas, usualmente isodiamétricas con núcleos sobresalientes, citoplasma denso, formación de rizoides y polaridad débil, (George, op. cit.; Montoya, 1991; Kerbaui, op. cit.).

De otra parte, se ha encontrado que los procesos de embriogénesis somática, en diferentes especies vegetales, son activados sólo en presencia de auxinas. Igualmente la inducción de PLBs (embriones somáticos) a partir de ápices radicales y secciones foliares, en la mayoría de especies de orquídeas, ha necesitado de la aplicación de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas (Montoya, op. cit.; Arditti, op. cit.; Arteca, 1996; Azcon-Bieto y Talon, 1996).

Existe una gran variación entre los taxa y genotipos con respecto a la relación auxina/ citoquinina, que debe ser incluida dentro del medio. Sin embargo, estos dos reguladores del crecimiento son generalmente adicionados para obtener embriones somáticos (Arteca, op. cit.)

El balance auxina/citoquinina parece ser de gran importancia en el tipo de división celular que induce la formación de embriones somáticos (Montoya, op. cit.; George, op. cit.). Sin embargo, los resultados previos de este trabajo indican que cuando se utilizó putrescina y espermidina se logró un incremento en la longitud y en el diámetro de los ápices radicales, que constituyen efectos similares a los producidos con la aplicación de auxinas y citoquininas,

en la fase preliminar, para la inducción de PLBs en otros géneros de las orquideas, a partir de los explantes.

Aunque el mecanismo de acción de las poliaminas no es muy claro y no se han observado efectos morfogénéticos comparables a los ejercidos por los reguladores del crecimiento, diferentes investigaciones han demostrado que la administración de cualquiera de las hormonas estimulantes del crecimiento (auxinas, giberelinas o citoquininas) a tejidos específicos, da como resultado un incremento de los niveles endógenos de poliaminas y de sus enzimas biosintéticas que, a su vez, son las que activan la división y elongación celular e influyen sobre la inducción de la embriogénesis somática (Slocum y Flores, op. cit.; Azcon-Bieto, op. cit.).

El papel que cumplen las poliaminas durante la embriogénesis somática ha sido estudiado, buscando correlacionar el aumento en los niveles endógenos de poliaminas y sus enzimas biosintéticas durante la diferenciación y desarrollo de embriones somáticos. Así, Bradley *et al.*, (1984), reportan que los niveles endógenos de poliaminas, en especial los de putrescina y espermidina, se incrementan durante la formación de embriones somáticos en *Daucus carota*. Lo mismo fue descrito durante el proceso de embriogénesis en *Medicago sativa*. Estas investigaciones han señalado que la adición de inhibidores de las enzimas biosintéticas de las poliaminas bloquean la respuesta embriogénica; este proceso de embriogénesis somática es restablecido con la adición de putrescina, espermidina o espermina.

El contenido de poliaminas y la actividad de ADC y ODC, enzimas precursoras de las poliaminas, han sido examinados *a priori* y durante la diferenciación de embriones somáticos de zanahoria, demostrando que la presencia de altos niveles de estas enzimas, se encuentran directamente relacionados con la formación y desarrollo de embriones somáticos (Dhundy y Minocha, 1994).

De acuerdo con lo anterior, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en diferentes investigaciones, se ha sugerido que el potencial de embriogénesis somática está mediado por los niveles endógenos de poliaminas y sus enzimas biosintéticas (Galston *et al.*, 1997; Azcon-Bieto y Talon, op. cit.). Así, el papel que cumple el balance auxinas-citoquininas en la inducción de embriones somáticos, para la mayoría de especies vegetales, depende directamente del control que ejercen estas hormonas sobre el aumento o descenso de los niveles endógenos de poliaminas y de su acción sobre la regulación del ciclo celular que activa la mitosis, promueve la división y elongación celular, estimula el crecimiento y la posterior diferenciación y formación de embriones somáticos.

