Se realizaron pruebas de regeneración *in vitro* mediante el cultivo de semillas en 17 especies de orquidáceas que crecen en la región de Santander, algunas endémicas (*Cattleya mendelii, Catasetum lucis, Cycnoches chlorochilon, Peristeria elata, Oncidium hastilabium, Mormodes buccinator, Trichocentrum cebolleta, Prosthechea fragrans, Epidendrum ibaguense. Sobralia uribei, Santanderella amadorinconiana, Eriopsis biloba, Epidendrum nocturnum* y *Sieverkingia sp, Anguloa clowesii, Acineta superba y Rodriguezia lanceoloata).*

La eficiencia de la regeneración de plántulas fue medida en las fases siguientes:

i. Germinación de semillas, evaluada en términos de porcentaje y velocidad de germinación;
ii. Desarrollo y multiplicación de protocormos hasta formación de plántulas en medios *Murashige Skoog* (MS) modificados y Knudson C (K) medido a través de las variables: altura de la planta, formación de raíces y pseudobulbos;
iii. Aclimatación, cuya variable asumida fue el porcentaje de sobrevivencia como parámetro de comparación.

Los protocolos empleados en el estudio permitieron establecer que las especies presentaron porcentajes de germinación elevados en el medio MS en la totalidad de sales, así como la diferenciación de protocormos en plántulas en diferentes formulaciones de medio basal MS y K fueron eficientes para garantizar la obtención de tasas proliferativas altas de plantas y de gran vigor que como consecuencia favorecieron porcentajes de adaptación y desarrollo elevados durante las etapas de aclimatización y endurecimiento tenidas en cuenta en el ensayo. El texto tiene como como propósito compartir los resultados obtenidos con el fin de promover la propagación de especies de orquídeas por metodologías *in vitro* para su conservación, reintroducción en su hábitat y comercio sostenible, además de sentar las bases para plantear futuros trabajos encaminados al mejoramiento genético de ciertas especies de orquídeas en el departamento de Santander.

Escanée el código QR para conocer más títulos publicados por Ediciones Universidad Simón Bolívar

ISBN 978-958-5533-50-9

EDICIONES UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR

Universidad de Santander UDES

Contribución a la conservación de *Orquidiaceas* de Santander

Universidad de Santander UDES

UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR
BARRANQUILLA Y CÚCUTA - COLOMBIA | VIGILADA MINEDUCACIÓN
Res. 23095, del MEN

Contribución a la conservación de *Orchidiaceas* de Santander mediante cultivo *In Vitro* de semillas

Martha Rocío Chacón Velasco
Olga Marina Contreras Acero
Helmar Ernesto Cáceres Cárdenas

Contribución a la conservación de *Orchidiaceas* de Santander mediante cultivo *In Vitro* de semillas

Martha Rocío Chacón Velasco
Olga Marina Contreras Acero
Helmar Ernesto Cáceres Cárdenas

CONTRIBUCIÓN A LA CONSERVACIÓN DE ORCHIDIACEAS DE SANTANDER MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO* DE SEMILLAS

© Martha Rocío Chacón Velasco - Olga Marina Contreras Acero
Helmar Ernesto Cáceres Cárdenas

Facultad Ciencias Exactas Naturales y Agropecuarias
Grupo de Investigación Microbiota
Directora: Beatriz Elena Guerra Sierra

Proceso de arbitraje doble ciego
Recepción: Junio de 2018
Evaluación de propuesta de obra: Julio de 2018
Evaluación de contenidos: Agosto de 2018
Correcciones de autor: Octubre de 2018
Aprobación: Octubre de 2018

Universidad de Santander
UDES
Personería Jur. 910 de 12/03/96 Min.Educación
Resolución No. 6216 - 22/12/05 Min.Educación

UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR
BARRANQUILLA Y CÚCUTA - COLOMBIA | VIGILADA MINEDUCACIÓN
Res. 23095. del MEN

Contribución a la conservación de *Orchidiaceas* de Santander mediante cultivo *In Vitro* de semillas

Martha Rocío Chacón Velasco
Olga Marina Contreras Acero
Helmar Ernesto Cáceres Cárdenas

EDICIONES UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR
BARRANQUILLA Y CÚCUTA - COLOMBIA
VIGILADA MINEDUCACIÓN

Chacón Velasco, Martha Rocío
Contribución a la conservación de orchidiaceas de Santander mediante cultivo in vitro de semillas / Martha Rocío Chacón Velasco, Olga Marina Contreras Acero, Helmar Ernesto Cáceres Cárdenas -- Barranquilla: Ediciones Universidad Simón Bolívar, 2018.
176 páginas; figuras, fotos y tablas a color; 17 x 24 cm
ISBN: 978-958- 5533-50-9

1. Orquídeas 2. Orquídeas – Cultivo 3. Floricultura 4. Morfología de las plantas I. Contreras Acero, Olga Marina II. Cáceres Cárdenas, Helmar Ernesto III. Universidad de Santander. Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agropecuarias. Grupo de Investigación Microbiota IV. Título
584.4 C431 2018 Sistema de Clasificación Decimal Dewey 22ª. edición

Universidad Simón Bolívar – Sistema de Bibliotecas

Producido en Barranquilla, Colombia. Depósito legal según el Decreto 460 de 1995. El Fondo Editorial Ediciones Universidad Simón Bolívar se adhiere a la filosofía del acceso abierto y permite libremente la consulta, descarga, reproducción o enlace para uso de sus contenidos, bajo una licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional. https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

©Ediciones Universidad Simón Bolívar
Carrera 54 No. 59-102
http://publicaciones.unisimonbolivar.edu.co/edicionesUSB/
dptopublicaciones@unisimonbolivar.edu.co
Barranquilla - Cúcuta

Universidad de Santander - UDES
Vicerrectoria de Investigaciones
2019

Producción Editorial
Editorial Mejoras
Calle 58 No. 70-30
info@editorialmejoras.co
www.editorialmejoras.co

Diciembre de 2018
Barranquilla

Made in Colombia

Cómo citar este libro:
Chacón Velasco, M. R., Contreras Acero, O. M. & Cáceres, H. E. (2018). *Contribución a la conservación de orchidiaceas de Santander mediante cultivo in vitro de semillas*. Barranquilla: Ediciones Universidad Simón Bolívar.

Agradecimientos

El grupo de Biotecnología Agroambiental, Microbiota de la Universidad de Santander (UDES) y la línea Tecnologías y biotecnologías aplicadas al agroambiente, salud e industria junto con la Asociación de Orquídeas de Santander (*Asorquisan)* expresan sus agradecimientos a:

- La Universidad de Santander, Dirección de investigaciones y a la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales por el apoyo dado en Investigación básica en técnicas de propagación *in vitro* de especies ornamentales a través de convocatoria interna al proyecto titulado "Estudios preliminares de un banco de germoplasma de orquídeas de Santander como contribución a su conservación".

- El rector, Rafael Serrano Sarmiento (qepd), por la apuesta que dio a la ejecución del proyecto; a Victoria Arias, Directora de investigaciones; Álvaro García Pinzón, Decano de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales; y Pedro Elías Patiño, Coordinador de laboratorios.

- Muy especialmente a las personas que formaron parte del equipo de trabajo en el laboratorio de tejidos vegetales durante la ejecución del proyecto: Auxiliares: Técnico Sergio Villamizar, Profesional Nancy

Aguilar; Microbiólogos: Andrea Rubiano, Tatiana Castro, Rigoberto Pinilla.

- Los Coinvestigadores: Olga Contreras y Helmar Cáceres, miembros de la Asociación de Orquideología de Santander (Asorquisan) por el apoyo en la consecución e identificacion del material vegetal, contribución en los registros fotográficos, recopilación e información de las características botánicas de las plantas estudiadas, soporte técnico en la etapa de aclimatación de las vitroplantas y apoyo en la redacción Fase aclimatación.

- Al personal de laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales por su permanente colaboración.

- Beatriz E. Guerra, líder del grupo Microbiota por su apoyo moral permanente durante la ejecución del proyecto.

- Las microbiólogas Adriana Sandoval y Vanessa Ortiz por su apoyo técnico.

Agradezco de igual manera al señor Jaime de Jesús Restrepo Cuartas, Rector de la Universidad de Santander; a César Serrano, Director de investigaciones; a Jhancy Aguilar, Coordinadora de investigación y a Fabiola Aguilar, Decana de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales.

Margarita Cañas por ser quien me inspiró en la disciplina del cultivo *in vitro*.

Martha Rocío Chacón Velasco
Profesora-Investigadora
Universidad de Santander

Contenido

PRESENTACIÓN Y/O INTRODUCCIÓN 17

1. RESUMEN 21

2. ASPECTOS TEÓRICOS 25

2.1. Origen y diversidad de las orquídeas
2.2. Taxonomía y Morfología
2.2.1. Características taxonómicas
2.2.2. Descripción botánica
2.2.2.1. Morfología floral
2.2.2.2. Morfología de las raíces
2.2.2.3. Morfología del tallo
2.2.2.4. Morfología de las hojas
2.2.2.5. Morfología de cápsulas y semillas
2.3. Biología de la germinación de semillas

3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES CULTIVADAS *IN VITRO* 45

3.1. Cattleya
3.1.1. Cattleya mendelii
3.2. Catasetum
3.2.1. Catasetum lucis
3.3. Oncidium
3.3.1. *Oncidium hastilabium*. J. G. Beer, ex Lindley
3.4. Mormodes
3.4.1. Mormodes buccinator
3.5. Cycnoches
3.5.1. Cycnoches *chlorochilon.* J.F. Klotzsch
3.6. Epidendrum
3.6.1. *Epidendrum ibaguense.* A. von Humboldt, A. Bonpland y C. S. Kunth – 1816
3.7. Peristeria
3.7.1. *Peristeria elata.* W. J. Hooker

3.8. Prostechea Kn & Westc. 1838
3.8.1. *Prostechea fragans*: Sinonimia: Encyclia fragrans. Anacheilium fragrans
3.9. Trichocentrum
3.9.1. Trichocentrum cebolleta

4. ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS 61

5. ANTECEDENTES EN CULTIVO *IN VITRO* EN ORCHIDIACEAE 67
5.1. Proceso histórico del cultivo *in vitro* en orquídeas
5.2. Consideraciones en la reproducción *in vitro* de orquídeas a partir de semillas
5.3. Medios de cultivo y condiciones ambientales en el proceso germinativo *in vitro* de semillas
5.4. Maduración de cápsulas y viabilidad de semillas
5.5. Medios de cultivo y desarrollo plantular a partir de protocormos
5.6. Fase de aclimatación o trasplante de vitroplantas

6. MATERIALES Y MÉTODOS 87
6.1. Material vegetal
6.2. Proceso de desinfección
6.3. Establecimiento *in vitro* de semillas en medio de cultivo y condiciones de incubación
6.4. Desarrollo de protocormos y formación de plántula. Medios de cultivo y condiciones de incubación
6.4.1. Evaluación del comportamiento de protocormos de *C. mendelii* en cuatro medios de cultivo
6.4.2. Comparación del efecto de dos medios de cultivo en el estímulo radicular y desarrollo plantular de protocormos de *Trichocentrum cebolleta, Oncidium hastilabium y Mormodes buccinator* en dos medios de cultivo
6.4.3. Evaluación del efecto del medio MS, reguladores de crecimiento y carbón activado sobre el desarrollo de protocormos de *Cycnoches chlorochilon* durante 210 días después de sembradas

6.4.4. Comportamiento de protocormos de *Peristeria elata, Catasetum lucis, Epidendrum ibaguense y Prostechea fragrans* en medio MS con y sin carbón activado (CA)
6.4.5. Aclimatación de las plantas. Fase *ex vitro*

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS 99
7.1. Establecimiento y germinación de semillas
7.1.1. Proceso de desinfección y selección de cápsulas
7.1.2. Respuestas germinativas de semillas de *Orchidaceae* cultivadas en medio MS (1962)
7.1.2.1. Estructura de semillas de Cattleya mendelii. Descripción del proceso germinativo
7.1.2.2. Estructura de semillas de Sobralia uribei. Descripción del proceso germinativo
7.2. Respuesta de los protocormos en medio de proliferación
7.2.1. Evaluación del comportamiento de protocormos de *Cattleya mendelii* en cuatro medios de cultivo
7.2.2. Comparación del efecto de dos medios de cultivo en el estímulo radicular y desarrollo plantular de protocormos de *Trichocentrum cebolleta, Oncidium hastilabium y Mormodes buccinator*
7.2.3. Comportamiento de protocormos de *Peristeria elata, Catasetum lucis, Epidendrum ibaguense y Prostechea fragrans* en medio MS con y sin carbón activado
7.2.4. Evaluación del medio MS, reguladores de crecimiento y carbón activado sobre el desarrollo de protocormos de *Cycnoches chlorochilon*
7.3. Aclimatación de plantas

8. CONCLUSIONES 157

9. REFERENCIAS 163

ACERCA DE LOS AUTORES 175

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura floral de *Cattleya sp*..... 33

Figura 2. Detalle del Androceo y Gineceo fusionados en la columna polinios que alberga granos de polen..... 33

Figura 3. Raíz de *Cattleya* y *Catasetum* con velamen que facilita captación de agua y nutrientes 35

Figura 4. Ubicación del Pseudobulbo en plantas epífitas de *Bulbophyllum vaginatum* y *Catasetum lucis* 36

Figura 5. Cápsula de *Cattleya mendelii* y *Cycnoches chlorochilon* en estado de madurez 38

Figura 6. Estructura de Semillas de *Cattleya mendelii* aumentada 100 veces en microscopio óptico Nikon eclipse NI (Valor escala 100µm) 40

Figura 7. Representación esquemática del proceso germinativo en semillas de orquídeas 42

Figura 8. Representación esquemática del ciclo de vida de una orquídea desarrollada a partir de una semilla 43

Figura 9. Estructura floral de *Cattleya mendelii*. Henry H. Dombrain - 1872 49

Figura 10. Morfología floral de *Catasetum lucis*, especie endémica de Santander 50

Figura 11. Morfología de la planta de *Catasetum lucis*..... 51

Figura 12. Morfología floral de *Oncidium hastilabium*..... 52

Figura 13. Morfología floral de *Mormodes buccinator* 53

Figura 14. Morfología floral de *Cycnoches chlorochilon* 55

Figura 15. Morfología floral de *Epidendrum ibaguense*..... 56

Figura 16. Morfología floral *Peristeria elata* en cultivo..... 57

Figura 17. Morfología floral de *Prostechea fragrans* 58

Figura 18. Morfología floral y parte vegetativa de *Trichocentrum cebolleta* 59

Figura 19. Etapas del proceso de germinación *in vitro* de semillas de orquídeas 71

Figura 20. Plantas de *Peristeria elata* para ser incorporada en la fase de aclimatación 82

Figura 21. Observación de semillas de *Santanderella amadorinconiana* P. Ortiz. 106

Figura 22. Estructura de semillas de *Cattleya mendelii* coloreada con Fucsina y KOH 107

Figura 23. Microfotografías del proceso de germinación y desarrollo de protocormos de *Cattleya mendelii* en microscopio óptico. 108

Figura 24. Microfotografías del proceso de germinación y desarrollo de protocormos de *Cattleya mendelii* en estereomicroscopio Nikon c leds. 109

Figura 25. Detalle de protocormos de *Cattleya mendelii* en proceso germinativo a los 60 días de sembradas en medio MS. 109

Figura 26. Proceso de germinación de *Cattleya mendelii* a los 60 días de sembrada. 110

Figura27. Estructura de las semillas de Sobralia uribei. 111

Figura 28. Germinación e imbibición en *Sobralia uribei* en microscopio óptico Nikon eclipse Ni 111

Figura 29. Diferenciación de plántulas a partir de protocormos de *Sobralia uribei* después de 60 días de sembradas en medio MS a la mitad de sales. 112

Figura 30. Efecto del tiempo y el medio de cultivo sobre el crecimiento de *C. mendelii* 118

Figura 31. Representación gráfica del porcentaje de formación de raíces en plántulas de *C. mendelli* en diferentes medios de cultivo a través del tiempo..... 119

Figura 32. Efecto del tiempo y el medio de cultivo sobre la formación de raíces en *C. mendelii* 119

Figura 33. Proceso del crecimiento plantular en medios MS y MK. 120

Figura 34. Efecto interactivo del medio sobre el porcentaje de formación de raíces (FR%); AP (cm) y formación de PBS en *T. cebolleta, O. hastilabium y M. buccinator* durante el desarrollo plantular..... 126

Figura 35. Efecto interactivo del tiempo sobre el porcentaje de formación de raíces (FR), altura de la planta (AP) y formación de pseudobulbos (PBS) en *T. cebolleta, O. hastilabium* y *M. buccinator* durante el desarrollo plantular..... 128

Figura 36. Formación de brotes de *Oncidium hastilabium* en fase de crecimiento plantular..... 129

Figura 37. Estimulación de brotes en *T. cebolleta*..... 129

Figura 38. Desarrollo de protocormos de *T. cebolleta* durante el periodo de multiplicación de brotes..... 130

Figura 39. Desarrollo de protocormos de *M. buccinator* durante el periodo de multiplicación de brotes. 131

