

Propagación vegetativa *in vitro* de *Puya santossi*

Puya santossi *in vitro* propagation

Jaime Alonso Pedroza–Manrique¹, Andrea Bejarano-Tibocha²

Resumen

Puya santossi (L) es una especie endémica de la zona altoandina que se encuentra en vías de extinción, razón por la cual es indispensable establecer los procedimientos de conservación de este importante germoplasma. Ante esta situación, en este estudio se evaluó la adaptación a condiciones *in vitro* de *P. santossi* con la utilización del Benlate® y nueve tratamientos del efecto del hipoclorito de sodio en el proceso del control de la contaminación, y el efecto de cinco fitorreguladores de crecimiento en el desarrollo morfo genético de meristemas caulinares y láminas foliares. El medio de cultivo básico empleado fue el MS, enriquecido con los siguientes fitorreguladores: en el cultivo de meristemas, el ácido indol butírico (AIB) y la bencilaminopurina (BAP) (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L). Para el enraizamiento de los brotes regenerados, el ácido α -naftalén acético (ANA) (0,0; 1,0; 2,0 y 3,0 mg/L). En la inducción morfo genética de láminas foliares, el ácido 2,4-diclorofenoxi acético y la Kinetina (0,0; 1,0; 3,0 y 5,0 mg/L). De los nueve tratamientos evaluados en el control de la contaminación se observó que el tratamiento 5 (NaOCl al 1% - 10 min) fue el más exitoso. El explante más adecuado para la propagación *in vitro* de *Puya santossi* es el meristemo, que permite la proliferación masiva de brotes adventicios cuando son cultivados en el medio MS enriquecido con 1,5 mg/L de BAP. El enraizamiento de los brotes, provenientes del cultivo de meristemas, se logró con 3,0 mg/L de ANA. Este protocolo permite la propagación a gran escala de *P. santossi*, y además sirve como modelo de conservación para especies que se encuentran en vías de extinción. En esta investigación se descubrió que el proceso morfo genético de las láminas foliares fue inhibido por la presencia de un grupo de algas clorofíceas que se encontraron asociadas simbióticamente con *P. santossi*.

Palabras clave: *Puya santossi*, micropropagación, plantas en vías de extinción, reguladores de crecimiento.

Abstract

Puya santossi (L) is an endemic threatened shrub from the high Andean region. Conservation procedures must thus be established for this important germplasm species' conservation. This study evaluated the *in vitro* adaptation of this species with Benlate and nine sodium hypochlorite treatments and the effect of five growth regulators on the morphogenetic development of shoots, meristems and leaves. The base medium used was MS enriched with the following growth regulators: indol butyric acid (IBA) and benzylaminopurine (BAP) (0.0, 0.5, 1.0 and 1.5 mg/L) in meristem culture; α -naphthaleneacetic acid (NAA) (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg/L) in the rooting of buds regenerated *in vitro*; 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid and Kinetin (0.0, 1.0, 3.0 and 5.0 mg/l) in leaves. It was observed that treatment 5 (1% NaOCl, 10 min) was the most successful in contamination control. The meristem was the most appropriate explant for

1 Biólogo, Esp. M. Sc. Profesor Asociado Universidad Distrital Francisco José Caldas, Facultad de Ciencias y Educación. Colombia. jpedroza@udistrital.edu.co

2 Licenciada en Biología, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Colombia.

Puya santossi micropropagation, allowing mass proliferation of adventitious buds when they were grown on MS media enriched with 1.5 mg/L BAP. Buds from the meristem culture were rooted with 3.0 mg/L NAA. This protocol represents a conservation model for endangered species and led to propagating *Puya santossi*. This investigation revealed that morphogenetic leaf explants were inhibited by the presence of a group of chlorophyceae algae which were found to be symbiotically associated with *P. santossi*.

Key words: *Puya santossi*, micropropagation, endangered plant, growth regulators.

Recibido: febrero 1 de 2008

Aprobado: abril 23 de 2008

Introducción

Debido a la alta intervención antrópica, los ecosistemas paramunos se encuentran amenazados especialmente por la tala indiscriminada, el pastoreo y la urbanización de estos espacios ambientales, situación que ha motivado adelantar estudios que permitan conocer las especies que allí habitan, como es el caso de *Puya santossi*, especie en riesgo de extinción (Instituto Alexander von Humbolt, 1997) debido a que su población y área de distribución han ido disminuyendo, evitando de esta manera que se extinga y no se pueda remediar el daño causado. Son evidentes las severas amenazas que se ciernen sobre los ecosistemas de montaña en el mundo entero, pero especialmente los daños se han calificado como extremos y significativos en los Andes (Okada, 2001). De igual forma, debido a la preocupación que existe por la falta de cuidados con la vegetación nativa, se plantea la necesidad de conservarla a fin de garantizar su permanencia en los páramos, utilizando las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, como una alternativa de propagación y conservación.

Hasta el momento no se han reportado investigaciones acerca del desarrollo de protocolos de propagación o conservación de *P. santossi*, a pesar de su potencial valor ambiental en programas de revegetalización, teniendo en cuenta que esta especie tiene altos límites de propagación sexual, evidenciados por su baja viabilidad de semillas. La propagación a gran escala es un prerrequisito para satisfacer los requerimientos medioambientales y, de esa

forma, evitar la erradicación de esta planta de gran valor y en vías de extinción. En los requerimientos ecológicos de revegetalización utilizando plantas pioneras y la conservación de especies en vías de extinción, es indispensable establecer métodos de propagación rápida y a gran escala, como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

En este estudio se describe el efecto de cinco fitorreguladores (ácido indol butírico, ácido naftalén acético, bencilaminopurina, ácido 2,4-diclorofenoxi acético, y Kinetina) en la diferenciación tisular de *P. santossi*, a partir de dos explantes (meristemos caulinares y láminas foliares), bajo condiciones *in vitro*. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una técnica biotecnológica que ha abierto numerosas vías de acceso a la conservación, multiplicación y mejoramiento genético de especies que presentan alto interés socioeconómico y ambiental, donde la población humana exige cada vez más y mejores condiciones de vida.