Considerando lo anterior, se puede decir que los resultados obtenidos con la administración de putrescina y espermidina, como suplementos en medios de cultivo, abren un espacio en

las técnicas de cultivo *in vitro*, para que puedan ser utilizadas como reguladores del crecimiento, a cuyo efecto es necesario tener en cuenta que en este estudio con la aplicación de las poliaminas se lograron, en un menor tiempo, (3,5 meses), resultados similares a los obtenidos con la aplicación de auxinas y citoquininas sobre ápices radicales, en otras especies de orquídeas, en donde sólo después de 6 a 9 meses de cultivo *in vitro* y bajo el efecto de diferentes concentraciones de estas últimas hormonas, se logró inducir el incremento en la elongación, diámetro y posterior formación de PLBs a partir de ápices radicales.

Los efectos de putrescina y espermidina sobre la elongación y cambio en el diámetro de los ápices radicales de *Stanbopea wardii*, pueden considerarse como la acción de estas sobre el aumento en las concentraciones endógenas de los niveles de poliaminas que, según estudios realizados, influyen de manera directa en la activación de los procesos de embriogénesis somática.

Es conveniente mencionar que según Kerbauy (op. cit.) la inducción de PLBs -embriogénesis somática en orquídeas- a partir de ápices radicales va acompañado de un crecimiento en forma proporcional (incremento tanto en longitud como en diámetro).

En este orden de ideas, se sugiere el empleo de Put 1.000 M, Spd 1.000 μ M (T9), Put 500 μ M (T2), Spd 1.000 μ M (T5) para evaluar la formación y desarrollo de embriones somáticos (PLBs) en los posteriores estadios de la micropropagación de *Stanbopea wardii*, ya que con la adición de Put 1.000 μ M - Spd 1.000 μ M (T9) en el medio de cultivo (Tablas 1 y 2, Pag. 76) se estimuló tanto el incremento en el diámetro (4,25 mm) como en la longitud (11,4 mm) de los ápices radicales. Con la aplicación de putrescina 500 μ M (T2) y espermidina 1.000 μ M (T5) se registró, en forma respectiva, el mayor efecto en cuanto al aumento en la elongación y diámetro de los ápices radicales. No obstante, es necesario realizar cortes histológicos, para observar las características de las células y verificar la formación de embriones somáticos.

Efecto de putrescina y espermidina en la germinación asimbiótica de semillas

Es reconocido el hecho de que las hormonas cumplen un importante papel en el proceso de germinación de las semillas. Las giberelinas inducen la degradación de las reservas nutritivas, a través de las síntesis de α -amilasa, con lo cual se activa el ciclo de Krebs y se produce la energía necesaria para el crecimiento del embrión. De igual forma, las citoquininas influyen sobre el crecimiento del embrión promoviendo una rápida división de las células embrionarias. Las auxinas promueven la elongación y expansión celular que estimula el crecimiento del embrión (Kigel y Galili, 1995).

Así, la aplicación de auxinas, citoquininas y giberelinas, como reguladores del crecimiento, favorece la germinación asimbiótica de diferentes especies de orquídeas, aumenta el porcen-

raje de semillas germinadas, disminuye el tiempo de germinación y permite obtener plántulas en un tiempo más corto, (Arditti, op. cit.). Los resultados del presente estudio muestran que cuando se utiliza, putrescina y espermidina, se generan efectos similares a los obtenidos con la aplicación de auxinas, citoquininas y giberelinas en otros géneros de orquídeas: aumenta el porcentaje de germinación, se disminuye el tiempo de germinación y de emergencia de plántulas, con respecto al control.

Se ha postulado que la acción que ejercen las giberelinas, auxinas y citoquininas en el proceso de germinación está directamente relacionada con el aumento de los niveles endógenos de poliaminas en las semillas (Slocum y Flores, op. cit; Huang y Villanueva, (1992). Así, la regulación que ejercen las giberelinas sobre la síntesis de μ -amilasa, parece depender de la síntesis de espermidina. Estudios realizados por Koizuka *et al.*, (1991), y Lin, (1984), demuestran que el aumento en la síntesis de μ -amilasa coincide con el aumento en los niveles de espermidina; cuando se bloquea la síntesis de espermidina, la producción de μ -amilasa, disminuye y se bloquea el proceso de germinación.