Figura 40. Efecto interactivo del medio sobre la formación de raíces, pseudobulbos y AP (cm) y en *P. elata, C. lucis, E. ibaguense* y *P. fragrans.*..... 137

Figura 41. Efecto interactivo del tiempo sobre la FR, AP y formación de PBS en *P. elata, Catasetum lucis, Epidendrum ibaguense* y *Prostechea fragrans*..... 138

Figura 42. Desarrollo protocormos de *P. elata* durante el periodo de multiplicación de brotes..... 139

Figura 43. Formación de pseudobulbos en *P. elata* y *C. lucis* durante el periodo de multiplicación de brotes a los 120 días de cultivado. 140

Figura 44. Desarrollo de protocormos de *E. ibaguense* en periodo de multiplicación. 140

Figura 45. Representación gráfica del porcentaje de formación de raíces de *C. chlorochilon* en cuatro medios de cultivo ensayados durante los 180 de cultivo *in vitro* 144

Figura 46. Representación gráfica del porcentaje de formación de pseudobulbos en plántulas de *C. chlorochilon* en cuatro medios de cultivo durante los 180 de cultivo *in vitro* 145

Figura 47. Representación gráfica sobre la altura de las plántulas de *C. chlorochilon* en cuatro medios de cultivo 145

Figura 48. Proceso de diferenciación de hojas, tallo y raíces en protocormos de *C. chlorochilon* después de 60 días de recultivados en medio MS 146

Figura 49. Proceso del crecimiento plantular de *C. chlorochilon* en medio MS 146

Figura 50. Vitroplantas de *C. mendelii* en fase *ex vitro* en invernadero UDES. 149

Figura 51. Plantas endurecidas después de 90 días de trasplantadas 150

Figura 52. Plántulas en aclimatación de *Peristeria elata* a los 60 días de transplantadas 150

Figura 53. Plántulas de *C.mendelii* antes de ser sembradas en sustrato.
Comparación del aspecto radicular y foliar antes y a los 60 días de aclimatadas 151

Figura 54 Pino pátula, carbón vegetal y musgo esfágneo empleado durante la aclimatación de vitro-plantas de *C. mendelii* y *C. chlorochilon* en la finca Villa Katy 152

Figura 55. Aclimatación de plántulas de *C. mendelii.* 153

Figura 56. Plántulas de *C. chlorochilon* antes del transplante a sustrato 154

Figura 57. Plántulas de *C. Chlorochilon* durante la aclima-tación y endurecimiento. 155

Lista de Tablas

Tabla 1. Determinación del tiempo de maduración de cápsulas para algunos géneros de orquídeas 73

Tabla 2. Formulación de suplementos y reguladores de crecimiento para el cultivo de protocormos 92

Tabla 3. Registro del porcentaje de germinación de semillas de orquídeas cultivadas en medio MS. 102

Tabla 4. Efecto de la composición del medio y del tiempo en la formación de raíces en *C. mendelii*..... 118

Tabla 5. Efecto del medio y tiempo sobre la formación de raíces en *M. buccinator, T. cebolleta* y *O. hastilabium*..... 123

Tabla 6. Efecto del medio y el tiempo en la altura de la planta de *M. buccinator*, *T. cebolleta* y *O. hastilabium*... 124

Tabla 7. Efecto del medio y tiempo en la formación de pseudobulbos sobre *M. buccinator*, *T. cebolleta y O. hastilabium*..... 125

Tabla 8. Efecto del tiempo y medio sobre la formación de raíces en *C. lucis*, *E. ibaguense*, *P. fragans y P. elata*..... 133

Tabla 9. Efecto del tiempo y medio sobre la altura de las plantas de *C. lucis, E. ibaguense, P. fragrans* y *P. elata*..... 134

Tabla 10. Efecto del tiempo y medio sobre la formación de pseudobulbos en *C. lucis, E. ibaguense, P. fragans* y *P. elata*..... 135

Tabla 11. Efecto del tiempo y medio sobre la formación de raíces en *C. chlorochilon*..... 143

Tabla 12. Efecto del medio y tiempo en la formación de pseudobulbos en *C. Chlorochilon* 144

Tabla 13. Efecto del medio sobre la altura de las plantas en *C. chlorochilon*..... 145

Tabla 14. Porcentaje de sobrevivencia de las vitroplantas y nivel de desarrollo alcanzado a los 60 días de sembradas en sustrato en condiciones de invernadero de la UDES 148

Tabla 15. Porcentaje de sobrevivencia y nivel de desarrollo de las vitroplantas de *C. mendelii* y *C. chlorochilon* alcanzado a los 60 días de sembradas en sustrato en condiciones de casa de malla finca Villa Katy Morrorico 151

Presentación y/o introducción

El registro de la diversidad de orquídeas en Colombia es sorprendente; los inventarios realizados emiten cálculos aproximados, pero se modifican en la medida que se exploran diversas áreas. Estudios realizados en Santander en el 2011 precisaron la existencia de cerca de 3.500 a 4.000 especies en más de 230 géneros, cifra que corresponde al 10 % de las especies existentes y al 25 % del total de los géneros a nivel mundial. Para 2012 fueron reportadas 4.010 especies distribuidas en 260 géneros y en el 2013 se presentó un registro de cerca de 4.100 especies agrupadas en 232 géneros. Para el 2015 el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible a través del Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SIB) afirmó que Colombia cuenta con el mayor número de especies de orquídeas en el mundo, con un total de 4.270 registradas, agrupadas en 274 géneros distribuidos en casi todo el territorio nacional; un total de 1.572 especies son exclusivas del país. El departamento de Santander ocupa actualmente el segundo lugar en riqueza, con un 14 %, de orquídeas a nivel nacional después del departamento de Antioquia. Santander presenta especies endémicas con distribución restringida. Sea el caso mencionar a *Catasetum lucis*, *Sobralia uribei* y *Santanderella amadorinconiana,* las cuales no cuentan con protección para su conservación.

Los investigadores del Instituto Humboldt elaboraron una lista de especies amenazadas en Colombia y mencionaron que las familias con mayor número

de especies en peligro son las orquídeas, seguidas de las palmas y las pasifloráceas (Ochoa, 1998). Dentro de las principales causas de extinción está la destrucción de sus hábitats y expansión de la frontera agrícola como las de mayor impacto, que hace prioritario plantear estrategias para frenar la pérdida de especies; entre ellas: la conservación *in situ* de áreas donde se encuentran los árboles hospederos, insectos y hongos micorrízicos, entre otros. Pero además la ejecución de proyectos de investigación que propendan por la creación tanto de bancos de germoplasma (preservación de semillas, células, tejidos, órganos o plantas bajo cultivo *in vitro* o nitrógeno líquido), así como el cultivo de plantas en vivero. De igual manera los estudios en los aspectos taxonómicos, poblacionales, interacciones ambientales, polinización, biología reproductiva, propagación *in vitro* y *ex situ* serán de gran impacto para la protección de este recurso floral nativo.

El ciclo de vida sexual de las orquídeas comprende la germinación de semillas, desarrollo de protocormos, diferenciación de plantas, etapa reproductiva o floración, polinización, fecundación y dispersión de semillas. El porcentaje de germinación de las semillas de Orchidaceas en condiciones naturales es muy bajo en comparación con el número de semillas producido en cada cápsula; esto obedece a que la cubierta alberga un embrión que no almacena sustancias nutritivas. Por ello estas deben encontrar soportes adecuados como cortezas de árboles que les suministre nutrientes y establecer asociación micorrízica con hongos basidiomicetes del grupo *Rizocthonia sensu latu*, un grupo artificial que incluye hongos cuyas etapas sexuales pertenecen a los géneros *Thanatephorus, Ceratobasidium, Sebacina* y *Tulasnella* para garantizar de manera exitosa el proceso germinativo.

La técnica de cultivo *in vitro* está siendo usada en varios países como uno de los medios que permiten conservar poblaciones silvestres , así como el desarrollo de paquetes tecnológicos adoptados por horticultores, comunidades organizadas e interesadas en la explotación racional de sus recursos para disminuir en gran medida la presión de la colecta de poblaciones

silvestres (Salazar y Mata, 2003). Además dicha técnica favorece la variabilidad genética de las poblaciones (Arditti, 1993).

El cultivo de semillas de orquídeas como modalidad del cultivo *in vitro* de las plantas superiores, tiene como finalidad el acortamiento del ciclo de mejora, sustitución de la simbiosis (micorrizas) y evitar la competición con otros microorganismos.

Se espera que el presente documento pueda brindar a estudiantes de diferentes disciplinas, cultivadores y toda persona amante de las orquídeas las bases para comprender el ciclo de vida de las orquídeas, el estado de vulnerabilidad que presentan algunas especies de la región y el papel protagónico que ha tenido hasta el momento la técnica del cultivo *in vitro* de semillas como herramienta de propagación alterna para incrementar el volumen poblacional a nivel mundial y nacional de las orquídeas endémicas.

1. Resumen

Summary

Se realizaron pruebas de regeneración *in vitro* en el laboratorio de tejidos vegetales de la Universidad de Santander durante un periodo de 24 meses con algunos géneros y especies de la familia orquidáceas que crecen en la región de Santander para obtener vitroplantas de *Cattleya mendelii*, *Catasetum lucis, Cycnoches chlorochilon, Peristeria elata, Oncidium hastilabium, Mormodes buccinator, Trichocentrum cebolleta, Prosthechea fragrans, y Epidendrum ibaguense.* Se estudió el comportamiento de la germinación de semillas de dos especies endémicas de *Santander*, *Sobralia uribei y Santanderella amadorinconiana* y tres especies procedentes de la reserva de virolin*, Eriopsis biloba, Epidendrum nocturnum* y *Sieverkingia sp*, así mismo para *Anguloa clowesii*, *Acineta superba* y *Rodriguezia lanceoloata.*

Se evaluó la fase de germinación de semillas en términos de su porcentaje y velocidad de germinación, el desarrollo y multiplicación de protocormos en medios de cultivo Murashige and Skoog (MS)(1962) y Knudson C(K) con diferentes reguladores de crecimiento. Se trasplantaron en potes comunitarios con una mezcla de sustrato conformado por carbón vegetal, pino pátula y musgo; se evaluó el porcentaje de sobrevivencia. Con los protocolos empleados se establece que los géneros estudiados presentaron porcentajes de germinación elevados en el medio MS en la totalidad de sales así como la diferenciación de protocormos en plántulas en diferentes formulaciones de medio basal MS con variaciones hormonales, que favorecieron un desarrollo plantular adecuado. Como variables consideradas para evaluar la eficiencia de los tratamientos se tuvieron en cuenta la altura de las plantas. Y la formación de raíces y pseudobulbos.

Con el presente estudio se concluye que la metodología de germinación de semillas de orquídeas de forma asimbiótica, permitió obtener plántulas con diferentes tasas proliferativas y variadas velocidades de crecimiento en los medios empleados, así como porcentajes diferentes de adaptación y desarrollo en las condiciones de aclimatización y endurecimiento. El texto tiene como propósito compartir los resultados obtenidos en este proyecto para así promover la propagación de especies de orquídeas por metodo-

logías *in vitro* para su conservación, reintroducción en su hábitat y comercio sostenible, además de sentar las bases para plantear futuros trabajos encaminados al mejoramiento genético de ciertas especies de orquídeas en el departamento de Santander.

Se espera además que el documento pueda brindar a estudiantes de diferentes disciplinas, cultivadores y toda persona amante de las orquídeas las bases para comprender su ciclo de vida, el estado de vulnerabilidad que presentan algunas especies de las región y el papel protagónico que ha tenido hasta el momento la técnica del cultivo *in vitro* de semillas como herramienta de propagación alterna para incrementar el volumen poblacional a nivel mundial y nacional de especies endémicas.

2. Aspectos Teóricos

Theorical Aspects

2.1. ORIGEN Y DIVERSIDAD DE LAS ORQUÍDEAS

Teofrasto (370-285 a.C.) asignó el término de *Orchidiaceas* del latín *Orchis* y del griego *Opxis* que significa testículo semejante a los pseudobulbos referido por Sequeira (1980) y complementado por Dioscórides una vez identificó dos especies similares citado por (Ángel, Leguizamón, Tsubota, Cárdenas, Chávez, Cadena & Bustillo, 2001).

Las orquídeas se originaron aproximadamente hace 120 millones de años; el archipiélago de Borneo se considera el posible lugar de nacimiento de estas plantas. Los cambios evolutivos se han presentado especialmente en caracteres reproductivos a saber: estructuras florales, especificidad de los polinizadores, germinación simbiótica y los mecanismos de aislamiento de las poblaciones le confieren a las orquídeas la enorme capacidad de adaptación y por ello son consideradas como las plantas más evolucionadas del reino vegetal (Ángel, *et al*., 2001).

Constituyen una de las familias de angiospermas más grande y diversificada a nivel planetario, se encuentran en proximidades del círculo Ártico al Antártico por la capacidad de adaptarse eficazmente a las condiciones cambiantes (Banks, 2005). Se estima que existe un número de especies fluctuantes en rangos desde 25.000 a 30.000 en estado silvestre, distribuidas en aproximadamente 800 géneros (Carnevali, Ramírez-Morillo, Romero-González, Vargas & Foldats, 2003). Recientes publicaciones estiman que hay aproximadamente 28.000 especies (Martínez, Bonilla & López, 2016), de las cuales la mayor diversidad estructural de orquídeas existe en el trópico en donde cerca del 70 % de la familia son epífitas, el 25 %, terrestres y el 5 % restante corresponde a orquídeas litófitas u otros ambientes. Se estima que a nivel mundial las 28.000 especies están registradas en un total de 736 a 900 géneros (Schiff, 2018).

El registro de la diversidad de orquídeas en Colombia es sorprendente al estar distribuidas en las tres cordilleras; los inventarios emiten cálculos

aproximados, pero estos se modifican en la medida que se exploran diversas áreas. Por ejemplo, se precisó la existencia de cerca de 3.500 a 4.000 especies en más de 230 géneros, cifra que corresponde al 10 % de las especies existentes y al 25 % del total de los géneros a nivel mundial (López, 2011). De acuerdo a Salazar (2012) se reportan 4.010 especies distribuidas en 260 géneros; Ordóñez (2015) presenta un registro de cerca de 4.100 especies, agrupadas en 232 géneros. Sarmiento en el 2007, citado por Bonilla, *et al.*, 2014, precisó la existencia de 4.010 especies y añadió que el 82,7 % de las especies estaban en la región Andina, seguidas de la Pacífica y Amazónica cada una con un 10,6 %, Caribe y Orinoquía, 5 % y 4 % respectivamente (Bonilla, Otero & Durán, 2013). De acuerdo con el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia –SIB– se dice que "Colombia tiene la fortuna de ser el país con mayor número de especies de orquídeas en el mundo, con un total de 4.270 registradas, agrupadas en 274 géneros distribudos en casi todo el territorio nacional; y un total de 1.572 especies son exclusivas del país" (Ministerio de Ambiente, 2015).

A pesar de que esta información todavía es dispersa y fragmentada, la región Andina ha sido la más estudiada por tener mayor proporción de orquídeas (Martínez *et al*., 2016) y como consecuencia a su vez se reporta que existe un registro elevado de flora amenazada. Así Calderón-Sáenz (2006) seleccionó 18 géneros para el análisis y encontró que unas 371 especies (10 %) de orquídeas de Colombia estarían amenazadas de extinción. Los géneros con mayor porcentaje de especies amenazadas para Colombia son *Anguloa, Restrepia, Lycaste, Drácula, Odontoglossum, Cattleya, Mandesvallia y Miltoniopsis;* cada uno tiene comprometido el 50 % de sus especies en algún nivel de amenaza. Se reporta en el libro rojo a su vez que los géneros encontrados en nivel intermedio con alguna categoría de amenaza son *Cattleya, Anguloa, Cycnoches, Lycaste, Rodriguezia y Phragmipedium.*

Algunos inventarios hechos en Colombia apuntan por conocer la distribución de la orquideoflora en ciertas regiones; el estudio en la Reserva Natural Quininí en Cundinamarca realizado por Ordóñez y Montes (2013) reportó la

existencia de 27 especies de orquídeas en 19 géneros, con predominio de *Epidendrum* (3 especies); *Pleurothalis* (3 especies) y *Elleanthus* (2 especies). Se recalca que el 32 % de las especies halladas en la reserva son utilizadas como ornamentales y destacan que *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f citada como en peligro de acuerdo con la resolución 383 del 23 de febrero de 2010 y reconocida como la flor nacional de Colombia, es altamente codiciada en jardinería en el municipio de Fusagasugá**.**

Los inventarios realizados en Suaita, Santander, por Valencia-Duarte y González-Garavito (2004), mostraron predominancia en esta región de los géneros *Epidendrum, Maxilaria, Pleurotallis, Dichaea y Oncidium,* los cuales representan el 50 % de orquídeas de la zona; así como también Camargo-Celis y Delgado-Cárdenas (2006) reportaron en el municipio de La Mesa de los Santos 45 especies ubicadas en 31 géneros, *Pleoruthallis y Epidendrum* fueron los géneros de mayor predominio y las especies mayoritarias, *Epidendrum ibaguense*, *Sobralia Violacea* y *Sobralia uribei*; ésta última, endémica de esta zona. Es relevante también tanto el registro fotográfico de la orquideoflora de Santander realizado por López (2011), quien reportó alrededor de 342 especies ubicadas en 95 géneros, junto con el estudio elaborado por Martínez *et al.,* (2016), quienes precisaron que en Santander existen alrededor de 581 especies de orquídeas en 142 géneros. El anterior estudio colocó al departamento de Santander en el segundo lugar en riqueza, con un 14 % de orquídeas a nivel nacional después del departamento de Antioquia. Además, el estudio registró dos especies endémicas con distribución restringida como por ejemplo *Catasetum lucis,* ubicada en la subtribu Catasetina, la cual no cuenta con ninguna protección para su conservación.