Con la propagación de *P. santossi* bajo condiciones *in vitro* se pretende contribuir con el establecimiento de un protocolo para la propagación masiva de esta especie, como una herramienta para su conservación ecológica, y el establecimiento de bancos de germoplasma, a fin de asegurar su potencial uso sostenido en el ámbito ambiental, que a largo plazo podría ampliarse hacia la recuperación de zonas altamente afectadas por la gran actividad antrópica. En este contexto, esta investigación permite la apertura a nuevas opciones para asegurar la conservación de numerosas especies que se

encuentran en vías de extinción, tanto a nivel nacional como internacional.

Materiales y métodos

Material vegetal y adaptación a condiciones *in vitro*

Los meristemos caulinares, obtenidos a partir de secciones de cormos, y las láminas foliares de *P. santossi* se colectaron a partir de plantas que presentaban una longitud entre 10 y 15 cm. Estas plantas se encontraron en los alrededores de la laguna El Verjón, ubicada en el Páramo de Cruz Verde, km 16 vía Choachí, departamento de Cundinamarca.

Las plantas fueron sumergidas en una solución de Benlate® al 2% durante 12 h y posteriormente se realizaron cuatro enjuagues consecutivos con solución jabonosa y agua destilada estéril. Después, los cormos y las láminas foliares se suspendieron en alcohol al 70% durante un minuto. Cada tipo de explante se sumerge en solución de hipoclorito de sodio al 0,5; 1,0 y 1,5% durante 5, 10 y 15 minutos, para un total de 9 tratamientos (tabla 1). Finalmente, se realizan tres enjuagues en agua destilada y estéril. En seguida, los 160 meristemos caulinares son aislados a partir de cormos bajo el estereomicroscopio, y sembrados en los 16 tratamientos que evalúan el efecto combinado

del AIB y del BAP en su desarrollo morfogénico bajo condiciones *in vitro*. De igual forma, de las hojas de *P. santossi* se obtienen 160 explantes de 2 cm² que son inoculados en los tratamientos que evalúan el efecto combinado del ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) y la Kinetina en el desarrollo morfogénico de láminas foliares bajo condiciones *in vitro*.

Medios utilizados y condiciones de cultivo. El medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962), fue utilizado en el establecimiento *in vitro* de meristemos y láminas foliares de *P. santossi*, enriquecido con los siguientes cinco fitorreguladores de acuerdo con el tipo de explante utilizado: en el cultivo de meristemos caulinares, el ácido indol butírico (AIB) (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L) y la bencilaminopurina (BAP) (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L) para un total de 16 tratamientos. En el enraizamiento de los brotes regenerados, el ácido α -naftalén acético (ANA) (0,0; 1,0; 2,0 y 3,0 mg/L) para un total de cuatro tratamientos; en láminas foliares el ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L), y la Kinetina (Kin) (0,0; 1,0; 3,0 y 5,0 mg/L) para un total de 16 tratamientos.

Adicionalmente, a los medios de todos los tratamientos se les proporcionó 3% (w/v) de sacarosa y 0,8% (w/v) de agar. El pH de los medios fue ajustado a 5,8, antes de ser esterilizados a una presión de 1,06 kg/cm² durante 20 minutos.

Tabla 1. Diseño experimental para la obtención de explantes de *P. santossi* libres de patógenos bajo condiciones *in vitro*, mediante el empleo del hipoclorito de sodio

Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo (min)	Tratamiento
0,5	5	1
	10	2
	15	3
1,0	5	4
	10	5
	15	6
1,5	5	7
	10	8
	15	9

Incubación. Una vez fueron sembrados los explantes en los diferentes tratamientos bajo condiciones asépticas en la cabina de flujo de aire laminar horizontal, fueron incubados durante 36 semanas de observación, en un cuarto de crecimiento a temperatura controlada de 23 °C, a un fotoperiodo de 12 horas de irradiación lumínica con tubos fluorescentes de luz día FL-20D/18, 20 W, China Electric Co., Taipei.

Análisis estadístico. En este estudio se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4 x 4, con concentraciones de 0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L para el ácido indol butírico (AIB), y 0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L para la bencilaminopurina (BAP), tanto en la adaptación de meristemos como en la proliferación de brotes. Para el enraizamiento de los brotes regenerados se empleó el ácido α -naftalén acético (ANA) (0,0; 1,0; 2,0 y 3,0 mg/L) para un total de cuatro tratamientos. En el cultivo de láminas foliares se utilizaron el ácido 2,4-dicloro-fenoxy acético (2,4-D) (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L) y la Kinetina (Kin) (0,0; 1,0; 3,0 y 5,0 mg/L) para un total de 16 tratamientos, que determinaron el desarrollo morfo genético de *P. santosii*. Se utilizaron diez réplicas en cada tratamiento, cada réplica estaba representada por una unidad experimental de cultivo con un explante, para un total de 160 unidades experimentales en cada experimento.

Los resultados logrados durante las 36 semanas de observación fueron estadísticamente analizados empleando el análisis de varianza (Anava) utilizando la prueba de Fischer "F" (Steel y Torrie, 1985), a fin de identificar el mejor tratamiento de la propagación *in vitro* de *P. santosii*.