La aplicación de kinetina, al medio de cultivo para la germinación de semillas de arroz, incrementa los niveles de poliaminas a través de la activación de la vía catalizada por ADC (Slocum y Flores, 1991).

Del mismo modo, se ha observado que cuando embriones de *Prunus avium* son cultivados en el medio basal, suplementado con 2,4-D y kinetina, se incrementan los niveles endógenos de putrescina, espermidina y agmatina, lo que a su vez estimula la elongación y división celular y promueve así la germinación de estas semillas (Garin *et al.*, 1995). Las poliaminas participan en numerosos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas como la división celular, embriogénesis, germinación, iniciación y desarrollo de flores, frutos y procesos de senescencia entre otros (Galston y Kaur-Sawhney, op. cit; Slocum y Flores, op. cit.).

Varios estudios han permitido evidenciar que el inicio del proceso de germinación coincide con el incremento en la biosíntesis de poliaminas y la síntesis de DNA, RNA (Huang y Villanueva, op. cit.). Durante el proceso de germinación en *Zea mays* se observa un aumento en la concentración de putrescina (Torrigiani, 1988). Igualmente, en semillas de *Arachis hypogea* el proceso de germinación está acompañado por el incremento en la biosíntesis de poliaminas (Savithramma y Swamy, 1989). En semillas de soya, Gamarnik y Frydman, (1991), reportaron que el proceso de germinación está acompañado por un aumento de los niveles de poliaminas.

En diferentes investigaciones, en donde se ha evaluado el papel que cumplen las poliaminas durante el proceso de germinación, se reitera que la aplicación de poliaminas favorece la germinación. La presencia de espermidina (1mM) y putrescina (1mM), en el medio de germinación de *Cicer arietinum*, promovió el proceso de germinación y aceleró la emergencia de la

radícula (Gallardo *et al.*, 1992). Así mismo, la germinación de semillas de manzana es estimulada con la adición de putrescina y espermidina (Sinska y Lewandowska, 1991).

Las respuestas obtenidas en el presente estudio, con la aplicación de putrescina y espermidina, en la germinación y posterior emergencia y elongación de plántulas de *Stanbopea wardii*, podrían atribuirse a que, con la aplicación de estas, se produce un incremento directo en la concentración endógena de poliaminas en la semilla que activa la síntesis de DNA y RNA e influye sobre la división y elongación celular, estimula el crecimiento del embrión y promueve, finalmente, el proceso de germinación asimbiótica de *Stanbopea wardii*.

Es evidente que la adición de poliaminas favorece la germinación de semillas y la emergencia y elongación de las plántulas. Se presume que los efectos de putrescina y espermidina sobre la germinación se encuentran relacionados con la aplicación directa de estas y su influencia en el aumento de la concentración endógena de poliaminas en la semilla, con lo cual se inicia una activación a nivel molecular, que promueve la replicación del DNA, la transcripción de RNA y la traducción a proteínas, desencadenando los procesos indispensables para la germinación.

Para establecer si la acción de putrescina y espermidina es en realidad similar o igual a la ejercida por las auxinas, citoquininas y giberelinas es necesario efectuar trabajos de investigación que permitan comparar el efecto general en la germinación y desarrollo de las plántulas de *Stanbopea wardii*, ya que sobre el particular no se conocen reportes del efecto de la utilización de auxinas, citoquininas y giberelinas en la germinación asimbiótica de esta especie, para poder así compararlos con los resultados obtenidos en esta investigación.