A pesar de no poseer un inventario total de la biodiversidad del país, se hace prioritario plantear estrategias de conservación; se considera que la más adecuada para muchas de estas especies silvestres debería ser la conservación *in situ* de áreas donde se encuentran los árboles hospederos, insectos y hongos micorrízicos, junto con propuestas de propagación masiva.

2.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA

2.2.1. Características taxonómicas

Joseeph Pitton de Tournefort (1665-1708), botánico francés, fue el primero en distinguir las orquídeas y separarlas como familia en su libro *Elemenns de Botanique* (1694); clasificó unas pocas orquídeas en el género *Orchis*. Posteriormente Carlos Linnaeus (1707-1778) en el seminario de *Species Plantarum* introduce el sistema binomial (Género y especie) donde describe ocho géneros (*Cypripedium, Epidendrum, Herminium, Neottia, Ophrys, Orchis, Satyrium, Serapias*), válidos actualmente como géneros y 62 especies principalmente de origen europeo (Schiff, 2018). Actualmente, quien dispone el nombre de las orquídeas es The International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) y el International Code of Nomenclature of Cultivated Plants (ICNCP) (Orchids, 2002).

Cada especie de orquídeas involucra un grupo de plantas con apariencia similar, tiene en cuenta caracteristicas tales como flor, hojas, pseudobulbo, morfología, tipo de crecimiento, hábitat, estructura del aparato sexual y hasta la capacidad de hibridarse. El género agrupa varias especies con características similares.

El criterio que usualmente se tiene para dar el nombre a las especies, corresponde en ocasiones al tipo de crecimiento, nombre del descubridor, apriencia de la flor o de la planta, tales como frimbriata, elegans (bordeado), frangans, floribunda, grandiflora, viridis (green) o por localización tales como tahitensis o sinense (Schiff, 2018).

Las clasificaciones taxonómicas modernas contemplan varios factores como la morfología floral, características vegetativas, anatomía, factores ecológicos y ambientales, sistemas de polinización, relaciones fúngicas, cromosomas y constituyentes químicos de los órganos vegetales. Los estudios moleculares han aportado de manera significativa en los modelos evolutivos y han ocasionado replanteamiento en las relaciones entre los

grupos y géneros de las orquídeas, lo cual ocasiona cambios frecuentes en los nombres que reciben algunos géneros (Banks, 2005; Schiff, 2018).

Las categorías taxonómicas correspondientes a las orquídeas son:

Subreino: Embriofitas (desarrollan embrión); *Phylum:* Traqueofitas (poseen tejidos conductores y vasculares); *Subphylum*: Pterosidos (Plantas con sistemas complejos, de conducción hojas grandes conspicuas); *Clase:* Angiospermas (Plantas con flores); *Subclase*: Monocotiledóneas (Embriones con un solo cotiledón); *Orden:* Microespermas (Flores cíclicas, con cáliz y corola de forma, magnitud y consistencia semejante o distinta, número de estambres dobles al número de sépalos o pétalos o con mayor frecuencia con estambres (androceo) reducidos en mayor o menor grado. Ovario ínfero, trímero, como en los demás verticilos, trilocular o unilocular, con un número indefinido de rudimentos seminales. Semillas muy pequeñas, a menudo sin tejido nutricio; *Suborden*: Ginandras (plantas Microespermas de flores con simetría bilateral y semillas minúsculas sin tejido nutricio, suborden que solo comprende a la familia de las orquídeas); Familia: Orquidácea (Ramírez, 2010).

En 1981 Dessler mencionó que la familia *Orchidaceae* estaba dividida en 6 subfamilias y 21 tribus donde se ubicaban 724 géneros y cerca de 20.000 a 25.000 especies; en 1990 se redujo a 5 subfamilias y 25 tribus producto de la mejora en los sistemas de clasificación (*Apostasipidae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Ochidoideae* y *Epidendroideae*) (Ángel et al., 2001). Estudios más recientes incluyen 750 géneros y 25.000 especies organizadas en 5 subfamilias (*Vanilloideae*, *Cypridedioideae*, *Apostasioideae*, *Epidendroeae* y *Orchidoideae*) y además distribuidas en 19 tribus y 43 subtribus. Es importante resaltar que el International Code of Nomenclature of Cultivated Plants (ICNCP) es la entidad que estandarizó la clasificación de las plantas e impuso las siguientes terminaciones: Familia: *aceae*; Tribu: *eae*; Subtribu: *inae* (Cameron, 2010).

Es bien conocido a lo largo del tiempo que cientos de géneros han sido creados y algunos ubicados dentro de otros géneros generando un rango de históricos sinónimos, debido a que para los botánicos es de gran complejidad tratar de entender más de 28.000 especies de orquídeas. Los estudios modernos de ADN están ayudando a clasificar con mayor precisión en el taxón respectivo. Por ello el número de géneros es variado, dependiendo de la fuente consultada y sujeta a variciones permanentes, lo cual crea controversia entre las dsitintas filosofías taxonómicas actuales. Las bases de datos que reorganizan permanentemente los géneros y especies son el Botanic Graden website, The plant list, Tropicos (Missouri Botanical Gardens y BlueNanta) (Schiff, 2018).

2.2.2. Descripción botánica

2.2.2.1. Morfología floral

Las estructuras florales de las orquídeas son muy diferentes a las flores convencionales, son por lo general bisexuales o hermafroditas, con excepción de los géneros *Catasetum, Cycnoches y Mormodes* que poseen flores unisexuales, masculinas o femeninas cada una con morfologías diferentes entre sí (Kuan & González, 1993); son zigomórficas, es decir, presentan simetría bilateral.

Se pueden identificar las siguientes partes:

a. **Perianto o verticilo externo.** Formado por piezas aproximadamente iguales entre sí de aspecto petaloide llamados tépalos que se disponen en dos verticilos externo e interno con tres piezas llamados sépalos y pétalos. El pétalo ubicado en posición opuesta al sépalo dorsal se transforma en el labelo, por lo general de mayor tamaño; es la plataforma donde se posan los polinizadores (Bottom, 2017).

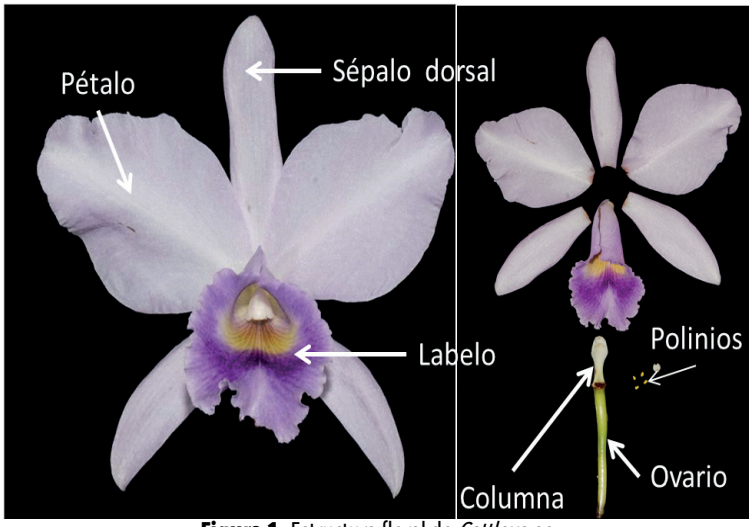

Figura 1. Estructura floral de *Cattleya sp*
Fuente: Cáceres (2017)

b. El Androceo. Poseen solo un estambre; los granos de polen son diferentes en las orquídeas, puesto que aparecen como tétradas o bien están agregados en masas mayores llamadas polinios, que albergan miles de granos de polen unidos entre sí por una sustancia llamada elastovicina. El número de polinios puede ser de cuatro o reducirse a dos (Figura. 2).

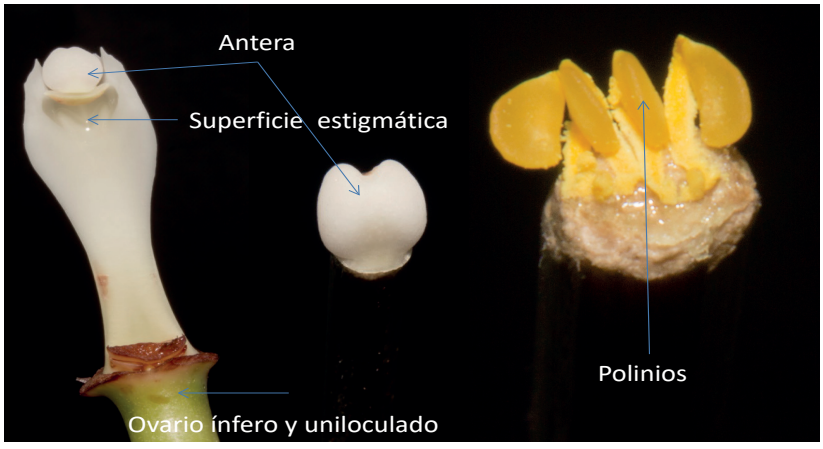

Figura 2. Detalle del Androceo y Gineceo fusionados en la columna polinios que alberga granos de polen
Fuente: Cáceres (2017)

c. **El Gineceo.** Corresponde al conjunto de los órganos femeninos de la flor formado por tres divisiones vacías, llamadas carpelos que se han soldado hasta constituir un solo ovario, aunque la interpretación de las cavidades es muy variada (Figura. 2) (Sampaio-Mayer, Carmello-Guerreiro, & Appezzato-da-Glória, 2011).

d. **El Ginostemio o columna**. La columna es una estructura compleja y evolucionada, que se presenta solo en las orquídeas, caracterizada por la fusión del estilo y tres estigmas con los filamentos de los estambres. En la parte superior de la columna se ubica la antera, de forma oblonga y está provista de cuatro sacos polínicos. El polinario hace referencia al conjunto de anteras y las estructuras asociadas que se transportan durante la polinización. En la parte inferior de la columna se encuentra el estigma, donde se produce un líquido azucarado y viscoso para que el polen quede adherido durante la polinización. La parte masculina y la femenina están separadas por una delgada capa llamada rostelumm (Ramírez, 2010). Las orquídeas han desarollado muchas estrategias florales para la polinización entre las cuales se considera que el rostellum ha evolocionado para inhibir la autopolinización (Schiff, 2018).

Generalmente se agrupan en espigas o racimos formando inflorescencias donde se distribuyen pocas o muchas flores de manera densa o laxa, que en conjunto adoptan formas cónicas, cilíndricas u ovoides. Las partes de la inflorescencia incluyen el pedúnculo, el pedicelo y la flor misma. Nacen en la axila de una bráctea foliácea, pueden ser terminales, laterales o axilares unidas por un pedúnculo largo o abreviado; algunas especies presentan una sola flor.

2.2.2.2. Morfología de las raíces

Las raíces de las orquídeas sirven de anclaje y absorción de nutrientes, su morfología varía dependiendo del tipo o hábito de crecimiento, sea epífito, semiepífito, litófito, saprófito, terrestre o subterráneo. En orquídeas terrestres las raíces suelen ser más alargadas y tienden a ramificarse.

Figura 3. Raíz de *Cattleya* y *Catasetum* con velamen que facilita captación de agua y nutrientes
Fuente: Cáceres (2017)

Las raíces se asocian de manera simbiótica con hongos micorrízicos frecuentemente del género *Rizocthonia* hasta formar nódulos; algunas tienen un rizoma corto o se transforma en tubérculo radical, órgano de reserva de sustancias constituyentes y energéticas para usar en periodos vegetativos.

En orquídeas epífitas y litotróficas las raíces son por lo general gruesas, carnosas y presentan una capa de células muertas esponjosas llamada velamen, con frecuencia de color blanco grisáceo, absorbe agua, minerales y nutrientes para la planta y protege el córtex radicular de la desecación (Figura. 3). Su morfología facilita el ascenso de las raíces por los troncos de los árboles donde tienden a ubicarse en su medio natural y captar mejor la luz. Crecen en todas las direcciones, pueden originarse en cualquier punto del tallo. Los colores verdes en el extremo radicular evidencian la presencia de clorofila. Investigaciones actuales revelan la presencia de cianobacterias en el velamen, las cuales están involucradas en la fijación del nitrógeno y suministro de nutrientes a las plantas (Schiff, 2018).

2.2.2.3. Morfología del tallo

El tallo de las orquídeas es de formas variadas: puede presentar ranuras y ser delgado, en especies terrestres los tallos subterráneos se comprimen y abultan a manera de tubérculos. En especies de hábitos epífitos los tallos han evolucionado y se han convertido en pseudobulbos, es una porción vertical

del tallo. Son de vital importancia para soportar los periodos secos y de lluvia, almacena agua, minerales, carbohidratos y otros nutrientes necesarios para el desarrollo vegetativo de la planta y la reproducción. Estudios han demostrado que durante periodos de sequía, el contenido de agua y clorofila es traslocado a las hojas para favorecer la supervivencia de la planta. Además es fundamental para la iniciación de las inflorescencias, al ser un mediador bioquímico del proceso, ya que estas pueden originarse en la base o extremo del pseudobulbo. Del extremo apical o de su parte media se forman una o más hojas (Schiff, 2018).

Su apariencia es una característica distintiva en muchas orquídeas; pueden estar formados por un solo entrenudo como en el género *Oncidium* o por varios entrenudos como en el género *Dendrobium;* ser pequeños o enormes, de formas muy variadas: esféricos, ovalados, globosos, comprimidos, lisos o acostillados. En *Bulbophyllum vaginatum* son esféricos, terminan con una hoja y en *Catasetum lucis,* alargados con varios entrenudos (Figura. 4). Los *catasetum* tienen un periodo seco de dormancia y sus hojas caen. Cuando llega la lluvia retoman sus hojas gracias a los nutrientes almacenados en el pseudobulbo.

El tallo ha sido determinante para dividir las orquídeas en dos grupos dependiendo del tipo de crecimiento, en relación con la longitud y dirección del tallo:

Figura 4. Ubicación del Pseudobulbo en plantas epífitas de *Bulbophyllum vaginatum* y *Catasetum lucis*
Fuente: Cáceres (2017)

Orquídeas Monopódicas, tienen un tallo central único con crecimiento continuo, a veces se ramifica, las hojas se disponen de manera alternada y presentan inflorescencias en las axilas (Kuan & González, 1993). En el tallo pueden formarse raíces en todas las partes, en cada nudo o en la base de la hoja; pueden surgir en ocasiones brotes secundarios y tallos laterales después del tallo principal como se aprecia en los géneros *Vanda y Aerides*. En el caso del género *Phalaenopsis* el tallo es muy rudimentario o casi acaudado.

Orquídeas Simpódicas, caracterizadas por tener retoños individuales de crecimiento finito, de los tallos basales o rizomas brotan retoños que van a desarrollar tallos y hojas que al madurar producen flores. Algunos tallos se convierten en pseudobulbos, los que al crecer desarrollan nuevos brotes en la base de la planta. Cada pseudobulbo produce vegetación anual, pero suele interrumpirse tras un periodo fijo de actividad. Los brotes están unidos entre sí por un rizoma, similar a un tallo rastrero que se extiende sobre la superficie de su soporte o del sustrato (Banks, 2005; Lecoufle, 2008).

2.2.2.4. Morfología de las hojas

Las hojas de las orquídeas encargadas de realizar el proceso de fotosíntesis varían en consistencia, forma y coloridos. Se caracterizan por ser simples, presentar márgenes enteros. Las nervaduras se disponen a lo largo de la hoja como en toda planta monocotiledónea, pueden ser angostas y delgadas, como agujas casi cilíndricas para evitar el sobrecalentamiento y la deshidratación.

En especies terrestres predominan las hojas membranosas y en plantas epífitas suelen ser gruesas, de cutícula espesa y encerada. Regularmente presentan una vaina envolvente y en la mayoría de los casos son sésiles. Dependiendo del lugar donde habitan las orquídeas las hojas adoptan modificaciones especiales que les permite almacenar agua o evitar su

pérdida. En algunas especies las hojas se caen generalmente al empezar el verano o bien antes de empezar la floración (Banks, 2005).