Resultados y discusión

Adaptación a condiciones *in vitro*

En el cultivo de meristemos caulinares y explantes de láminas foliares, los 16 tratamientos que evalúan el efecto de la concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición en la obtención de explantes de *P. santosii* libres de patógenos bajo condiciones *in vitro* presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) (tabla 2).

La utilización del Benlate® y el hipoclorito de sodio en el proceso del control de la contaminación mostró resultados favorables, eliminando en un 100% y con rapidez tanto las bacterias como los hongos, especialmente *Aspergillus*, *Penicillium* y la levadura del género *Rhodotorula*, fijadora de nitrógeno, que aparece constantemente en los meristemos y se presume que no interfiere en el desarrollo celular del explante como las bacterias. De los nueve tratamientos evaluados se observa claramente que

Tabla 2. Análisis de varianza de la desinfección de los explantes estudiados

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	F de las tablas
Tratamientos	8	5,12	0,64	4,19**	0,05= 2,69 0,01= 4,02
Bloques	4	0,32	0,08	0,52	
Error	32	4,88	0,15		
Total	44	10,32			

el tratamiento 5 (NaOCl al 1% - 10 min), con un 0% de contaminación, fue el único tratamiento que pudo eliminar completamente los microorganismos contaminantes y mantener el explante en buenas condiciones (figura 1). Aunque los tratamientos 7 (NaOCl al 1,5% - 5 min), 8 (NaOCl al 1,5% - 10 min) y 9 (NaOCl al 1,5% - 15 min), permitieron un alto control de los contaminantes, se obtuvo un 100% de oxidación y posterior necrosis del explante.

Estos resultados concuerdan con los procesos de adaptación a condiciones *in vitro* de otras especies, como en el caso de *Echinacea purpurea*, donde el hipoclorito de sodio es el desinfectante que presenta múltiples ventajas en el control de los agentes contaminantes (Loaiza et ál., 2004). De hecho, el hipoclorito de sodio es un compuesto activo frente a bacterias, virus, hongos y esporas bacterianas que en concentraciones adecuadas puede emplearse como un desinfectante químico. Sin embargo, la aplicación práctica de sus propiedades se contrapone por la acción oxidante que esta solución exhibe y que provoca daño en las superficies sobre las que actúa (Beena et ál., 2003).

Adicionalmente, es importante destacar que las combinaciones de diferentes desinfectantes como el Benlate® y el hipoclorito de sodio son ampliamente utilizadas por el alto grado de control que ejercen contra los agentes contaminantes. Además, las soluciones que contienen cloro son empleadas regularmente por su seguridad, adecuado costo, simplicidad de uso, rapidez de acción y gran espectro antimicrobiano (Carmona, 2003). De hecho, el hipoclorito de sodio es el desinfectante a base de cloro más comúnmente empleado (Blanco y Valverde, 2004). También es importante resaltar que el tipo de tejido que se utiliza para iniciar el cultivo *in vitro* tiene gran influencia en la eficiencia de la desinfección (Jiménez et ál., 2004). Los explantes tomados de plantas en crecimiento y plantas con ápices meristemáticos cubiertos son más fáciles de desinfectar que los explantes de plantas adultas donde la desinfección se hace muy difícil (Pérez y Jiménez, 1995).

En el caso de *P. santosii* la probabilidad de encontrar un gran número de agentes contaminantes es alta en plantas adultas, teniendo en cuenta que estas plantas se encuentran en ambientes paramunos altamente húmedos, situación que favorece el desarrollo y manteni-

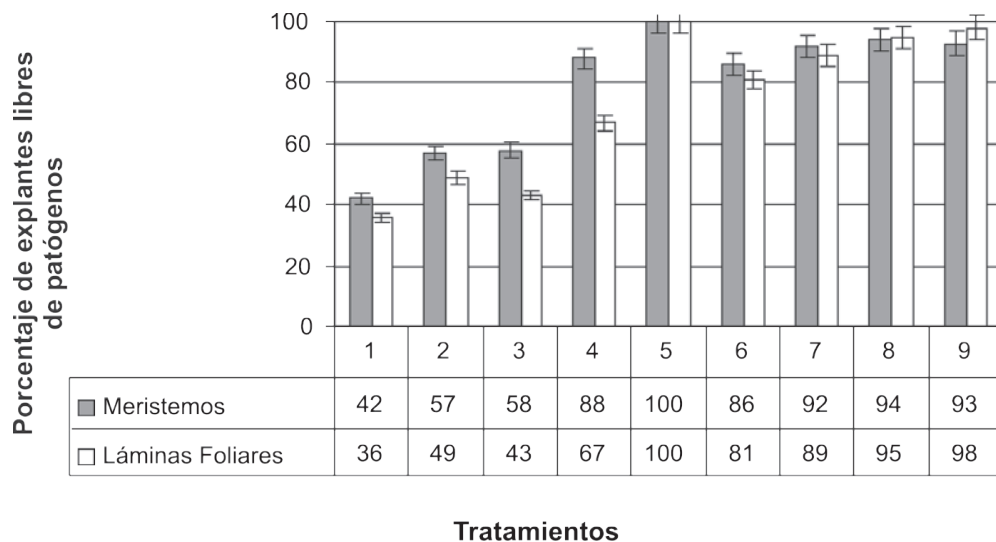


Figura 1. Porcentaje de meristemos y láminas foliares de *P. santosii* libres de patógenos por el efecto de la concentración y el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio (desviación estándar = 4,26).

miento sostenible de los microorganismos que potencialmente logran invadir los medios de cultivo, cuando los explantes son inoculados *in vitro*, debido a la disponibilidad de nutrientes, reguladores de crecimiento, vitaminas y fuentes de carbono como la sacarosa, y a las óptimas condiciones medioambientales. En términos generales, el uso de plántulas jóvenes de *P. santossi* como fuente de explantes para cultivarlas *in vitro* es muy beneficioso gracias a su estado fisiológico y fitopatológico, situación que facilita tanto el proceso de adaptación a condiciones *in vitro*, como también las respuestas de desarrollo morfológico, debido a los balances de los fitorreguladores presentes en sus tejidos, que fisiológicamente son muy activos y promueven la respuesta morfogenética a las peticiones ambientales.