- Los procedimientos aplicados en el presente estudio, y los resultados obtenidos, muestran que la técnica utilizada constituye un avance para el establecimiento de un protocolo de micropropagación para la especie *Stanbopea wardii* y muy posiblemente, su aplicación podrá extenderse a protocolos de otras especies de la familia Orchidaceae.
- La aplicación de putrescina y espermidina influyó de manera positiva en la etapa inicial de micropropagación de *Stanbopea wardii*; dichas sustancias promovieron el crecimiento de los ápices radicales, evidenciado por el incremento en elongación y diámetro, fase fundamental para la formación de embriones somáticos (PLBs) a partir de estos explantes. La aplicación de putrescina evidencia una gran influencia en la elongación, en tanto que la aplicación de espermidina permite entrever una mayor influencia en el incremento del diámetro.
- Los ápices radicales tratados con Put 500 μM (T2), Spd 1.000 μM (T5) y Put 1.000 μM Spd 1000 μM (T9), cuyos resultados presentan los mayores valores, en cuanto a longitud y diámetro de los ápices radicales, permiten sugerir el empleo de estas concentraciones de poliaminas para evaluar la formación y desarrollo de embriones somáticos (PLBs) en los posteriores estadios de la micropropagación de *Stanbopea wardii*.

- La adición de poliaminas favoreció la germinación, emergencia y elongación de plántulas de *Stanbopea wardii*; los resultados muestran que aumentó el porcentaje de semillas germinadas y que disminuyó el tiempo de germinación y de emergencia de las plántulas.
- Considerando los resultados obtenidos, se propone el empleo de putrescina y espermidina en técnicas de cultivo *in vitro*, ya que, además de obtener resultados similares a los reportados con el empleo de citoquininas y auxinas, se logró disminuir el tiempo tanto para la inducción de PLBs como para la germinación asimbiótica de semillas de *Stanbopea wardii*.

Bibliografía

- Andrade, Germán, Gómez R.; Ruiz, J.P. 1992. *Biodiversidad, conservación y uso de recursos naturales*. Cerec. Bogotá-Colombia 126 p.
- Arditti, J. 1992. *Micropropagation of Orchids*. Jhon Wiley and Sons, INC. New York, 682 p.
- Arteca, R. 1996. *Plant Growth Substances: Principles and applications*. Ed. Chapman y Hall. New York, 332 p.
- Azcon-Bieto, J.; Talon, M. 1996. *Fisiología y Bioquímica vegetal*. Interamericana - McGraw-Hill. Madrid 581p.
- Bradley, P.M.; El-Fiki, F.; Giles, K.L. 1984. *Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of Daucus carota*, Plant Science Lett., 34: 397.
- Cohen, E.; Arad, S.; Heimer, H.; y Mizrahi, Y. 1984. *Polyamines biosynthetic enzymes in the cell cycle of chlorella. Correlation between ornithine decarboxylase and DNA synthesis at different light intensities*. Plant Physiology 74:385-388.
- Dhundy, R.B.; Minocha, S.C. 1994. *Genetic engineering of the polyamine biosynthetic pathway and somatic embryogenesis in carrot (Daucus Carota.) Increased Putrescine Biosynthesis through Transfer of Mouse Ornithine Decarboxylase cDNA in carrot Promotes Somatic Embryogenesis*. <http://www.scs.unr.edu/~mudbastola/ph-dabs.htm>.
- Dressler, R. L. 1981. *The Orchids. Natural history and clasification*. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts.
- Egea-Cortines, M.; Mizrahi, Y. 1991. *Polyamines in cell division, fruit set and development and germination*, pp. 143-158. In: Slocum R.D. Flores H.E. Biochemistry and physiology of polyamines in plants. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- Flores, H.E.; Prottacio, C.M.; Signs, N.W. 1989. *Primary and secondary metabolism of polyamines in plants* In: Poulton, J.E., Romeo, J.T., Cohn, E.E. Recent advances in phytochemistry. 329-323. Plenum Press New York.
- Galston, A.; Kaur-Sawhney, R. 1990a. *Polyamines in plant physiology*. Plant Physiol. 94: 406-410.