2.2.2.5. Morfología de cápsulas y semillas

Una vez ocurrida la polinización, los granos de polen germinan y los tubos polínicos van al ovario hasta desarrollar el fruto conocido como cápsula (Figura. 5). Las cápsulas por lo general son de forma ovoide e internamente son triloculares; presentan seis valvas soldadas en forma longitudinal, las cuales se separan cuando alcanzan la madurez por dehiscencia para liberar las semillas microscópicas. Se ha reportado que el fruto alberga desde miles hasta millones de semillas dependiendo del género, sujetadas por membranas que las recubren (placentas parietales). Algunos autores señalan que pueden haber cerca de 1.300 a 4.000 aproximadamente; en *Cypripedium acaule* se calcula que pueden haber unas 50.000 semillas; en el género *Catleya* spp se reportan cerca de 250.000 a un millón y en *Cycnoches ventricosum var. Chlorochilon* se contaron alrededor de 3.700.000 semillas (Lecoufle, 2008).

Figura 5. Cápsula de *Cattleya mendelii* y *Cycnoches chlorochilon* en estado de madurez
Fuente: Cáceres (2017)

Las semillas de las orquídeas son pequeñas, se estima que están en rangos desde 1,0 -2,0 mm de largo y 0,5-1,0 mm de ancho; constan de una testa o cubierta seca y dura formada por un tejido muerto donde se alberga el embrión. La cubierta o testa de las semillas está constituida de pocas capas

y se deriva del integumento del óvulo. Se ha demostrado que en *Calypso bulbosa* juega un papel importante en el desarrollo del embrión después de la fertilización, esto se evidenció por la fuerte reacción con la tinción de proteínas; similares resultados se apreciaron en *Epidendrum ibaguense*. Cuando madura el embrión las células se deshidratan y se vuelven delgadas, no almacenan sustancias nutritivas (Wehner, Zierau, & Arditti, 2002).

En 1935 Hull describe al embrión:

> Es un pequeño cuerpo globular esencialmente idéntico en todas sus partes, de células similares, no se presenta ninguna competencia por el alimento almacenado en la semilla de la orquídea, ya sea en el embrión mismo o a su alrededor; no hay nada más sino paredes reticuladas de la capa exterior de la semilla. (Wehner *et al.,* 2002)

Los embriones son diminutos y usualmente elípticos u ovoides, ocupan una porción muy pequeña del espacio interior de la testa dejando una gran cantidad de espacio libre. Las células del embrión presentan una estructura simple, son isodiamétricas y escasamente diferenciadas; las cantidades de lípidos y proteínas presentes son escasas, lo cual hace difícil su germinación. (Arditti, 1967, citado por Pierik, 1990). El número de células es variable; en *Epipogyum aphyllum* cuenta con solamente ocho, o el otro extremo en *Bletilla striata* con 734; en *Dactylorhiza majalis,* 200; *Doritis pulcherrima,* 100-120. Técnicas de autoflorescencia y tinciones para detectar lípidos indican que la capa externa del embrión sí presenta cierto grado de diferenciación, con características similares a células epidérmicas. En algunas orquídeas las células del extremo micropilar del embrión son más grandes que las células del polo opuesto o pueden no tener ningún grado de polarización estructural y ser simplemente una masa ovoide de células sin ninguna diferenciación entre sí. El patrón del desarrollo embrionario es muy diferente al de la mayoría de plantas con flores; los cigotos de las orquídeas se dividen no equitativamente para dar paso a una célula terminal pequeña y a una célula basal grande hasta formar al embrión verdadero, y al suspensor direc-

tamente o después de divisiones adicionales. La diferenciación estructural ocurre cuando se aprecian brotes foliares y polos radiculares (Wehner et al., 2002).

El endospermo es un tejido nutricio encontrado en las semillas de la mayoría de las plantas con flores, pero no se presenta en la mayoría de las especies de orquídeas (Pierik, 1990); parece deberse a que la doble fertilización es incompleta y el núcleo que podría participar en la formación del endospermo se degenera rápidamente.

El cotiledón se define como el primer órgano foliar de las plantas con semillas. Surge del polo apical del embrión antes o después de la formación del meristemo. En las semillas de orquídeas no hay cotiledón, sin embargo, la germinación empieza con la formación de protocormos, estructura proveedora de nutrientes necesarios para el desarrollo de brotes apicales y actividad fotosintética; no es posible ser comparado con el cotiledón. En algunas especies como *Bletilla striata* se ha demostrado que la presencia de un cotiledón implica que desde el punto de vista biológico carece de importancia fisiológica, pero a nivel taxonómico adquiere gran significancia (Batygina & Andronova, 1998, citados por Wenner *et al.,* 2002).

En la Figura 6 se aprecia la morfología microscópica de semillas estudiadas de *Cattleya mendelli*, con embrión central y células suspensorias.

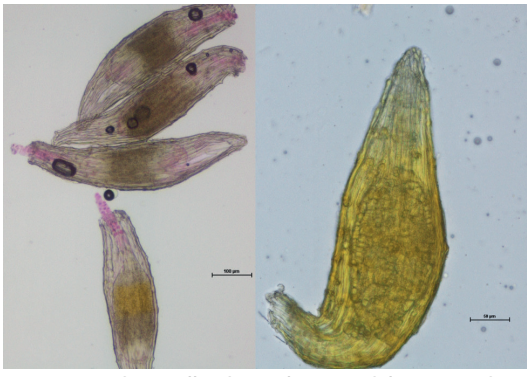

Figura 6. Estructura de Semillas de *Cattleya mendelii* aumentada 100 veces en microscopio óptico Nikon eclipse NI (Valor escala 100µm)
Fuente: Grupo Microbiota

2.3. BIOLOGÍA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

En condiciones naturales las semillas deben encontrar soportes adecuados como cortezas de árboles que puedan suministrarle nutrientes y diferentes sustancias orgánicas para garantizar de manera exitosa que se reanude el crecimiento embrionario. El porcentaje de germinación de las semillas en el ambiente natural es muy bajo en comparación con el número de semillas producido en cada cápsula (Abdelnour & Muñoz, 1997). Para que ocurra este proceso las semillas deben establecer una asociación micorrízica con hongos basidiomicetes del grupo *Rizocthonia sensu latu*, un grupo artificial que incluye hongos cuyas etapas sexuales pertenecen a los géneros *Thanatephorus, Ceratobasidium, Sebacina* y *Tulasnella* (Wing-Yam & Arditti, 2009).

El proceso germinativo de las semillas de orquídeas (Figura 7) es muy particular; no se aprecia la formación directa de radícula, tallos ni hojas como en otras angiospermas. Este proceso fue descrito por Pierik en 1990 al retomar las etapas indentificadas previamente por Arditti en 1967, Harley en 1969 así como tambien por Pierik, *et al*., en 1983 donde consideraron eventos de inbibición o absorción de agua a través del embrión que hace aumentar el volumen de la semilla, incremento de la división celular, rompimiento de la testa o cubierta seminal, y finalmente, formación de una estructura de tipo protocormo; su papel es servir de soporte nutritivo, en él se puede distinguir un meristemo del vástago (Pierik, 1990).

Con la diferenciación del meristemo apical y la formación de rizoides se genera un crecimiento acelerado y en presencia de luz adquiere coloración verde que hace visibles los primordios foliares donde se evidencia la actividad fotosintética en esta etapa del proceso germinativo. El protocormo y los rizoides desaparecen cuando ya cumplen su función nutritiva.

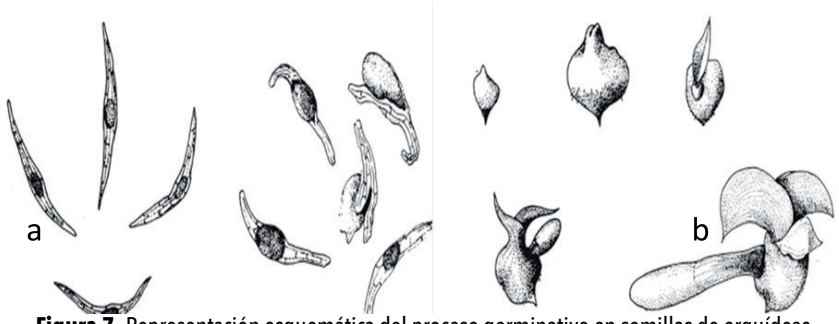

Figura 7. Representación esquemática del proceso germinativo en semillas de orquídeas a. Semillas de *Paphiopedilum ciliolare* en reposo. Embrión no diferenciado sin cotiledones ni embrión visible. b. Desarrollo de protocormo para originar una planta. Arriba: desarrollo del meristemo caulinar para originar un vástago. Abajo: formación de la primera raíz. Esquemas a los 14-21 semanas después de la siembra *in vitro*.
Fuente: Pierik ,1990).

También el proceso germinativo en orquídeas según lo expresó Zettler y McInnis (1993) se inicia con formas esféricas a partir de las cuales se desarrollan los ápices foliares y posteriormente las raíces, hasta alcanzar el estadio de plántula como se aprecia en la Figura 7b.

Se ha descrito que el proceso germinativo es mucho más rápido en orquídeas epífitas que en aquellas con hábitos terrestres. Con estudios recientes se ha corroborado que las etapas del proceso germinativo en diferentes especies de orquídeas coinciden con las etapas expuestas por Pierik (1990) como en *Laelia autumnalis* (Ávila-Díaz & Salgado-Garciglia, 2006), en *Catleya aurantiaca, Encyclia chacaoensis y Brassavola nodosa* (Damon, Aguilar-Guerrero, Rivera & Nikolaeva, 2004), en *Oncidium stramineum* LIndl (Flores-Escobar, Legaria-Solano, Gil-Vásquez & Colinas-León, 2008) y en *Laelia speciosa* (Aguilar-Morale & López-Escamilla, 2013).

El ciclo de vida sexual de las orquídeas en forma esquemática se aprecia en la Figura 8. Comprende varias etapas: Germinación de semillas, desarrollo de protocormos, diferenciación de plantas, etapa reproductiva o floración, polinización, fecundación y dispersión de semillas.

El tiempo que requieren las orquídeas para desarrollarse desde la fase de protocormos hasta el estado reproductivo es con frecuencia dilatado; puede demorar. En la mayoría de especies, la floración raramente tiene lugar dos años seguidos, más bien ocurre en años alternos. Las especies de *Orchis* y *Ophris* del macizo de Grazalema suelen florecer a los 3-4 años después de haber germinado (Havrylchyk & Poncet, 2007).

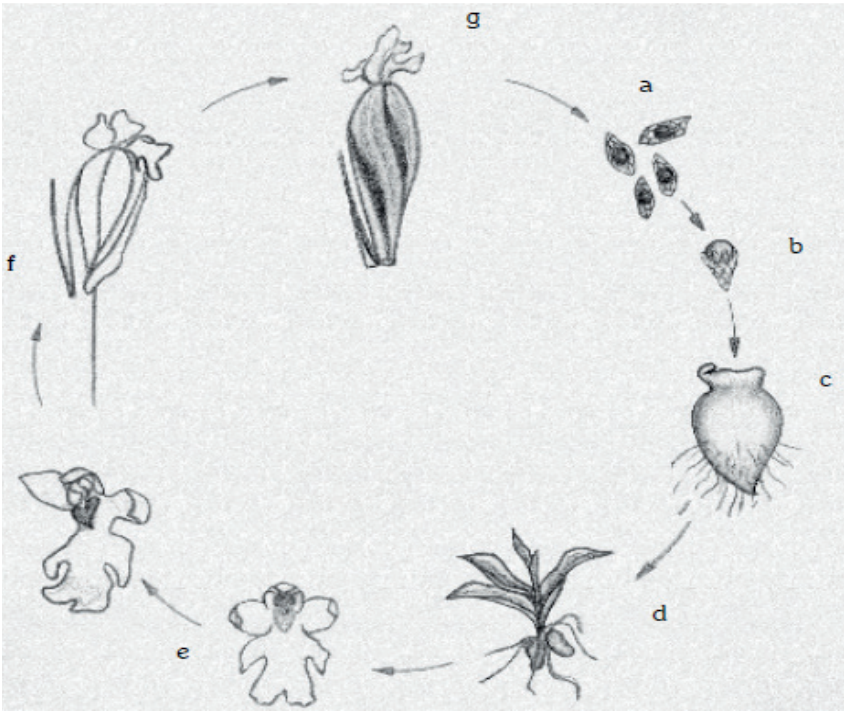

Figura 8. Representación esquemática del ciclo de vida de una orquídea desarrollada a partir de una semilla
a. Semillas b. Semillas germinadas c. Protocormo d. Planta e. Polinización f. Ovario maduro g. Cápsula liberando semillas.
Fuente: Havrylchyk & Poncet (2007)

3. Descripción botánica de las especies cultivadas *in vitro*

Botanical description of the cultivated species in vitro

3.1. CATTLEYA

El nombre *etimológico* está dedicado a W. Cattley, horticultor inglés, género originario de las alturas medias de América; Central y Sur América, a nivel mundial se encuentran cerca de 65 especies diferentes (Kuan & Gonzále, 1993) y miles de híbridos. El género *Cattleya* presenta dos grupos (unifoliadas y bifoliadas), unifoliadas que incluye especies exclusivas de Colombia como son *Cattleya aurea, C. mendelii, C. trianae, C. quadricolor, C. schoderae y C. warszewiczii;* dentro de las bifoliadas se puede citar a *C. violacea* encontradas en Venezuela, Guyana, Perú y Brasil (Ángel et al., 2001).

Son plantas epífitas o rupícolas, de crecimiento simpodial, con pseudobulbos cilíndricos o alargados, cubiertos por una vaina final, donde rematan una o dos hojas coriáceas de color verde mate. En el punto de unión del pseudobulbo y la hoja nace la espata, de donde sale inflorescencia terminal. Presenta racimo de pocas flores grandes, vistosas, a menudo perfumadas. Los pétalos suelen ser más anchos que los sépalos, el labelo está libre de la columna, pero con su base la envuelve, presenta colores vistosos. Columna recta, sin pie. Cuatro polinios aplanados lateralmente, con caudicolas.

Desde el siglo XIX se menciona la facilidad de su cultivo, en un tiempo el género *Cattleya* representaba la orquídea por excelencia. Con este género se han realizado varios híbridos desde 1850 entre especies del mismo género y con especies de otros géneros como *Laelia, Brassavola, Epidendrum y Soprhonitis* (Ortiz, 1995) que ha permitido mejorar texturas, colores, número de flores y perfumes que confieren a este género un extraordinario valor ornamental y económico (Lecoufle, 2008).

3.1.1. Cattleya mendelii

Es una especie nativa de Colombia originaria de los departamentos de Santander, Boyacá y Norte de Santander; se encuentra distribuida en la cordillera oriental, Chicamocha, Suárez y Lebrija en climas templados con altitudes entre los 1.200 y 1.800 m. Crece en la copa de los árboles de gran

altura y en afloramientos rocosos como planta epífita en bosques secos, en transición a húmedos y nublados.

Las plantas de esta especie presentan crecimiento vigoroso, compacto y uniforme. Poseen flores grandes y vistosas (Figura 9). El periodo de floración se encuentra entre marzo y mayo. Arroyave (2010) señala que los mejores especímenes Tipo se han encontrado en las regiones cercanas a Málaga. Las variedades coerulea provienen de Oiba, Turbay y Suratá. Las plantas con Splash se han encontrado en los alrededores de la población de Sotará. Todas estas poblaciones se encuentran ubicadas en el departamento de Santander donde se presentan periodos secos y cálidos que inducen la floración.

Desde los inicios, *C. mendelii* sirvió de base para la formacion de numerosos hìbridos por el color de la flor y su tamaño, y en palabras de Arroyave: acepta muy bien las características de color de diversos padres y no los afecta indebidamente".

Actualmente esta especie experimenta un elevado riesgo de extinción y fuerte deterioro de la población silvestre; está considerada en peligro *(EN)*. Para el año 2007 no existía ninguna medida de conservación oficial ni privada, por tanto las especies de este género merecen ser conservadas, pues se están extinguiendo en estado natural (Ortiz, 1995; Calderón-Sáenz, 2006).

En estos momentos la Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga (CDMB), por medio del Jardín Botánico Eloy Valenzuela, adelanta estrategias de conservación de esta especie (Gálvan-Carvajal & Rojas, 2010). Arroyave tambien reporta que en La Mesa de los Santos –por iniciativa privada– se han realizado estudios de propagación *in vitro* a partir de semillas para esta especie y se ha logrado obtener un elevado número de especímenes para reintroducirse en el ambiente natural y la produccióon sostenible.

Figura 9. Estructura floral de *Cattleya mendelii.* Henry H. Dombrain - 1872
Fuente: Cáceres y Contreras (2016)

3.2. CATASETUM

El nombre proviene del griego *kata* (abajo) y del latín *seta* (pelo, cerda), por los dos apéndices de la base de la columna de la flor masculina (Banks, 2005). El género *Catasetum* está dentro de la subtribu *Catasetinae*, con distribución neotropical y con preferencia por clima cálido y bosques secos (Bonilla-Morals *et al*., 2014).

De hábito epífito, litófitas o semiterrestres. Generalmente presentan pseudobulbos fusiformes compuestos de varios entrenudos, hojas plicadas caducas, inflorescencia basal; pueden ser erectas o péndulas como se aprecia en la Figura. 11. Este género presenta flores unisexuales con dimorfismo sexual y en ocasiones flores intermedias no funcionales (Romero-González, 2012, citado por Bonilla-Morales et al., 2016). Las flores masculinas son resupinadas o no, tienen en la columna un par de anteras que saltan los polinios hacia adelante, el labelo tiene formas variadas. Las flores femeninas no son resupinadas, tienen el labelo profundamente cóncavo, como un yelmo (Figura 10) (Bonilla-Morales *et al*., 2014; Ortiz, 1995).