Proliferación de brotes. Los 16 tratamientos que evalúan el efecto combinado del AIB y del BAP en el desarrollo morfogénico de meristemos de *P. santossi* bajo condiciones *in vitro*, a fin de lograr una adecuada proliferación de brotes, presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) (tabla 3). Además, la prueba de Fischer evidenció que el tratamiento 4 (AIB 0,0 mg/L y BAP 1,5 mg/L), con un

promedio de 4,6, fue el mejor promotor de la regeneración de brotes en meristemos de *Puya santossi*, en doce semanas de cultivo, seguido por los tratamiento 11 (AIB 1,0 mg/L y BAP 1,0 mg/L) y el 12 (AIB 1,0 mg/L y BAP 1,5 mg/L), con una media de 3,0 y 3,3 respectivamente, mientras que los demás tratamientos son menos adecuados para la regeneración de brotes (figura 2).

Es importante tener en cuenta que continuando en su fase de proliferación, la producción de brotes mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* favorece un incremento logarítmico en la producción de los brotes en el tratamiento cuatro. Estos resultados evidencian que la presencia de la citoquinina BAP en altas concentraciones es el fitorregulador clave para inducir el proceso de proliferación de brotes. De hecho, con el tratamiento 4 se logró una mayor proliferación de brotes a partir de los meristemos, después de 16 semanas de incubación. Aunque los tratamientos 11 y 12 presentaron también un buen efecto, con un promedio de tres brotes regenerados en las 16 semanas de incubación, se evidencia que es mucho más práctico y menos costoso propagar *P. santossi* con la ayuda de un solo regulador de

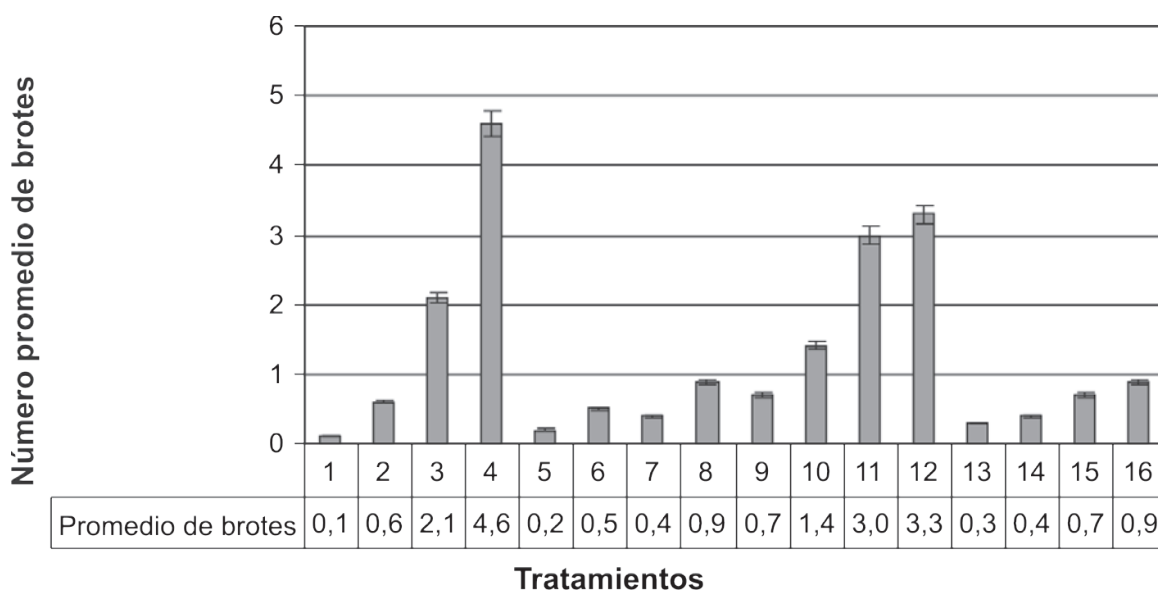


Figura 2. Promedio de brotes desarrollados a partir de meristemos de *P. santossi*, por el efecto del AIB y del BAP bajo condiciones *in vitro* (desviación estándar = 4,84).

Tabla 3. Análisis de varianza y efecto factorial de brotes micropropagados

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	"F" calculado	"F" tabla
Tratamientos	15	13,2	0,88	2,58**	0,05 = 1,92 0,01 = 2,52
AIB	3	3,1	1,03	3,02*	0,05 = 2,76 0,01 = 4,13
BAP	3	1,9	0,63	1,85	0,05 = 2,76 0,01 = 4,13
(AIB)(BAP)	9	8,2	0,91	2,67*	0,05 = 2,04 0,01 = 2,72
Error	64	22	0,34		
Total	79	35,2			

crecimiento y no con los dos. De esta forma, es evidente que el BAP, por sí solo, produce óptimos resultados en la proliferación de brotes a una concentración de 1,5 mg/L, desde la cuarta semana de evaluación (figura 3); BAP es un fitorregulador que es uno de los más utilizados en programas de propagación (Rodríguez et ál., 2003). Además, es importante señalar que el AIB no indujo ni el desarrollo de los meristemas ni la formación de las raíces. Esta respuesta manifiesta que los receptores celulares del AIB en los meristemas caulinares de *P. santossi*, pueden estar inactivados o simplemente no existen, a diferencia de los receptores del BAP que reciben y traducen la señal fisiológica en concentraciones de 1,5 mg/L, porque técnicamente estos fitorreguladores son los mensajeros que permiten promover desdiferenciaciones celulares, de acuerdo con los propósitos de las investigaciones biotecnológicas (Pedroza et ál., 2005; Flórez y Pedroza, 2006).