- ; Kaur-Sawhney, R. 1990b. *Polyamines as endogenous growth regulators* p. 280-293. En: Davies, J.P. 1990. *Plants hormones and their role in plant growth and development*. By. Kluwer Academic Publisher Netherlands.
- ; Flores, H.E. 1991. *Polyamines and plant morphogenesis* pp. 178-193. IN R.D. Slocum y H.E. Flores (ed.) *Biochemistry and Physiology of Polyamines In Plants*. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- ; Kaur-Sawhney, R.; Altabella, T.; Tiburcio, A. 1997. *Plant Polyamines in Reproductive Activity and Response to abiotic Stress*. Bot. Acta 110: 197-207.
- Gallardo, M.; Mantilla, A.; Sánchez-Calle, I.M. 1992. *Effects of espermine, ABA and temperature upon ethilene production in Cicer arietinum seeds*. Plant Physiology and Biochemistry 30:19-17
- Gamarnik, A.; Frydman, R.B. 1991. *Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean seeds*. Plant Physiology 97:778-785.
- Garin, E.; Grenier-De March., Grenier E.; Martin-Tanguy, J. 1995. *Polyamines changes during the development of zygotic embryos in Prunus avium*. Plant Growth Regulation 16: 279-286.
- George, E. F. 1996. *Plant propagation by tissue Culture*. 2th Part 2. Excegetic Limited. Gran Bretaña.
- Huang, H. T.; Villanueva V.R. 1992. *Inhibition of polyamine biosynthesis and seed germination in Picea abies* *Phytochemistry*. 31: 3353-3356.
- Instituto "Alexander Von Humboldt", 2000. *Listas rojas preliminares de plantas vasculares de Colombia* (Incluyendo orquideas) versión abril del 2000- página WEB del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander Von Humboldt" <http://www.humboldt.org.co>.
- Kerbaui, G.B. 1993. *Direct root tip conversion of Catasatum into protocorm-like bodies (PLBs). Effects of auxin and cytokinin*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 33: 39-44.
- Kigel, J.; Galili, G. 1995. *Seed development and Germination*. Marcel Dekker New York. 853 p.
- Koizuka, N., Tanaka; Morohashi, Y. 1991. *Effects of spermidine on the synthesis of alpha-amylase in cotyledons of mung bean seedlings*. Physiologia Plantarum 81:211-214.
- Lin, P.P. 1984. *Polyamine metabolism and its relation to reponse of the aleurone layers of barley seeds to gibberellic acid*. Plant Physiol. 74: 975.
- Mc Neely, J.A.; Miller, K.R.; Reid, W.V.; Mittermeier R.A.; Werner, T.B. 1990. *Conserving the world's biological diversity*. IUCN. The world bank.
- Montoya, H.L. 1991. *Cultivo de tejidos vegetales*. Universidad Nacional de Colombia-Medellín. Agronomía. 77 p.
- Orejuela, J. 1987. *La reserva la Planada y la biogeografía Andina*. Humboldtia, 1:117-148.
- Roca, W.; Mroginski, L. 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Cali. 969 p.
- Sagawa Y.; KUunisaki J. T. (1991). *Clonal propagation of orchid: Plant Tissue Culture Manual C1: 1-7*. Kluwer Academic Publishers.

- Sánchez, M.I. 1988. *Micropropagation of Cyrtopodium (Orquideaceae) trough root-tip culture*. Lindleyana 3: 93-96.
- Savithramma, N.; Swamy Y, P.M. 1989. *Quantitative changes of polyamines and activity of a ALC in developing and germination seeds of two of groundnut (Arachis hypogae)* Annals of Botany 64: 337-341.
- Sinska, I.; Lewandowska, V. 1991. *Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds*, Physiologia Plantarum 81: 59-64.
- Slocum, R.D.; Flores, E. 1991. *Biochemistry and physiology of polyamines In Plants*. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. 263 p.
- Torrigiani, 1988. *Polyamine oxidase activity and polyamine content in maize seed germination*. Physiologia Plantarum 74: 427-432.
- Yam, T.W.; M. A. Weatherhead. 1991. *Root tips culture of several native orchids of Hong Kong*. Lindleyana. 6: 151-153.