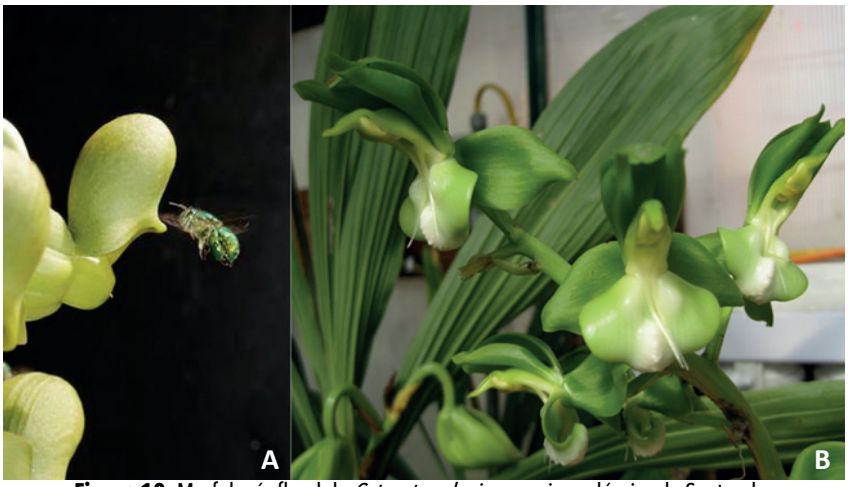

Figura 10. Morfología floral de *Catasetum lucis*, especie endémica de Santander
a. Flor femenina con su polinizador abeja euglosinia. b. Flor masculina
Fuente: Cáceres (2017)

Las flores masculinas se usan para establecer las diferencias interespecíficas, ya que las flores femeninas generalmente presentan el mismo patrón de organización en la mayoría de las especies o sea una columna corta y ancha porque se atrofia la parte masculina (polinios) y se desarrolla más la parte femenina (estigma y ovario). Existen alrededor de 140 especies de *Catasetum* reportadas para el neotrópico. Un estudio realizado por Ortiz (2010) registró 30 especies para Colombia, pero recientemente se reportan 38 especies (Bonilla, et al., 2013).

3.2.1. Catasetum lucis

Recientemente se considera una especie endémica de Santander Se caracteriza principalmente por su labelo en forma de falda y su callo central fue determinado de una especie cultivada (1994); actualmente se ha ampliado el rango altitudinal donde se puede localizar esta especie (Bonilla, et al., 2016)

Son especies de enorme valor económico, actualmente son utilizadas por coleccionistas como punto de partida para generar híbridos únicos y de gran

atractivo. También presentan un enorme interés ecológico y biológico por la interacción con polinizadores específicos, los cuales se encuentran en una estrecha relación ecológica. Por las anteriores razones **C. lucis merece ser protegida y conservada.**

Figura 11. Morfología de la planta de *Catasetum lucis*
Fuente: Cáceres (2016)

3.3. ONCIDIUM

El género *Oncidium* es originario de América tropical; se distribuye desde Argentina hasta la Florida. Con cerca de 330 especies, es uno de los géneros más importantes entre las orquídeas. En Colombia se registran cerca de 200 especies. Son especies de crecimiento epífito, rupícola o terrestre; presentan crecimiento simpódico. Presentan flores en su mayoría pardas y amarillas dispuestas en grandes inflorescencias ramificadas. El nombre proviene del griego *onkidion*, que significa abultamiento pequeño o extraños tuberculitos en la base del labelo. Los pétalos y el sépalo dorsal son más grandes que los sépalos laterales; el labelo siempre va lobulado (Figura 12). Las flores se mantienen unos dos meses, florecen una sola vez al año, sin embargo muchos híbridos presentan floración hasta tres veces. Forman en su mayoría pseudobulbos alargados, carnosos y hojas alargadas o delgadas (Ortiz, 1995).

Figura 12. Morfología floral de *Oncidium hastilabium*
Foto: Contrenas (2016)

3.3.1. Oncidium hastilabium. J. G. Beer, ex Lindley

Es una especie que se encuentra desde Venezuela hasta el Perú, crece entre 750 a 2.200 m. El nombre de *Hastilabium* significa labelo en forma de lanza. En el departamento de Santander se han hallado cerca de diez especies de este género *(Oncidium*) distribuidas en todas las provincias (López, 2011); tienen enorme importancia ornamental.

3.4. MORMODES

Este género cuenta con 67 especies, se extienden desde México hasta Bolivia y Brasil. En Colombia se registran 18 géneros. Son epífitas, se encuentran en la parte baja de los bosques tropicales. Presentan pseudobulbos fusiformes, con entrenudos y carnosos. Hojas caducas. Flores grandes y vistosas, con pétalos y sépalos similares. El labelo surge de la base de la columna y se curva hacia atrás formando un túnel como se puede ver en la Figura 13.

La columna erguida se tuerce hacia el lado; su nombre se da precisamente por la apariencia fantasmal de sus flores (del griego *mormo*=monstruo) que además tiene un mecanismo de propulsión para adherir sus polinias al polinizador. En Santander se encuentran en la provincia de Vélez.

3.4.1. Mormodes buccinator

Forma parte de la subfamilia *Epidendroideae*; Tribu: *Cymbidieae*; Subtribu: *Catasetinae*.

Crece en clima cálido a fresco. Es de hábito epífito; presenta pseudobulbo oblongo elipsoide, ligeramente comprimido envuelto por varias vainas basales imbricadas, hojas oblongas a lanceoladas, caducas acuminadas. Florecen en el pseudobulbo maduro después de la caída de las hojas basales. Presenta inflorescencia lateral de aproximadamente 37,5 cm de largo, con 7 a 12 flores, muy fragantes con olor a especies.

Es una especie silvestre con un amplio potencial ornamental y de enorme demanda para la producción a escala comercial (Campbell, 2014).

Figura 13. Morfología floral de *Mormodes buccinator*
Fuente: Cáceres (2015)

3.5. CYCNOCHES

El género *Cycnoches* se encuentra en montañas húmedas a una altura de hasta 850 metros. Consta de 25 especies distribuidas en la mayor parte de la América tropical. Crece bien en clima cálido. El nombre de este género proviene del griego *kyknos* (cisne) y *auchen* (cuello, forma de cisne). Las flores son unisexuadas o imperfectas masculinas y femeninas separadamente, ocasionalmente producen flores hermafroditas. Poseen una columna alargada y delgada, especialmente en las flores masculinas. Forma inflorescencia que nace en la axila de la hoja, hay racimos de flores por lo general de gran fragancia. Son plantas epífitas y poseen pseudobulbos fusiformes largos y delgados, hojas grandes y plicadas, de naturaleza caduca.

Este género en su conjunto tiene pseudobulbos largos y delgados y con hojas caducas, lo cual da origen a sus nombres; cuenta con un sistema de propulsión para adherir sus polinios al polinizador. En los últimos años este género ha sido perseguido para ser comercializado entre coleccionistas, aficionados y viveros comerciales. En Colombia hay registradas nueve especies una de ellas es *Cycnoches chlorochilon* (Ortiz, 1995).

3.5.1. Cycnoches chlorochilon. J.F. Klotzsch

Es una especie que se encuentra en la zona rural del municipio de Landázuri y en el Magdalena Medio santanderano.

Figura 14. Morfología floral de *Cycnoches chlorochilon*
Izquierda flor masculina y derecha flor femenina
Fuente: Cáceres y Contreras (2017)

Chlorochilum, significa labelo verde. La flor es hermosa y muy fragante (Figura 14) (López, 2011). Categorizada como especie de preocupación menor según la UICN (Calderón-Sáenz, 2006).

3.6. EPIDENDRUM

Su nombre proviene del griego *ept* (sobre) y *dendrón* (árbol), dado el hábito de crecimiento de la mayoría de las especies de este género.

El género *Epidendrum* cuenta con más de 1.000 especies conocidas a través de América tropical y el Caribe. En Colombia se registraron cerca de 298 especies y en Santander por lo menos 36 en casi todas las provincias, abarcando la mayoría de los climas. Dentro de esa diversidad presenta especies terrestres, rupícolas y epífitas. Adaptadas a diversas condiciones climáticas y ambientales (cálido, seco, páramos, etc.). Presentan en su mayoría pseudobulbos, algunas con tallos alargados. Hay predominio de inflorescencia terminal con racimos de varias flores de diversos tamaños y colores. Las flores se caracterizan por presentar el labelo soldado en su base a la columna.

3.6.1. Epidendrum ibaguense. A. von Humboldt, A. Bonpland y C. S. Kunth – 1816

Crece en la región de Santander, sin embargo está distribuida desde México hasta Argentina; se encuentra desde los 0 hasta los 2.500 msnm. Es coleccionada por ser planta ornamental. Es terrestre, de tallo ramificado, con inflorescencia terminal, flores rojas con labelo amarillo con rojo (Figura 15). En jurisdicción de la CDMB ha sido registrada para los municipios de Charta, Matanza, Suratá y Piedecuesta (Galván-Carvajal & Rojas, 2010).

Figura 15. Morfología floral de *Epidendrum ibaguense*
Fuente: Contreras (2017)

3.7. PERISTERIA

Género conformado por 11 especies entre epífitas y terrestres con distribución en Centro y Sur América de climas cálidos. El significado de su nombre quiere decir en forma de paloma, viene del griego *peristerión* (palomita), hace referencia a la forma de sus flores. Florecen en racimo vertical de muchas flores, grandes, vistosas y fragantes. Conformado por 12 especies, en Colombia se han registrado todas.

De tamaño mediano o grande, con crecimiento simpodial con pseudobulbos de gran tamaño terminados en una o varias hojas. Inflorescencia basal erecta o péndula, en racimo de flores medianas o grandes, carnosas,

globosas. Sépalos laterales soldados en la base. Labelo continuo con la columna, trilobulado, con lóbulos laterales erectos. Columna corta y gruesa, sin pie. Dos polinios sin estípite (Ortiz, 2015).

3.7.1. Peristeria elata. W. J. Hooker

Elata significa imponente; conocida popularmente como flor del espíritu santo. Es la flor nacional de Panamá. Son hierbas terrestres que crecen agregadas, hasta 1,5 metros de altura. Hojas simples, plicadas. Flores agrupadas en una inflorescencia simple, hasta de un metro de largo. Flores blancas, con uno de los pétalos modificado más grande y con puntos morados (Figura 16).

Figura 16. Morfología floral *Peristeria elata* en cultivo
Fuente: Cáceres (2016)

En Colombia se encuentra en los departamentos de Boyacá, Caldas, Tolima y Santander entre 900 y 2.100 m. En el área de Jurisdicción de la Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga (CDMB) se ha reportado para el municipio de Floridablanca, en las veredas La Judía y Ruitoque. Aparece en el apéndice global I CITIES (Gálvan-Carvajal, & Rojas, 2010).

3.8. PROSTECHEA KN & WESTC. 1838

Subfamilia: *Epidondroideae*, Tribu: *Epidendreae*, Subtribu: *Laeliinae*.

Plantas epífitas o rupícolas, medianas con pseudobulbos oblongos en una, dos o tres hojas coriáceas. Con inflorescencia terminal en racimo o panícula de flores medianas a grandes. Sépalos y pétalos semejantes entre sí. El labelo es soldado en la base a la columna y no se separa de esta, como se aprecia en la Figura 17. Posee cuatro polinios con caudicolas (Ortiz, 1995).

3.8.1. Prostechea fragans: Sinonimia: Encyclia fragrans. Anacheilium fragrans

Figura 17. Morfología floral de *Prostechea fragrans*
Fuente: Contreras (2017)

Su nombre se deriva de la fuerte fragancia de la flor a miel o vainilla. Esta especie ha sido una de las primeras en cultivarse artificialmente. Se encuentra en bosques tropicales de tierras bajas desde los 50 m hasta bosques montanos bajos bordeando los 2.000 m de altura. Esta se puede encontrar en diversos países como Jamaica, México, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Trinidad, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil.

3.9. TRICHOCENTRUM

Plantas epífitas medianas o pequeñas, con o sin pseudobulbos cilíndricos aplastados. Hojas, cilíndricas teretes, inflorescencia en racimo de muchas flores de color amarillo y manchas de color café.

3.9.1. Trichocentrum cebolleta

El nombre proviene por la forma de las hojas (orquídea de hojas de cebolla) (Figura 18). Ha estado incluida en el género Oncidium por la apariencia de las flores. De distribución amplia en América tropical.

Figura 18. Morfología floral y parte vegetativa de *Trichocentrum cebolleta*
Fuente: Contreras (2017)

4. Estrategia de conservación de orquídeas

Orchid conservation strategy

La CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna) se redactó como resolución de la UICN (Unión Mundial para la Naturaleza) en 1963, entró en vigor en 1973 y tiene como finalidad velar por el comercio internacional de especímenes de animales, plantas y microorganismos.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB, 1992), marco general para adelantar acciones de conservación en el mundo, adoptó en Resolución Cof. 8.19 cómo referenciar de manera estandarizada el nombre de *Orchidaceae*. Los géneros identificados como prioritarios (Recomendación 6 preparada por el Jardín Botánico Royal) y las especies incluidas en el Apéndice II de CITIES son: *Aerangis, Angraecum, Ascocentrum, Bletilla, Brassavola, Calanthe, Catasetum, Cattleya, Coelogyne, Comparettia, Cymbidium, Cypripedium, dendrobium, Disa, Dracula, Encyclia, Epidendrum, Laelia, Lycaste, Masdevallia, Miltonia, Miltoniopsis, Odontoglossum, Oncidium, Paphiopedilum, Parapahlaenopsis, Phalaenopsis, Phragmipedium, Renanthera, Rhynchostylis, Rossioglossum, Sophronitis, Vanda and Vandopsis.* Y en el Apéndice I los géneros y especies fueron: *Cattleya trianae, Dendrobium cruentum, Laelia jongheana, Laelia lobata, Paphiopedilum spp., Peristeria elata, Phragmipedium spp., Renanthera imschootiana & Vanda coeru* (Samper & García, 2001).

Ochoa, (1998) afirmó que los investigadores del Instituto Humboldt elaboraron una lista de especies amenazadas en Colombia y mencionaron que las familias con mayor número de especies en peligro son las orquídeas, seguidas de las plamas y las pasifloráceas. Dentro de las principales causas de extinción están la destrucción de los hábitat y la expansión de la frontera agrícola.

En el XVI Congreso Internacional de Botánica (1999) realizado en Estados Unidos se puso de manifiesto la preocupación por la pérdida de biodiversidad:

> Se expidió una declaración diciendo que por lo menos 2/3 partes de la diversidad vegetal va a estar en peligro de extinción en la

> naturaleza durante el curso del siglo XXI, amenazada por el crecimiento de la población humana, la deforestación, la pérdida de hábitats, el desarrollo destructivo, la sobreexplotación, el aumento de especies foráneas invasoras y la expansión de la agricultura. Este crudo panorama, se ha convertido en uno de los grandes desafíos para la comunidad global, donde se deben tomar medidas para la defensa de la flora, como un recurso vital para suplir las necesidades presentes y de las sociedades futuras.

Desde 1973 Echevarría expresó que para el caso de las orquídeas era necesario crear santuarios, Parques y Jardines Nacionales junto con la implementación de programas de propagación artificial para salvaguardar especies casi extintas (Calderón-Sáenz, 2006). Frente a este reto la implementación de estrategias de conservación *in situ* o *ex situ* debe priorizar el registro de la diversidad de zonas de crecimiento de las diversas especies de orquídeas con el fin de delimitar las áreas naturales. También los jardines botánicos durante muchos años han sido los mayores centros para el mantenimiento y estudio científico de la riqueza florística (IUCN, 1987), constituyen islas artificiales que resguardan una parte de la diversidad florística para la conservación de la variabilidad genética como lo refiere Villa-Lobos (1989). Los proyectos de investigación deberían estar encaminados a crear bancos de germoplasma (preservación de semillas, células, tejidos, órganos o plantas bajo cultivo *in vitro* o nitrógeno líquido) así como de conservación de plantas en vivero. Propiciar además el apoyo en estudios en los aspectos taxonómicos, poblacionales, interacciones ambientales, polinización, biología reproductiva, propagación *in vitro* y ex *situ* (Ortega-Larrocea, Martínez-Palacios, & Chávez-Ávila, 2007; Reed, Sarasan, Kane, Bunn & Pence, 2011).

El proyecto mundial de conservación de semillas de orquídeas amenazadas de extinción como es el caso de *Cattleya candida* ha sido desarrollado por la Asociación Vallecaucana de Orquideologia, que ha contado con el apoyo de la Whitley Fund for Nature, la Iniciativa Darwin y la coordinación del Royal Botanical Garden, Inglaterra (Seaton & Ramsay, 2005).