Además, la tendencia actual en la propagación de plantas es el empleo de medios de cultivo sencillos, lo que ha sido posible debido al conocimiento cada vez mayor que se tiene de los demás factores que influyen en el cultivo *in*

vitro. Es muy posible que la búsqueda de medios de cultivo cada vez más simples, particularmente en lo que se refiere al uso de fitorreguladores de crecimiento, haya sido propiciada por la aparición de múltiples y variados efectos tanto *in vitro* como *ex vitro* en los materiales reproducidos en presencia de altas concentraciones de los fitorreguladores de crecimiento (Loaiza et ál., 2004). Estos resultados confirman que un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo, y las que se encuentran en los explantes cultivados *in vitro*, es necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas, porque influyen en el desarrollo fisiológico de los vegetales (Martínez y Pacheco, 2006).

De hecho, el balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante (Pedroza y Micán, 2006). Por ejemplo, se ha comprobado que a medida que se aumenta la concentración del BAP en varias especies, se aprecia una disminución de la longitud de los brotes y el incremento en su proliferación, por las altas concentraciones endógenas de este fi-

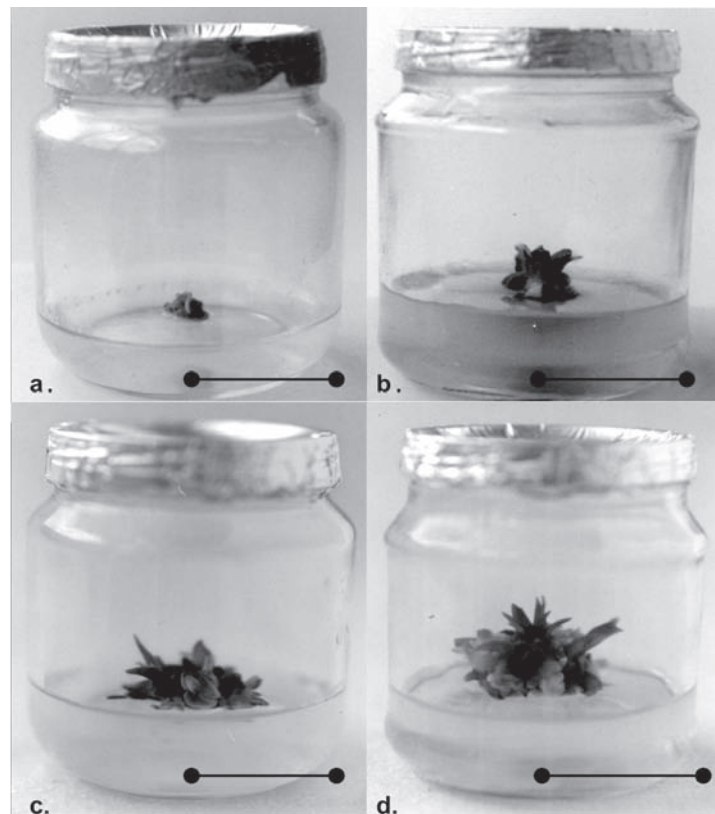


Figura 3. Efecto de 1,5 mg/L de BAP, en la proliferación de brotes de *P. santossi*, a partir de meristemos, durante 12 semanas de desarrollo bajo condiciones *in vitro*.

- a) Meristemo de 4 semanas, con 2 primordios foliares (barra = 3 cm)
- b) Meristemo de 8 semanas, con 4 hojas en desarrollo (barra = 3 cm)
- c) Plántula de 10 semanas, con 2 brotes (barra = 3 cm)
- d) Plántula de 12 semanas, con 4 brotes (barra = 3 cm)

torregulador alcanzadas por los brotes (Sánchez et ál., 2002; Rodríguez et ál., 2003; Sotolongo et ál., 2003). Algunas especies son cultivadas sin adición de reguladores externos, probablemente debido a que existe suficiente cantidad endógena de hormonas (Albany et ál., 2006). Además, es importante señalar que usualmente en los meristemos caulinares la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada. Algo contrario sucede con las auxinas, dado que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemos que son empleados como material inicial para el cultivo *in vitro*, son áreas de síntesis de auxinas

por lo que su concentración endógena es alta en ellos (Pedroza et ál., 2006).

En términos generales, se observa que es importante la presencia de citoquininas exógenas en el rompimiento de la dominancia apical del meristemo caulinar en *P. santossi*, al provocar un desequilibrio en la relación auxina : citoquinina endógena, que se manifiesta en la formación de brotes potencialmente iniciadores de plántulas.

Enraizamiento de brotes. Los cuatro tratamientos que evalúan el efecto del ANA en el enraizamiento de los brotes regenerados bajo condiciones *in vitro*, a fin de lograr la obtención de vitroplántulas de *P. santossi*, presen-

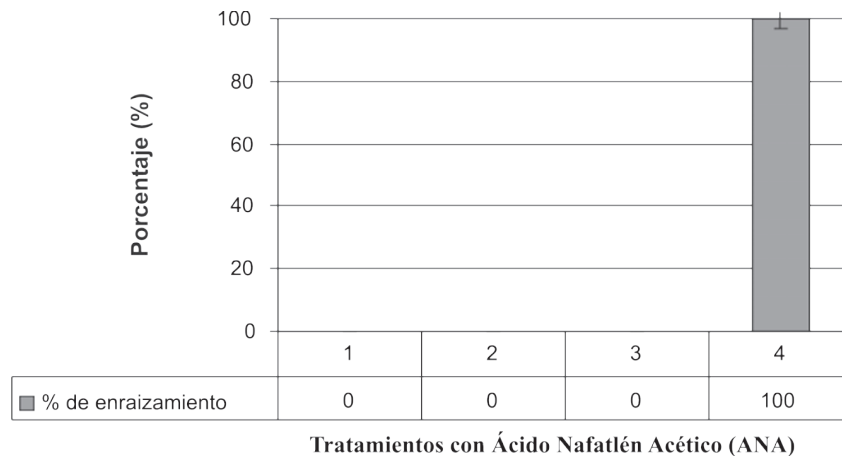


Figura 4. Porcentaje de brotes enraizados de *P. santossi* por el efecto del ANA bajo condiciones *in vitro* (desviación estándar = 3,33).

taron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). La mejor respuesta de enraizamiento se presentó en el tratamiento 4 (3,0 mg/L de ANA), con un porcentaje del 100% en la décima semana de evaluación, mientras que los tratamientos 1, 2 y 3 (0,0; 1,0 y 2,0 mg/L de ANA) no mostraron formación de raíces (figura 4), tal vez debido al efecto residual de la citoquinina adicionada al medio de cultivo durante la fase de proliferación de brotes, produciendo un efecto inhibitorio en la formación de raíces. Lo único que se evidenció fue un aumento en su elongación y desarrollo celular, promovido por la acción de la auxina (Salisbury y Ross, 2000; Uribe y Cifuentes, 2004). El efecto de 3,0 mg/L del ANA sobre los brotes adventicios promueve el proceso de rizogénesis, donde las raíces presentan un tamaño de aproximadamente 1,5-2,0 cm de longitud con buen vigor. Las raíces adventicias se originan en la parte basal del corcho o a partir de brotes, asumiendo la función de raíz primaria, y las raíces secundarias son ramificadas (Hernández et ál., 2005; Bonfil et ál., 2007).

En una planta originada *in vitro*, el enraizamiento se caracteriza por ser la fase más voluminosa de todo el proceso, pues en ella cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación

debe ser cultivada y manipulada *in vitro* para que, además de crecer y desarrollar unseudotallo o tallo con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una vitroplanta climatizada lista para llevarse al campo.

Sin embargo, las raíces obtenidas *in vitro* son vulnerables y no funcionan de forma adecuada *in vivo* porque no poseen, o poseen muy pocos pelos radicales. La rizogénesis es el proceso más comprometido en la multiplicación vegetativa (Hartman et ál., 1997). Es importante destacar que los meristemos de raíz tienen diferentes orígenes: meristemos laterales de la raíz principal que se forman de manera espontánea en condiciones naturales, meristemos adventicios originados en diferentes órganos (tallos, hojas, bulbos, etc.), y meristemos neoformados en un callo, que pueden considerarse como un caso particular (Margara, 1988). Además, a través de numerosas investigaciones se ha comprobado que la rizogénesis está directamente relacionada con el aumento en el nivel de auxinas con relación al de citoquininas. Generalmente, las auxinas más utilizadas en la fase de enraizamiento, a nivel *in vitro*, son el ANA, AIB, AIA y 2-4, D, con una eficiencia del 55, 29, 11 y 3,6% en los medios de cultivo,

respectivamente. Por esta razón se empleó para la fase de enraizamiento de los brotes de *Puya santossi* el ácido naftalenacético (ANA), porque se ha demostrado que es la auxina más efectiva para la inducción de raíces en plantas herbáceas, mientras que el AIB es la principal promotora de raíces en plantas leñosas (Taiz y Zeiger, 1998; Vásquez et ál., 2006).

Inducción de morfogénesis

Los 16 tratamientos que evalúan el efecto combinado del 2,4-D y la Kinetina en el desarrollo morfogénico de láminas foliares de *P. santossi* bajo condiciones *in vitro*, no mostraron diferencias estadísticas. De hecho, en las 160 láminas foliares incubadas, ningún tratamiento permitió la diferenciación de novo a partir de las láminas foliares durante las 36 semanas de observación.

Ante estos resultados, las monocotiledóneas, con relación a las dicotiledóneas, tienen baja probabilidad de desarrollar el proceso de desdiferenciación celular. Por esta razón, la inducción morfogénica se ve completamente restringida como en el caso de especies de *Asteraceae* en vías de extinción (Izquierdo, 2006) y *Aster ericoides* (Salazar et ál., 2005).

De igual forma, aunque muchos estudios han demostrado que algunas especies requieren de concentraciones adecuadas de auxinas con relación a la citoquininas, este equilibrio hormonal es el que favorece la formación del tejido calloso, que es desdiferenciado, especialmente en especies dicotiledóneas (Bolaños-Villegas, 2005; Ruiz et ál., 2006), pero solo en especies que tienen alta vulnerabilidad a las respuestas morfológicas de los fitorreguladores. Algunas especies solo necesitan la acción de las auxinas para la iniciación de callo, porque las auxinas suprimen la morfogénesis y dan como resultado la rápida proliferación de células tipo callo (Robledo y Carrillo, 2004; Montero et ál., 2006).

Además, el carácter coriáceo de las hojas de *P. santossi* no permite una fácil absorción de los compuestos presentes en el medio de cultivo así como tampoco la manifestación del de-

sarrollo morfogénico por vía organogénica o embriogénica. En este contexto, la inhibición del proceso morfogénico de los explantes foliares de *P. santossi* pudo ocurrir por la presencia de las algas clorofíceas que se descubrieron en asociación con los tejidos parenquimáticos de las hojas (figura 5).