En el 2001, El Instituto Alexander von Humboldt y el Ministerio del Medio Ambiente formularon la Estrategia Nacional para la Conservación de Plantas como guía para desarrollar un plan integrado de la conservación de orquídeas de los bosques de niebla del suroccidente colombiano, señalaron que cerca del 87,1 % de las especies de orquídeas (331) ya estaban registradas ante la Autoridad Administrativa de CITES. Paralelamente, otras entidades también están apoyando proyectos de investigación, conservación y educación relacionados con las orquídeas tales como la American Orchi Society, Sociedad de Orquideología de San Diego (USA) y la Royal Botanical Gardens en Kew, Inglaterra (Orejuela-Gartner, 2010).

En Colombia un estudio relevante relacionado con el conocimiento del nivel de vulnerabilidad de las orquídeas está plasmado en el Libro Rojo de Plantas. Los autores analizaron 18 géneros, en los que se reportó que cerca de 371 especies (10 %) de orquídeas colombianas estarían bajo amenaza de extinción. Los géneros *Masdevallia, Drácula, Odontoglossum* y *Restrepia* contienen la mayor cantidad de especies amenaza y tienen comprometidos el 50 % de sus especies en algún nivel de amenaza. Los siguientes géneros contenían especies en un número intermedio de alguna categoría de amenaza a saber: *Cattleya, Anguloa, Cycnoches, Lycaste, Rodriguezia y Phragmipedium*. También se resalta en el trabajo que los géneros con mayor porcentaje de especies amenazadas para Colombia son *Anguloa* y *Restrepia* (19 especies), *Lycaste y Drácula* (con 46 especies), *Odontoglossum* (con 29 especies), *Cattleya y Mandesvallia* (con 84 especies) *y Miltoniopsis*. Las causas de amenaza para las especies citadas se relacionan con la excesiva recolección con fines comerciales y ornamentales, especialmente en el caso de las especies de los géneros *Anguloa, Cattleya y Cycnoches*. Como estrategia de conservación para muchas especies silvestres de orquídeas la conservación *in situ* de áreas donde estén tanto arboles hospederos, insectos y hongos micorrízicos es considerada la más apropiada (Calderón-Sáenz, 2006).

Las orquídeas son parte fundamental de los recursos filogenéticos, presentan requisitos complejos para la polinización y germinación de las semillas,

sufren pérdida de hábitats, factores cruciales aceleradores de degradación de las poblaciones silvestres que justifican la importancia de la conservación de manera *in vitro* (Hidalgo, 2014).

La técnica de cultivo *in vitro* está siendo usada en varios países como Tailandia, Singapur, Malasia, Indonesia y otros. Así lo manifestó Koopowitz (1996) en el estudio de Salazar y Mata (2003) relacionado con la conservación de orquídeas mexicanas, asegura en palabras textuales que:

> "el empleo de la micropropagación de orquídeas, es uno de los medios que permiten conservar poblaciones silvestres, así que el desarrollo de paquetes tecnológicos, que puedan ser adoptados por horticultores, comunidades organizadas e interesadas en la explotación racional de sus recursos, contribuye directamente a su conservación, disminuyendo en gran medida la presión de la coleccta de poblaciones silvestres" (p.152).

La técnica de la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas favorece la conservación de germoplasma de orquídeas y garantiza la producción masiva de material vegetal para incorporarlo en programas de reintroducción al hábitat natural con mantenimiento de variabilidad genética (Real Carrasco, Moreno Martínez & Menchaca García, 2007).

La Resolución Cof. 11.11 de CITES (Rev.CoP15) sobre la Reglamentación del comercio de plantas, señala que se entiende por reproducción artificial (vegetativa y/o *in vitro*), aquella que implica plantas vivas cultivadas empleando semillas, estacas, esquejes, tejidos callosos u otros tejidos vegetales, esporas u otros propágulos en un medio controlado, es decir, en un medio no natural, intensivamente manipulado por el hombre y protegido de las condiciones meteorológicas.

5. Antecedentes en cultivo *in vitro* en Orchidiaceae

Background in vitro culture in Orchidaceae

5.1. PROCESO HISTÓRICO DEL CULTIVO *IN VITRO* EN ORQUÍDEAS

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta usada para la propagación masiva de plantas de interés. Consiste en colocar partes de la planta en medios nutritivos bajo condiciones estériles tales como semillas, embriones, órganos, explantos (yemas apicales, meristemos, segmentos de hojas, varas florales o flores), tejidos, células órganos, anteras, células y protoplastos. El cultivo de semillas de orquídeas como modalidad *in vitro* de las plantas superiores tiene como finalidad el acortamiento del ciclo de mejora, sustitución de la simbiosis (micorrizas) y evitar la competición con otros microorganismos (Pierik, 1990).

El cultivo de semillas de orquídeas fue reportado por Bernard desde 1899 cuando precisó la existencia de hifas de hongos en los protocormos y raíces de las plantas e infirió que las hifas eran fundamentales para proporcionarles nutrientes, agua y materia orgánica. Dichas apreciaciones lo condujeron a experimentar en 1909 la forma de obtener germinación simbiótica en un tipo de orquídea *Neottia nidus-avis* (Rasmussen, 1995; Wing-Yam & Arditti, 2009) y pudo a través de sus ensayos describir el proceso germinativo de las semillas de orquídeas. Bernard acuñó el término de "protocormo" como un estadio temprano del desarrollo del embrión de las orquídeas e históricamente fueron estas las primeras plantas propagadas *in vitro* a partir de la siembra de semillas de manera simbiótica.

Posteriormente Lewis Knudson en los Estados Unidos de América en 1921 fue el primero en plantear un procedimiento pionero para propagar semillas de orquídeas en un medio con diferentes nutrientes con sales, minerales y azúcares sin la asociación con hongos como lo refirieron Arditti y Krikorian (1996) y Wing-Yam y Arditti (2009). En sus experimentos cultivaron

semillas de *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum* y otros géneros y encontraron que respondían eficientemente al crecimiento asimbiótico reportado por Knudson (1921) citado por Wing, Nair, Sin y Arditti (2002). Esta técnica en la que con las condiciones ambientales y suministro de nutrientes apropiados podía favorecer la germinación de diversas especies de orquídeas tanto silvestres como híbridas revolucionó el mundo de propagación de orquídeas (Arditti, 1993), pues la posibilidad de cultivar híbridos intergenéricos y multigenéricos son los responsabales de la existencia actual de una gran variedad de colores en géneros de *Phanaelopsis*, *Aranda*, *Darwinara*, *Knudsonara*, *Lindleyara*, *Mokara* y otros.

Posteriormente las técnicas de cultivo *in vitro* en orquídeas se ampliaron con los trabajos de Morel en 1960, quien logró propagar vegetativamente plantas de *Cymbidium* por cultivo de meristemos. En sus experimentos obtuvo cuerpos protocórmicos capaces de generar un vástago con hojas y raíces como una forma de clonación; así el cultivo de meristemos de orquídeas se convirtió en la primera aplicación comercial de la propagación *vegetativa in vitro* (Pierik, 1990; Wing-Yam & Arditti, 2009).

5.2. CONSIDERACIONES EN LA REPRODUCCIÓN *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS A PARTIR DE SEMILLAS

La germinación *in vitro* de semillas actualmente es un procedimiento muy importante para la conservación y propagación de orquídeas en gran escala porque permite mantener la variabilidad genética de las poblaciones (Arditti, 1993). La obtención de plantas de orquídeas a partir de semillas contempla tres etapas importantes: Etapa I: Establecimiento y germinación *in vitro*; Etapa II: Desarrollo del protocormo hasta diferenciación de plántula; Etapa III: Transplante de plantines a condiciones de invernadero para dar inicio al metabolismo fotosintético correspondiente.

Figura 19. Etapas del proceso de germinación *in vitro* de semillas de orquídeas
En la parte superior, formación de protocormos; en la parte inferior, plántulas desarrolladas con formación radicular y sembradas en sustrato
Fuente: Cáceres (2015)

En la actualidad diversas técnicas de cultivo *in vitro* se aplican en las orquídeas, sea para micropropagación clonal de especies, eliminación de enfermedades a través del cultivo de meristemos, establecimiento de colecciones de germoplasma de semillas o plantas cultivadas en medios mínimos, producción de plantas poliploides, inducción de variación somaclonal, ingeniería genética, producción de metabolitos secundarios y en investigaciones básicas (Buenavista, 2010).

5.3. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES AMBIENTALES EN EL PROCESO GERMINATIVO *IN VITRO* DE SEMILLAS

Para obtener un protocolo adecuado de propagación *in vitro* a partir de semillas es necesario tener en cuenta varios aspectos, entre ellos la selección del medio de cultivo. La formulación del medio de Knudson presentó limitaciones para alcanzar la germinación de ciertas especies de orquídeas sean epífitas o terrestres, lo cual condujo a explorar diversas modificaciones relacionadas con el contenido de sales. Los medios minerales usados para la

germinación y crecimiento de orquídeas terrestres por lo general requieren concentraciones de macro y microelementos más bajas que en las epífitas (Pierik, 1990).

En diversos trabajos investigativos se ha evaluado el efecto potencializador de la adición de mezclas complejas (banano, coco, tomate y piña), reguladores de crecimiento, carbón activado, concentración y tipo de azúcar como fuente de energía para optimizar el proceso germinativo y crecimiento de plantas, sea para conservar material vegetal o producción comercial (Salazar Rojas & Mata Rosas, 2003). Otro factor importante que debe tenerse en cuenta para garantizar porcentajes germinativos altos, es el manejo de las condiciones ambientales controladas de temperatura y luz; varios estudios han demostrado una estrecha relación entre la creación de ambientes con temperatura entre 20-25 ^{o}C con luz de baja irradiancia de (2.5 a 10W/m^{2}) y fotoperiodos de luz 12 a 16 horas con índices elevados de germinación (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2016).

5.4. MADURACIÓN DE CÁPSULAS Y VIABILIDAD DE SEMILLAS

Otro aspecto que interfiere en el suceso germinativo asimbiótico de semillas de orquídeas está relacionado con la maduración de las cápsulas y la viabilidad de las semillas. El conocimiento del estado de maduración adecuado del embrión con fines de propagación *in vitro* o preservación de material genético ha sido considerado un factor relevante.

En cuanto al tiempo de maduración de la cápsula, la determinación del momento ideal para la siembra de semillas puede variar sustancialmente; en algunos estudios se han sembrado semillas en estadios intermedios de maduración y la respuesta germinativa ha sido adecuada.

Los periodos de tiempo que se dan entre la fertilización y la maduración para algunos **géneros** se muestran en la Tabla 1 (Bakar, Abdul & Gansau, 2014).

Tabla 1. Determinación del tiempo de maduración de cápsulas para algunos géneros de orquídeas

GÉNERO	TIEMPO MADURACIÓN / MESES
Colanthe	4
Cattleya	11
Cymbidium	10
Dendrobium	12
Epidendrum	3 a 5
Laelia	9
Miltonia	9
Odontoglossum	7
Paphiopedilum	10
Phalaenopsis	6
Sthanhopea	7
Vanda	20

Fuente: Pierik (1990)

El tiempo de maduración de las cápsulas es aproximado en cada género con variaciones en cada especie. Por ejemplo en *Oncidim lanceanum* y *O carthagenense* las cápsulas presentan tiempo de maduración entre 6 y 8 meses y en *Oncidium ampliatum* se alcanza entre 2 y 3 meses. En *Cattleya unifoliada* se han hallado embriones maduros entre 6 y 7 meses, mientras que en *Cattleya bifoliada* en 4 y 5 meses. Surenciski, Flachslan, Terada, Mroginski y Rey (2012) con el fin de contribuir en la crio-preservación de *Cyrtopodium hatschbachii pabst* realizaron un seguimiento preciso desde el momento de la fertilización hasta la obtención de embriones inmaduros, mediante la técnica de encapsulación deshidratación y encontraron que la madurez de los embriones se presento a los 120 días. Determinaron mediante observaciones al microscopio que el promedio de semillas por cápsula para esta especie fue de 250.000 con embriones visibles de apariencia amarillenta.

Aguilar-Morales y López-Escamilla (2013) compararon la respuesta germinativa de las semillas de *Laelia speciosa* (Kunth) procedentes de cápsulas maduras e inmaduras y no hubo germinación en las semillas procedentes de

cápsulas maduras al presentar embriones atrofiados. Respuestas similares se obtuvieron en estudios previos en *Laelia abilda* se consideró como causa ciertos efectos ecofisiológicos y variabilidad genética; y en *L. speciosa* dicho fenómeno podría estar atribuido a la necesidad de un agente polinizador externo para su reproducción sexual y requerimiento de apareamiento mixto y con tendencia a la exogamia. Posiblemente algunas poblaciones son afectadas en la actualidad por disminución de individuos y el cambio del uso del suelo, podría conllevar a problemas de endogamia.

Rodríguez, González, Alvarado, Telles (2007) colectaron cápsulas verdes entre 60 y 80 días después de la polinización de 15 especies de orquídeas silvestres cubanas para estudiar la germinación *in vitro;* Ávila y Salgado (2006) utilizaron también cápsulas con madurez fisiológica previo a su apertura para cultivar semillas de varias especies mexicanas a saber: *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Epidendrum radicans*, *Euchile citrina*, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis*, *Oncidium cavendishianum*, y *Oncidium tigrinum*. Pedroza (2009) colectó cápsulas indehiscentes de 8 meses de edad de *Epidendrum elongatum* resultantes de polinización natural ubicadas en el Jardín Botánico de Bogotá, José Celestino Mutis.

En algunos casos no es posible cosechar cápsulas previas a su apertura (inmaduras) e indehiscentes, su almacenamiento por ciertos periodos de tiempo pone en peligro la vida del embrión, así por tanto es recomendable aplicar pruebas de viabilidad previas a la siembra *in vitro*.

La viabilidad de las semillas varía de una especie a otra, se puede ir perdiendo a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, como es referido por Vendrame *et al*. (2007) e Hirano *et al*. (2011), citados por Ortega-Larrocea et al., (2007), así las condiciones específicas de temperatura de 5 °C o ultra bajas de -196 °C y humedad relativa sobre el 10 % se consideran ideales para preservar la vida del embrión por más tiempo.

Determinar la viabilidad de las semillas es una herramienta de gran utilidad en el momento de regenerar y propagar especies silvestres como se aprecia en diversos trabajos que han considerado la realización de dichas pruebas, con la intención de garantizar que el proceso germinativo presente índices elevados. La prueba consiste en aplicar el test de tretazolio (2,3,5-cloruro trifenil tetrazolio) o CTT, para detectar signos de vida o actividad metabólica, las semillas se tiñen de rojo al reducir el tetrazolio como consecuencia de la actividad respiratoria de las células embrionarias. Es aceptada por la International seed Testing Association (ISTA; 1995) (Pierik, 1990); Johnson et al., 2007; Lauzer *et al*., 2007; Vujanovic *et al*., 2000, citados por Salazar-Mercado, 2012). La prueba de viabilidad del tetrazolio se ha aplicado ampliamente en estudios comparativos de germinación asimbiótica y simbiótica. En el caso de las especies de *Epidendrum ramosum, Lepanthes rupestris* y *Psychilis monensis* se utilizó con el fin de garantizar porcentajes de germinación elevada (Otero, Ospina & Bayman, 2009). En ocasiones la viabilidad de las semillas se puede mantener por varios días después de la apertura de la cápsula; semillas de *Oncidium stramineum* fueron sembradas 35 días después de la colecta de las cápsulas y se reportó un elevado porcentaje de germinación (Flores-Escobar *et al.*, 2008); también en *Cattleya mendelii* se tomaron semillas maduras de cápsulas dehiscentes polinizadas manualmente y almacenadas en sobres de kraft a 4 °C con sílica gel, las cuales fueron sometidas a pruebas de viabilidad antes de la siembra con porcentajes elevados de germinación (Salazar-Mercado, 2012).

La semillas procedentes de cápsulas maduras o dehiscentes deben desinfectarse antes de la siembra; dichos desinfectantes pueden afectar al embrión, lo cual en los estudios previos a la siembra se recomienda establecer relación entre el efecto de las sustancias desinfectantes utilizadas sobre la viabilidad de las semillas. Este aspecto se evidenció en el estudio de la germinación asimbiótica de semillas de *Cattleya mendelii*, se comparó el efecto de diferentes dosis de hipoclorito de sodio sobre la viabilidad de semillas y el porcentaje de germinación alcanzado. Los resultados mostraron que el hipoclorito de sodio al 1 % no causó daño al embrión, mientras que dosis

mayores afectaron significativamente la viabilidad de las semillas. El uso de la prueba de tetrazolio permitió predecir la capacidad de germinación de *C. mendelii,* aplicable también *a* otras especies de orquídeas como lo refieren Stewart y Kane, (2006), Yamasaki y Miyoshi, (2006), Mweetwa *et al*., (2008) en Salazar-Mercado, 2012).

5.5. MEDIOS DE CULTIVO Y DESARROLLO PLANTULAR A PARTIR DE PROTOCORMOS

Los factores que afectan el desarrollo plantular a partir de protocormo son similares a los considerados en la fase de germinación; entre ellos se menciona el medio idóneo del tipo y concentración de minerales, cantidad de azúcar que por lo general está en el rango 1-3 % (p/v), un pH entre 4,8-5,8; presencia de vitaminas como Ácido Nicotínico, Piridoxina y mio-inositol. Desde 1982 se aconsejó el medio Knudson C modificado para el cultivo de orquídeas tropicales y en el caso de las orquídeas terrestres se recomiendan medios pobres en sales, mientras que en orquídeas epífitas requieren por lo general medios más enriquecidos en sales (Pierik, 1990). El uso también de mezclas complejas incluye homogenizado de plátano, leche de coco, peptona, triptona, levadura de fermentación, hidrolizado de caseína, jugo de piña o de tomate, entre otros, que han mostrado tener resultados importantes en el desarrollo de los brotes. El medio de cultivo Murashige and Skoog (1962) actualmente es muy usado para la producción de diversas especies de orquídeas, las cuales en algunos casos requieren ciertas variaciones en la concentración de sales para garantizar mayores tasas proliferativas.

Diversos ejemplos demuestran la necesidad de implementar protocolos propios para la propagación de especies considerando el uso cuidadoso del medio de cultivo, independientemente del explante (semillas o ápices). En el Jardín Botánico Lankester de la Universidad de Costa Rica implementaron estrategias de cultivo *in vitro* de semillas para rescatar especies en peligro de extinción, específicamente para *Cattleya skinneri,* flor Nacional, mientras que para híbridos de C. skinneri x C. máxima forma de representar un híbrido

implementaron estudios pioneros de micropropagación mediante ápices para obtener clones. En los dos casos el establecimiento, formación de protocormos y diferenciación de plántulas hasta la formación de raíces demandó la selección de los medios más adecuados (Alvarado-Ulloa, 2000).

En México, De la Piedra (2002, citado por Panduro & Aly, 2005) realizó la evaluación de los medios de cultivo Knudson y Vacin Went suplementado con pulpa de plátano y carbón activado para la regeneración *in vitro* de *Brassavola cucullata* y *Oncidium cebolleta (Jacq);* halló que los dos medios favorecieron la brotación de plántulas, pero se presentó mejor enraizamiento en el medio Knudson en las dos especies estudiadas. *Phragmipedium kovachii Atwood Dalström & Fernández,* especie endémica del Perú y en peligro de extinción, fue también cultivada en condiciones *in vitro* partiendo de semillas empleando diferentes medios de cultivo. El estudio muestra la importancia de la aplicación de reguladores de crecimiento a diferentes dosis y combinaciones para estimular el desarrollo de plántulas con la finalidad de incorporar esta metodología en programas de conservación.

De igual forma, en el Jardín Botánico Clavijero (JBC) en México sumaron esfuerzos para la propagación y conservación de orquídeas como parte integral de la estrategia de conservación *ex situ* de la orquideoflora del país. El propósito del trabajo fue consolidar un banco de germoplasma *in vitro* de orquídeas mediante la germinación de semillas de tres especies *Mormodes tuxtlensis*, *Cuatlauina pendula* y *Lycaste skin* hasta obtener los protocolos de regeneración para cada una de las especies silvestres; en términos generales hubo mejor producción de brotes, raíces, talla alcanzada y porcentajes de sobrevivencia en el medio MS (Salazar Rojas & Mata Rosas, 2003).

En el proyecto Ecología y cultivo sostenible de orquídeas nativas del Soconusco de EECOSUR (Unidad Tapachula, México), evaluaron el efecto de cuatro medios de cultivo (Hutner, Knudson C modificado, Dalla Rosa-Laneri y Knudson C) de uso común para la germinación de semillas *in vitro* sobre tres especies de orquídeas *Cattleya aurantiaca, Epidendrum chacaoensis* y

Brassavola nodosa. Encontraron que en *Cattleya aurantiaca* el porcentaje de germinación promedio fue de 91 %, no hubo diferencias significativas en los diferentes tratamientos. Así mismo, el número de hojas, raíces y mejor tamaño de las plantas obtenido al final del proceso de observación fue mejor en el medio Dalla Rosa y Laneri con diferencias significativas entre los demás medios, mientras que en *Epidendrum chacaoensis*, el porcentaje de germinación más elevado se obtuvo en los medios Hutnter (95,3 %) y Knudson C, así mismo el desarrollo de las plántulas se apreció mejor en estos dos tratamientos. La promoción de hojas, raíces y tamaño de las plantas presentaron diferencias altamente significativas, los mejores medios fueron Dalla Rosa y Laneri seguido de Hutner.

En *Brassavola nodosa,* el grado de germinación fue similar en los cuatro medios empleados, pero significamente mejor en Hutner, Dalla Rosa y Laneri y Knudson C que el medio Knudson C modificado, mientras que el desarrollo de las plántulas fue mejor en el medio Knudson C y similares resultados en los demás medios. El desarrollo de la mayor cantidad de hojas, raíces y tamaño de las plantas en *Brassavola nodosa* demostró una clara ventaja en el medio Dalla Rosa y Laneri con diferencias altamente significativas. El anterior estudio mostró las ventajas y desventajas de cada medio frente a los parámetros estudiados en cada una de las especies, se dejó señalada la importancia de evaluar diferentes tratamientos para encontrar el más adecuado en la expresión del desarrollo y crecimiento de la especie a cultivar Damon, Aguilar, Rivera y Nikolaeva (2004).

En Bolivia, Morales, Penacho y Quispe (2004) propagaron masivamente especies de este país categorizadas en peligro: *Cattleya nobilor, Oncidium Stacyi, Mormodes morenoi, Cyrtopodium* y *Schomburgkia;* como explantes usaron semillas y brotes. Con el trabajo lograron consolidar un banco de semillas y una colección viva con 2.500 especímenes, 200 especies de orquídeas y 250 acsecciones en bancos de semillas. También Flachsland, Schinisi, Terada, Furst y Mronginski (2005) implementaron estrategias

de conservación *ex situ* para la especie *Cyrtopodium hatschbachi* para demostrar la factibilidad de conservar semillas e incrementar tasas poblacionales de la orquideoflora de Bolivia.

Con el fin de disponer de mayor número de individuos de las especies de orquídeas silvestres del macizo montañoso Nipe-Sagua-Baracoa, donde hay buena representación de la flora orquideológica de Cuba con gran demanda ambiental, ecológica y económica, en el Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM) se iniciaron estudios para micropropagar y adaptar vitroplantas de 21 especies como contribución al rescate y conservación. Todas las especies en su mayoría endémicas y amenazadas: *Bletia purpurea, Campylocentrum micranthum, Encyclia gravida, Encyclia oxypetala, Encyclia phoenicea, Epidendrum difforme, Epidendrum nocturnum, Epidendrum secundum, Epidendrum wrigthii, Eulophia alta, Oeceoclades maculata, Oncydium luridum, Prosthechea cochleata* y *Schomburgkia lyonsii*. El estudio comprendió la siembra de semillas procedentes del banco de germoplasma de orquídeas silvestres del CDM en cuatro medios de cultivo: Murashige y Skoog, Knudson C, Vacin y Went y Morel. Se logró la germinación de semillas en 13 especies procedentes de cápsulas inmaduras en tiempos variables. Se evidenciaron las ventajas del medio líquido sobre el semisólido en la germinación y estimulación de protocormos en las especies *Encyclia oxipetala y E. phoenicea*. Hubo diferencias significativas en la respuesta a la germinación dependiendo del nivel de maduración de las semillas. En la fase de aclimatación las especies de *Oncidium luridium, Encyclia phoenicea* y *Prosthechea cochleata,* presentaron porcentajes de sobrevivencia elevados con el sustrato fibra de coco (Rodríguez, 2005).

Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia (2006) establecieron sistemas de micropropagación para alcanzar la reproducción en forma masiva de 9 especies de orquídeas mexicanas (*Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Euchile citrina, Epidendrum radicans*, *Laelia albida, Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Oncidium tigrinum* y *Oncidium cavendishianum*) para conservarlas *in vitro*

mediante subcultivos periódicos cada 12 o 24 meses. Cultivaron segmentos de hojas, estructuras tipo protocormos y pseudobulbos en medio Murashige y Skoog (MS) con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento de ANA, BA y AG3 para inducir callos, estructuras tipo protocormos hasta plántulas y posterior mantenimiento de las orquídeas. La inducción de callos se obtuvo por la adición de ANA (0.25-1.0 mg/l) con combinaciones de diferentes dosis de BA (0.5-2.5 mg/l) en todos los explantes utilizados. Así mismo la inducción de estructuras tipo protocormos se observó en medio MS con la adición de diferentes concentraciones de ANA, BA a partir del uso de fragmentos de callos en tiempos desde los 21 a 180 días de cultivados dependiendo de la especie. La regeneración de plantas a partir de estructuras tipo protocormos se alcanzó con la adición de ANA, BA, AG3 en tiempos cortos (3-4 meses). Las especies se mantuvieron en medios mínimos con variaciones en la concentración de sus componentes: sacarosa, adición de sustancias retardadoras del crecimiento como manitol, sorbitol y ácido abscisico, disminución de la temperatura y luz difusa.

Díaz, Namur y Bollati (2007) evaluaron el efecto que ejercen las variaciones en la concentración de sales y vitaminas sobre la germinación de semillas en *Cyrtopodium punctatum*. Kalimuthu, Senthilkumar y Vijayakumar (2007) obtuvieron protocolos de propagación en *Oncidium* sp; se precisó la importancia del uso de los reguladores de crecimiento en las etapas de germinación, producción de protocormos, multiplicación de brotes y formación de raíces, con elevados índices de adaptación.

Real Carrasco, Moreno y Menchaca (2007) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de la hormona BAP sobre el desarrollo de brotes esféricos (*Protocorm-like Bodies*), PBLs a partir de protocormos de *Mormodes maculata* emplearon el medio MS. Encontraron que la hormona 6-Bencilamino purina (BAP) jugó un papel importante en la promoción de morfogénesis directa de PBL. La formación de estos PBL ocurrió a partir de los 13 días de incubados, formaron por hasta 12 PBLs semilla en 33 días. Se concluye

que la técnica puede ser utilizada como alternativa económica y de conservación *ex situ* y para aumentar el volumen poblacional de especies silvestres.

(Flores-Escobar, Solano, Vásquez y Colinas-León (2008) estudiaron el proceso de propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum lendl* a partir de semillas sembradas en medio MS. Los trasplantes realizados se hicieron en el mismo medio, pero fue suplementado con extractos orgánicos: agua de coco, peptona, carbón activado y polivinil pirrolidona. Al finalizar el estudio se demostró la eficacia de los medios, representada en el vigor y altura de las plántulas.

Ortega-Larrocea Martínez y Chávez (2007) en el documento relacionado con conservación de orquídeas de la Reserva Ecológica del Pedreral de San Ángel (REPSA) México referencian que en este lugar se iniciaron los primeros estudios detallados y sistemáticos por parte de Chávez (1980) del proceso germinativo en Bletia urbana, especie en peligro de extinción y posteriormente se logro sincronizar su germinación hasta convertirse en la primera orquídea reintroducida en su hábitat con el trabajo complementario de Martínez Palacio (1991).

En Colombia, *Oncidium elongatum jacq* especie endémica y en peligro de extinción, se cultivó en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con diferentes concentraciones de carbón activado, Ácido Indol Acético (AIA) y Benzil Amino Purina (BAP) para examinar el comportamiento de protocormos. La experiencia reportó la obtención de cerca de 270.000 plántulas vigorosas; el protocolo empleado es viable para la conservación de este recurso vegetal (Pedroza-Manrique, 2009); así también Chávez, Mosquera, & Ospina (2015) estudiaron la propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. Endl. (*Orchidiaceae*) mediante técnicas simbiótica y asimbiótica. Las semillas germinaron adecuadamente de manera asimbiótica en el medio Knudson. En condiciones simbióticas se utilizó el hongo *Rizocthonia solani* procedente del arroz y se observaron porcentajes de germinación similares a los hallados en el medio asimbiótico, pero con menores niveles de contaminación fúngica.

5.6. FASE DE ACLIMATACIÓN O TRASPLANTE DE VITROPLANTAS

La aclimatación hace referencia al proceso de adaptación de una planta a un área o zona climática de la cual no es nativa o a un microclima distinto al que ha tenido lugar en una fase previa al cultivo o bien consiste en la transferencia de plantas de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Este proceso se considera crítico y crucial en la sobrevivencia de plantas al ser necesario brindar condiciones idóneas que permitan la adaptación a las nuevas condiciones de luz, temperatura, humedad y actividad fotosintética como lo mencionan Viera, Unemoto, Yamakami, Nagashima, Faria y Aguilar (2009)

Figura 20. Plantas de *Peristeria elata* para ser incorporada en la fase de aclimatación
Fuente: Cácere (2016)

Durante el crecimiento *in vitro* las plantas presentan un tipo de nutrición heterótrofa por cuanto el proceso fotosintético es mínimo debido por un lado a la baja intensidad lumínica a que son expuestas y adicionalmente los carbohidratos son suministrados a la planta de manera directa por el medio de cultivo. También dentro de los recipientes predomina una humedad relativa elevada (> 90 %) que conlleva a un bajo funcionamiento

del aparato estomático (Zlv *et al.*, 1987, citado por Ortega-Larrocea et al., 2007). Las plantas regeneradas mediante condiciones *in vitro* no desarrollan un recubrimiento ceroso que les permita regular adecuadamente la evapotranspiración al ser sometidas a las nuevas condiciones ambientales (Sutter, 1988). Las hojas de las vitroplantas son muy delgadas con alteraciones anatómicas y funcionales por lo tanto al ser transferidas a condiciones de invernadero pueden sufrir clorosis y quemaduras. Por estas razones el manejo del microclima debe disminuir el exceso de transpiración en la medida que se desarrolle el aparato estomático y revestimiento cuticular de manera funcional como lo afirman Zlv, *et al*. (1987, citado por Ortega-Larrocea *et al*., 2007). Una vez se trasladan las plantas al invernadero se inicia de forma paulatina la nutrición autótrofa al estar expuestas a mayor intensidad luminosa y también se vuelven muy susceptibles al ataque de patógenos por las variaciones de humedad.

Algunos investigadores recomiendan mantener en las primeras semanas condiciones similares de incubación *in vitro* a saber: humedad relativa alta, reducción de la luminosidad en un 80 % para facilitar el proceso de adaptación de las vitroplantas. La capacidad de las plantas de superar las nuevas condiciones ambientales constituye el mayor reto dentro del proceso de propagación *in vitro*, por ello es imprescindible proporcionar las mejores condiciones con el ánimo de alcanzar porcentajes elevados de sobrevivencia de las vitroplantas. Esta dificultad ha sido referida por Torres & Sanabria (2011), quienes afirman que es debido quizá a las condiciones particularmente benignas del interior de los recipientes de cultivo, que no existen en el ambiente de crecimiento natural y esto hace que se supriman estímulos externos para el desarrollo normal. Esto conlleva a la aparición de múltiples defectos y anormalidades anatómicas y fisiológicas que afectan los mecanismos de regulación hídrica y de fotosíntesis, que son en definitiva los que dificultan la capacidad de adaptación al ambiente *ex vitro*. La elevada humedad dentro del recipiente promueve el crecimiento, pero induce alteraciones en la estructura de las hojas.

Otro aspecto fundamental a estudiar durante la etapa de aclimatación de plántulas de orquídeas es el tipo de sustrato que propicie la formación de verdaderas raíces y captura de nutrientes de forma eficiente.

En el estudio realizado (Rodríguez, 2005) se evaluó la influencia del tipo de sustrato en la adaptación de *Oncidium luridum* y *Encyclia phoenicea*. El sustrato de fibras de coco resultó ser el más idóneo en la adaptación de las dos especies y como alternativa de sustrato recomendaron el uso de Zeolita. En *Prosthechea cochleata* la aclimatación fue favorable en fibra de coco, pergamino de café y aserrín.

Para la adaptación de plántulas obtenidas *in vitro* se recomienda usar residuos que provengan de corteza de árboles tales como fibra de coco, aserrín y pino. En varios casos la fibra de coco es el mejor sustrato para la adaptación de vitroplantas (Banks, 2005). Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia (2006) determinaron el procedimiento para trasplantar y aclimatar plántulas micropropagadas de *Laelia autumnales, L. albida, Encyclia citrina* y *Oncidium cavendishianum,* lograron porcentajes de sobrevivencia por arriba del 70 %. En *Laelia speciosa,* se hallaron porcentajes de sobrevivencia de un 98 %, resultados atribuibles a que las plántulas *in vitro* se dejaron por 20 días en condiciones de invernadero previo a su trasplante y además estuvieron en medio MS con 100 % de nutrimentos y 40 g litro-1 de sacarosa según lo estableció Ortega-Larrocea *et al*. (2007). Los plantines se dejaron en ambiente controlado con humedad relativa del 70 % en los siguientes 90 días en potes comunitarios para luego cultivarlos de manera individual. Se produjeron raíces con velamen y pseudobulbos a los 30 días de trasplantadas; las plántulas de *L. speciosa* crecieron y se desarrollaron durante dos años de manera adecuada.