Es importante destacar que aunque el origen de las algas es incierto, es evidente que la forma y disposición de sus hojas constituyen un reservorio de humedad que favorece el desarrollo de estos microorganismos simbióticos. Además, *P. santossi* habita en sitios pantanosos con bastante contenido de agua, situación que es el hábitat adecuado para el desarrollo de las algas. Es posible que la presencia de las algas inhiba el acercamiento de los fitorreguladores con los receptores celulares de las células de *P. santossi*, evitando la recepción y la traducción de la señal molecular que portan los fitorreguladores.

De igual forma, la multiplicación y el desarrollo *in vitro* de las algas clorofíceas se activó por el contacto con los diferentes compuestos del medio de cultivo y las condiciones ambientales de incubación, que al parecer son las condiciones más adecuadas para su proliferación y desarrollo celular (figura 5d).

En términos generales, el cultivo de meristemas *in vitro* es una herramienta efectiva en la propagación de *P. santossi* como una alternativa de multiplicación y conservación de germoplasma de esta importante especie en los ecosistemas altoandinos. De igual forma, el descubrimiento de las algas clorofíceas, en asociación simbiótica con los tejidos parenquimáticos de *P. santossi*, abre nuevas alternativas en los estudios celulares y moleculares de esta relación fisiológica.

Conclusiones

En la adaptación de explantes de *P. santossi* bajo condiciones *in vitro* es necesario utilizar el fungicida Benlate® al 2% durante 12 horas, y posteriormente el hipoclorito de sodio al 1,0%

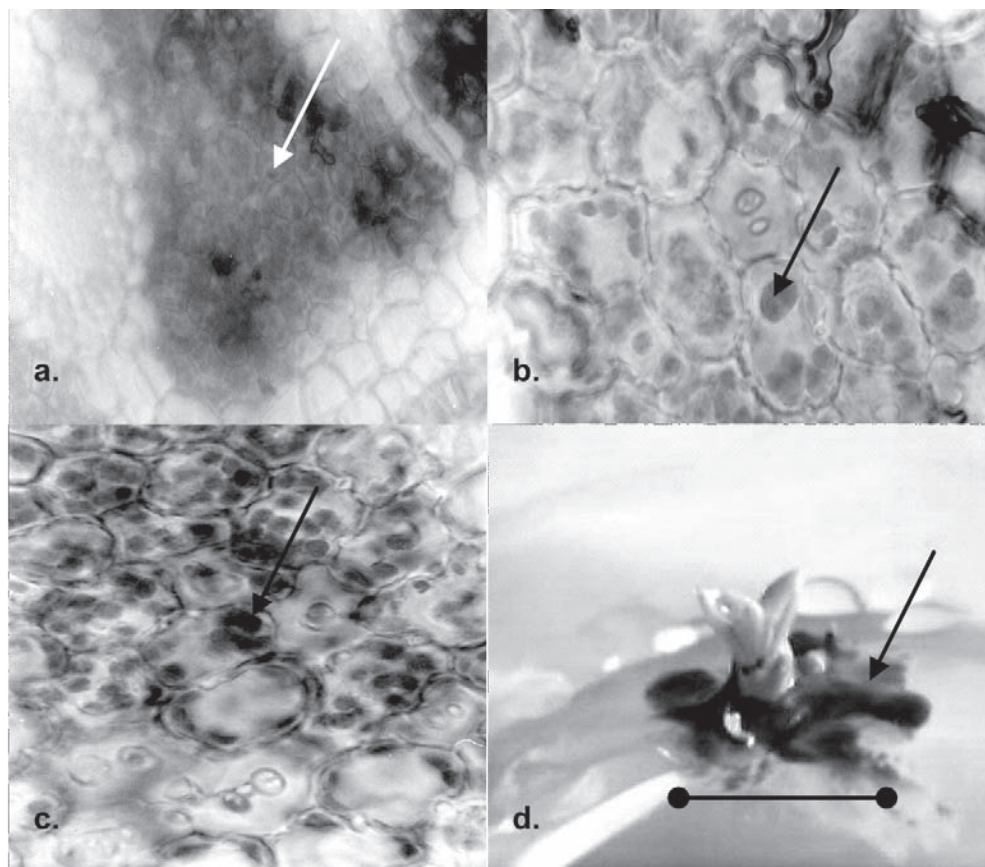


Figura 5. Microfotografías que evidencian la presencia de algas clorofíceas en el tejido parenquimático de las hojas jóvenes de *Puya santosi*. En las microfotografías a, b y c, la flecha indica la presencia de las algas dentro del parénquima foliar (aumento de 1000 x). En la microfotografía d, se observa el desarrollo de las algas sobre el medio de cultivo, cuando el meristemo es cultivado bajo condiciones *in vitro* (barra = 1 cm).

por 10 minutos en tejidos jóvenes, a fin de evitar procesos de contaminación y de oxidación.

Para la propagación *in vitro* de *Puya santosi*, el explante más conveniente es el meristemo caulinar, permitiendo la proliferación masiva de brotes adventicios cuando son cultivados en el medio MS enriquecido con 1,5 mg/L de BAP, generando en promedio 4,6 brotes en 12 semanas de cultivo, que continuando en su fase de proliferación, la producción de brotes mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* favorece un incremento logarítmico en la producción masiva de los brotes. El enraizamiento de los brotes, provenientes del cultivo de me-

ristemos, se logró con 3,0 mg/L de ANA, con un promedio de dos raíces en diez semanas.

En esta investigación se descubrieron un grupo de algas clorofíceas que se encuentran asociadas de forma simbiótica con *P. santosi*, que presumiblemente inhiben el proceso morfogénico bajo condiciones *in vitro* de las láminas foliares, a pesar de que contribuyen con el crecimiento de las yemas por la fijación de nitrógeno.

Agradecimientos

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

Referencias bibliográficas

- Albany, N.; Vilchez, J.; León, S.; Molina, M.; Chacín, P. 2006. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 23: 213-222.
- Beena, M. R.; Martin, K. P.; Kirti, P. B.; Hariharan, M. 2003. Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 285-289.
- Blanco, M.; Valverde, R. 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. *Agronomía Costarricense* 28 (1): 39-46.
- Bolaños-Villegas, P. 2005. Propagación de *Zamia skinneri* W. una planta tropical ornamental en peligro de extinción. *Rev. Agr. Trop.* 35: 107-117.
- Bonfil, C.; Mendoza, P.; Ulloa, J. A. 2007. Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera*. *Agrociencia* 41: 103-109.
- Carmona, M. 2003. Daños y pérdidas causadas por enfermedades. Importancia del manejo integrado. Ubicación estratégica de fungicidas foliares. *Actas jornadas técnicas de manejo integrado de enfermedades en cultivos extensivos*, pp. 10- 15.
- Flórez, V.; Pedroza, J. 2006. Germinación y dormancia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, pp. 71-74.
- Hartman, H.; Kester, D.; Davies, F.; Geneve, R. 1997. Plant propagation: principles and practices. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., pp. 125-144.
- Hernández, J. R.; Aramendiz, H.; Cardona, C. E. 2005. Influencia del ácido indol butírico y ácido naftalén acético sobre el enraizamiento de esquejes de caña flecha (*Gynenium sagittatum* Aubl.). *Temas agrarios* 10 (1): 5-12.
- Instituto Alexander von Humboldt. 1997. Informe nacional sobre el estado de biodiversidad: Especies de plantas superiores amenazadas. Bogotá: Instituto Alexander von Humboldt, pp. 35-41.
- Izquierdo, P. 2006. Desarrollo de protocolos de micropropagación para dos especies de Asteraceas endémicas de las islas de Galápagos, en peligro crítico de extinción. *Lyonia* 9(2): 57-62.
- Jiménez, V. M.; Castillo, J.; Tavares, E.; Guevara, E.; Montiel, M. 2004. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth a partir de explantes nodales. *Memorias del Simposio Internacional Guadua*. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira, septiembre 27 a octubre 2 de 2004.
- Loaiza, J.; Valverde, R.; Gómez, L. 2004. Micropropagación de *Echinacea purpurea* a partir de brotes y semillas. *Agronomía Costarricense* 28 (2): 17-26.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa *in vitro*: los meristemos y la organogénesis. España: Ediciones Mundo-prensa, pp. 51-53.
- Martínez, M. A.; Pacheco, J. C. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía Colombiana* 24 (2): 207-213.
- Montero, C.; Macías, E.; Wong-Vega, L. 2006. Organogénesis directa y múltiple en tejidos juveniles de guandú o guandul (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Invet. Pens. Crit.* 4: 20-31.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Okada-Katsuo, A. 2001. La biodiversidad y los peligros que la amenazan. En: Perea Dallos, M. (ed). Biotecnología agrícola: un enfoque hacia el mejoramiento de plantas. Bogotá: Editora Guadalupe, pp. 29-41.
- Pedroza, J. A.; Fernández, C.; Suárez, A. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Compartmentia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41: 838-843.
- Pedroza, J. A.; Micán, Y. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42 (6): 543-547.
- Pérez, P.; Jiménez, G. E. 1995. Micropropagación y fundamentos teóricos prácticos del cultivo *in vitro*. *Conferencias en biotecnología agrícola*, pp. 1-10.
- Robledo, A.; Carrillo, G. 2004. Regeneración *in vitro* de plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocótilos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27 (2): 121-126.
- Rodríguez, R.; Daquinta, M.; Capote, I.; Pina, D.; Lezcano, Y.; González, J. L. 2003. Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogani* (Caoba híbrida) y *Cederla odorata* (cedro). *Cultivos tropicales* 24 (3): 23-27.
- Ruiz, S.; Hernández, C. A.; Hoyos, R.; Medina, M.; Restrepo, L. F. 2006. Estudios preliminares en la estandarización de un protocolo para la obtención de callos embriogénicos en dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) de diferentes orígenes geográficos. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 8 (1): 32-47.
- Salazar, R.; Vargas, T. E.; García, E.; Oropeza, M. 2005. Micropropagación y organogénesis de *Aster ericoides*, cultivar Monte Cassino. *INCI* 30 (5): 1-12.

- Salisbury, F.; Ross, C. 2000. Fisiología vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. España: Thomson Editores Paraninfo, S. A., pp. 573-574.
- Sánchez, N. G.; Rebolledo, V.; Mata, M. 2002. Inducción de brotación múltiple en *Diospyros riojae* por medio del cultivo de tejidos vegetales. *Forezta veracruzana* 4: 41-46.
- Sotolongo, R.; García, M.; Junco, L.; Geada, G.; García, E. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrta-ceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional* 24 (1-2): 245-250.
- Steel, R.; Torrie, J. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. Bogotá: McGraw Hill, pp. 328-367.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 1998. Plant physiology. 2ª ed. Sunderland: Sinanuer Associates, Inc., pp. 458-461.
- Uribe, M.; Cifuentes, L. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque (Valdivia)* 25 (1): 129-135.
- Vásquez, C.; Gutiérrez, A. M.; Álvarez, J. I. 2006. Propagación por estacas juveniles del balso blanco (*Heliocarpus americanus* L.) utilizando propagadores de sub-irrigación. *Rev. Fac. Nal. Agr.* 59 (2): 3479-3498.