Vidoz, Flachsland, Rey & Mroginski, (2008) estudiaron el comportamiento *ex vitro* de plantas de *Brassavola perrinnii* y tres híbridos intergenéricos y su relación con el tipo de medio de cultivo de donde procedían. Los protocormos se llevaron a medio MS, 1/2MS y fertilizante comercial Hiponex,

suplementado con banana, carbón activado o una mezcla de banana y carbón activado donde se dejaron crecer por 100 días. Las plantas fueron transferidas a condiciones *ex vitro* en macetas que tenían como sustrato pinopátula, carbón activado y perlita y mantenidas en cuartos climatizados con fotoperiodos de 14 horas a 27 °C por 30 días. Posteriormente se llevaron a invernadero con malla reductora de luz del 80 % por 120 días, se les aplicó fertilizante foliar (6-3-5) por dos meses y luego en dosis de 11-8-6. Se encontró en el estudio que el porcentaje de sobrevivencia dependió del material vegetal y del medio donde procedían. Así en *Brassavola perrinnii* se obtuvieron porcentajes de plantas establecidas en valores del 52 % cuando provenían del medio Hiponex suplementada con banana, mientras que en *B. perrinnii x Epidendrum ibaguensi* se obtuvieron porcentajes de establecimiento elevados cercanos al 90 % si procedían del medio salino suplementado con banana. En plantas que crecieron en medio Hiponex alcanzaron porcentajes de establecimiento del 100 %. Se concluyó en el trabajo que el medio de origen de las plántulas es un factor importante para la ulterior sobrevivencia, se destacó que los medios suplementados con banana fueron más eficientes para aumentar el establecimiento comparado con aquellas plantas que fueron sembradas en medios que contenían carbón activado o menor aun si tenían mezcla de ambos.

Vieira *et al.* (2009) estudiaron la propagación y aclimatación de un híbrido de *Cattleya Lindl. Cattleya labiatra x Cattleya forbessi.* Las semillas del híbrido fueron cultivadas en medio MS con adición de agua de coco y pulpa de banano. Las plantas obtenidas a los seis meses fueron colocadas en bandejas de icopor con fibra de coco. Se mantuvieron en casas de vegetación con el 50 % de luminosidad, regadas semanalmente con abono foliar NPK 6:6:8. Concluyeron que los mejores tratamientos para la propagación *in vitro* y aclimatización de las plántulas fueron los medios MS con pulpa de banano y adición de agua de coco en proporciones de 50 a 100g de pulpa de banano o 100 ml de agua de agua de coco.

6. Materiales y Métodos

Materials and Methods

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad y orquideario de Santander (UDES) en Bucaramanga, Santander, durante un periodo de 24 meses. Se tuvieron en cuenta las tres fases de cultivo: I. Establecimiento y germinación *in vitro* II. Desarrollo del protocormo y formación de la plántula. III. Aclimatación de la planta *ex vitro.* Parte de los ensayos de aclimatación fueron realizados en casa de malla de la Finca Villa Katy-Morrorico, Bucaramanga.

6.1. MATERIAL VEGETAL

Se recolectaron cápsulas indehiscentes de 18 especies teniendo en cuenta como criterio indicador de madurez el cambio de coloración a amarillo especialmente en la base del relicto floral y si este se encontraba seco sin deformaciones según recomendaciones de Seaton y Ramsay (2005).

Las cápsulas maduras de *Cattleya mendelii*, *Catasetum lucis, Cycnoches chlorochilon, Peristeria elata, Oncidium hastilabium, Mormodes lucinatum, Trhicocentrum cebolleta, Prosthechea fragrans, Epidendrum ibagense, Acineta superba y Anguloa clowessi* fueron recolectadas en el municipio de Bucaramanga procedentes de las colecciones de cultivadores de "Asorquisan". Las especies de *Epidendrum nocturnum, Eriopsis biloba* y *Sieverkingia* se obtuvieron de la reserva de Virolin municipio de Charalá. Las cápsulas de *Sobralia uribei* fueron tomadas del municipio de La Mesa de los Santos en su medio natural y para el caso de *Santanderella amadorin-coniana P. Ortiz* se recolectaron de plantas ubicadas en el Km 10 vía Cúcuta.

6.2. PROCESO DE DESINFECCIÓN

Las cápsulas seminales cerradas se lavaron en solución jabonosa por diez minutos con permanente agitación y enjuagadas posteriormente con agua destilada. Se transfirieron a cámara de flujo laminar y fueron sumergidas en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5 % de cloro con dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos. Se lavaron tres veces consecutivas con agua

destilada estéril y fueron flameadas por unos segundos en el mechero. Se colocaron en cajas de Petri para realizar la apertura longitudinal de la cápsula con ayuda de un bisturí para ser dispersadas en los recipientes con el medio de cultivo.

6.3. ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE SEMILLAS EN MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Semillas procedentes de cápsulas previamente desinfectadas fueron dispersadas de manera uniforme con escalpelo en recipientes gerber con alícuotas de 20 ml de medio Murashige-Skoog (1962) a la totalidad de las sales suplementado con 100 ml de agua de coco.

Para la especie *Sobralia uribei* se empleó el medio MS modificado a la mitad de la concentración de sales suplementado con 60 g de banano, 2g peptona, biotina 0,05 mg/l y 20 g de sacarosa. Las semillas de *Santanderella amadorinconiana* P. Ortiz se sembraron en MS a la mitad de sales suplementado con 100 ml de agua de coco y 20 g de panela en polvo. El pH de los medios se ajustó a 5,8 con NaOH (1N) o HCl (1N) y se solidificaron con 7,0 g/L de agar-agar. Se esterilizaron a 121 ^{0}C y 1 Kg de presión durante 20 minutos.

Los cultivos se colocaron en cámara de incubación a ±24 ^{0}C con iluminación suministrada por lámpara fluorescente con intensidad lumínica de 1000 lux con fotoperiodos de 12 h luz y 8 h oscuridad.

Para evaluar el proceso de germinación de semillas a plántulas de las especies estudiadas se observaron cada semana durante 180 días a partir de la siembra, teniendo en cuenta las fases del desarrollo, así:

Fase 0: Semillas con embrión no germinado

Fase 1: Expansión del embrión germinación, se aprecian en el medio de color beis.

Fase 2: Aparición del protocormo y rizoides. En la superficie del medio se aprecia que las semillas adquieren tonalidades verdosas.

Fase 3: Emergencia y aparición de la primera hoja. Ya se percibe el crecimiento de las semillas como estructuras redondeadas en la superficie del medio.

Fase 4: Una hoja y aparición de raíces.

Fase 5: Presencia de dos o más hojas, raíz presente (=plántula).

Se analizaron como unidades experimentales 15 recipientes por género. El porcentaje de germinación se halló al obtener el promedio de la germinación en los recipientes analizados.

Se seleccionaron semillas de *C.mendelii, Sobralia uribei* y *Santanderella amadorinconiana* P. Ortiz para examinarlas al microscopio y realizar el seguimiento microscópico del proceso germinativo durante 30 días después de la siembra en el medio de cultivo.

6.4. DESARROLLO DE PROTOCORMOS Y FORMACIÓN DE PLÁNTULA. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Una vez se alcanzaron alturas de aproximadamente un centímetro y el número de plántulas era abundante en cada recipiente, fueron separadas para ser transferidas a medios de crecimiento: Murashige & Skoog (1962) MS a la totalidad suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y agua de coco en los siguientes tratamientos:

Tabla 2. Formulación de suplementos y reguladores de crecimiento para el cultivo de protocormos

	CONCENTRACIÓN (MG/L)				
Componentes	**MC**	**MB**	**MA**	**T1**	**T2**
Agua de coco (ml/l)	100	150	150	100	100
Tiamina	10,0	10,0	1,0	1,0	1,0
Sacarosa (mg/l)*	20.000	30.000	20.000	30.000	30.000
ANA	--	0,1	0,18	0,5	0,3
AIA	0,3	--	--	--	--
AIB	1,75	--	--	--	--
KIN	1,75	--	0,22	0,05	--
BAP	--	0,5	--	--	2,0
AG3	--	--	0,35	--	--

El medio basal es MS (1962), * se adiciona según el medio. ANA= Ácido naftelenacético; AIA= Ácido indolacètico; IAB= Ácido indolbutírico; KIN= Kinetina; BAP= bencilaminopurina; AG3= Ácido giberélico T1CA (Kin 0.05; ANA 0,5 mg/L) con AC 100 ml, Sacarosa 30 g/L; T2CA (ANA 0,3; BAP 2 mg/L) con AC 100 ml, Sacarosa 30 g/; MC: KIN 1,75 mg L^{-1}; AIB 1,75 mg L^{-1}; AIA 0,3 mg L^{-1}; Tiamina 10 mg L^{-1} con AC 100 ml, Sacarosa 20 g/L. MB: ANA 0,1 mgL^{-1}; BAP 0,5 mg L^{-1} con AC 150 ml, Sacarosa 30 g/L; Tiamina 10 mg L^{-1}; MA: KIN 0,22 mg L^{-1}; ANA 0,18 mg L^{-1}; AG3 0,35 mg L^{-1} con AC 150 ml, Sacarosa 20 g/L . En algunos tratamientos se utilizaron medios sin carbón activado (Tabla 2). Y el medio Knudson C: suplementado con peptona 2g/L, agua de coco 100 ml/L, banano 60 g/l, BAP y ANA 1.75 mg/L.

En todos los ensayos para garantizar el crecimiento de los protocormos y proliferación de brotes se utilizaron frascos gerber con alícuotas de 20 ml y frascos de 150 ml con alícuotas de 30 ml de medio. El pH del medio se ajustó a 5,8 con NaOH (1N) o HCl (1N). Se solidificaron con 7,0 g/L de agar-agar y se esterilizaron a 121 ^{0}C y 1 Kg de presión durante 20 minutos. Los cultivos se incubaron en las mismas condiciones que en la fase de germinación.

Se describen los ensayos realizados con las siguientes especies:

6.4.1. Evaluación del comportamiento de protocormos de *C. mendelii* en cuatro medios de cultivo

Se transfirieron protocormos de *Cattleya mendelii* obtenidos en el medio de germinación con altura promedio de 0,8 a 1,0 cm de altura de color verde oscuro, aspecto vigoroso y con dos hojas formadas a medio MS con diferentes reguladores de crecimiento y en medio Knudson C suplementado con carbón activado.

Diseño del experimento: Para esta especie se estableció un experimento con cuatro tratamientos (medios de cultivo) con un diseño totalmente al azar. Se realizó un total de cuatro evaluaciones, el primero a los 90 días , seguido por tres evaluaciones a los 120, 150 y 180 días después de la siembra en los medios de cultivo. En cada una de las evaluaciones se consideraron dos repeticiones y 50 plantas por repetición. Se identificaron dos variables como indicadores del aporte del medio al proceso de crecimiento de las orquídeas, se tomó altura de la planta y se determinó porcentaje de formación de raíces.

Análisis de datos. Los datos en cada medio de cultivo fueron comparados por ANOVA, basado en el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fischer, con un nivel de significancia de ($p>0.05$) mediante el programa de Statgrafics.

6.4.2. Comparación del efecto de dos medios de cultivo en el estímulo radicular y desarrollo plantular de protocormos de *Trichocentrum cebolleta, Oncidium hastilabium y Mormodes buccinator* en dos medios de cultivo

Se tomaron protocormos en fases 4 y 5 , con una o más hojas , después de 90 días de sembradas las semillas con una altura aproximada entre 1,0 a 1,5 cm se colocaron en recipientes con dos medios de cultivo: M1 (KIN 0,05; ANA 0,5 mg/L); M2 (ANA 0,3; BAP mg/L).

Diseño del experimento: Para cada una de las tres especies se estableció un experimento con dos tratamientos (medios de cultivo) con un diseño totalmente al azar. Se realizó un total de cuatro evaluaciones, a los 120, 180, 210 y 240 días después de la siembra en los medios de cultivo. En cada una de las evaluaciones se consideraron dos repeticiones y 60 plantas por repetición. Se identificaron tres variables como indicadores del aporte del medio al proceso de crecimiento de las orquídeas, se tomó altura de la planta (AP), porcentaje de formación de raíces (% FR) y porcentaje de formación de pseudobulbos (% PBS)

Análisis de datos: Para cada especie de orquídea, cada repetición y variable, se calculó la suma y promedio de las plantas evaluadas. Los datos en cada medio de cultivo fueron comparados por ANOVA, basado en el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fischer mediante el programa de Statgrafics.

6.4.3. Evaluación del efecto del medio MS, reguladores de crecimiento y carbón activado sobre el desarrollo de protocormos de *Cycnoches chlorochilon* durante 210 días después de sembradas

Se tomaron protocormos del proceso germinativo después de 90 días de sembradas las semillas con una altura aproximada de 1 a 1,5 cm, se colocaron en recipientes con dos medios de cultivo: M1CA y M1SCA (Kin 0.05; ANA 0,5 mg/L); M2 CA y M2 SCA (ANA 0,3; BAP 2 mg/L). Las evaluaciones de altura de la planta , estimulación de raíces y formación de pseudobulbos se hicieron a los 120, 180 y 210 días de trasplantados. En cada evaluación se revisaron 10 recipientes con cinco plantas y dos réplicas para un total de 100 plantas por tratamiento.

Diseño del experimento: Para esta especie se estableció un experimento con cuatro tratamientos (medios de cultivo) con un diseño totalmente al azar. Se realizó un total de dos evaluaciones, a los primeros 120 días y a los 180 días después de la siembra en los medios de cultivo. En cada una de las evaluaciones se consideraron dos repeticiones y 60 plantas por repetición. Se identificaron tres variables como indicadores del aporte del medio al proceso de crecimiento de las orquídeas, se tomaron, altura de la planta (AP), porcentaje de formación de raíces (% FR) y porcentaje de formación de pseudobulbos (% PBS).

Análisis de datos: Los datos en cada medio de cultivo fueron comparados por ANOVA, basado en el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fischer, con un nivel de significancia de ($p>0.05$) mediante el programa de Statgrafics.

6.4.4. Comportamiento de protocormos de *Peristeria elata, Catasetum lucis, Epidendrum ibaguense y Prostechea fragrans* en medio MS con y sin carbón activado (CA)

Protocormos que alcanzaron una altura aproximada de 1 a 1,5 cm se colocaron en recipientes con cuatro medios de cultivo: M1 CA (carbón activado) y M1SCA (sin carbón activado): KIN 0,05; ANA 0,5 mg/L; M2 CA y M2SCA: ANA 0,3; BAP 2 mg/L. Al final del proceso se transfirieron a medio MS a la mitad de las sales para promover la estimulación de raíces.

Diseño del experimento: Para cada una de las cuatro especies se estableció un experimento con cuatro tratamientos (medios de cultivo) con un diseño totalmente al azar. Se realizó un total de tres evaluaciones, a los 120, 180 y 210 días después de la siembra en los medios de cultivo. En cada una de las evaluaciones se consideraron dos repeticiones y 60 plantas por repetición. Se identificaron tres variables como indicadores del aporte del medio al proceso de crecimiento de las orquídeas, se tomaron altura de la planta (AP), porcentaje de formación de raíces (% FR) y porcentaje de formación de pseudobulbos (% PBS)

Análisis de datos: Para cada especie de orquídea, cada repetición y variable, se calculó la suma y promedio de las plantas evaluadas. Los datos en cada medio de cultivo fueron comparados por ANOVA, basado en el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fischer, con un nivel de significancia de ($p>0,05$) mediante el programa de Statgrafics.

6.4.5. Aclimatación de las plantas. Fase *ex vitro*

El proceso de aclimatación de las vitroplantas de los géneros *C. mendelii*, *Peristeria elata, Catasetum lucis, Epidendrum ibaguense, Prostechea fragans*, *Cycnoches chlorochilon*, *Trichocentrum cebolleta, Oncidium hastilabium y Mormodes lucinatum* se llevó a cabo en un invernadero adaptado para el cultivo de orquídeas en UDES con temperatura promedio de 25 °C, humedad promedio relativa de 70 % y reducción de luminosidad del 50, 60 y 75 %. Paralelamente las especies de *Cattleya mendelii* y *Catasetum*

lucis fueron trasplantadas a una casa de malla ubicada en la finca Villa Katy Morrorico (Bucaramanga) a 1.250 msnm con temperatura promedio 28°C y reducción de luminosidad del 50 % por dos semanas.

Una vez que las plantas alcanzaron alturas en rangos de 3,5 a 5 cm o más dependiendo de las especies fueron trasplantadas a potes comunitarios en sustrato que contenía mezclas iguales de carbón vegetal, pino pátula y helecho arborescente previamente lavado y hervido en agua por 30 minutos. Las plantas se sacaron de los frascos, se lavaron con abundante agua para retirar exceso de medio y se sumergieron en solución de Ortochide de 2 g/L^{-1} durante 10 minutos antes del trasplante y unas gotas de enraizador por tres minutos. Se clasificaron por tamaños y se colocaron en papel periódico antes de realizar la siembra para ser colocados en potes comunitarios.

Las vitroplantas dispuestas en los potes comunitarios y colocadas en el invernadero de la UDES se mantuvieron cubiertas totalmente con domos plásticos para crear condiciones de cámara húmeda y sombreadas al 50 % por dos semanas para luego aumentar la luminosidad a un 60 % e ir removiendo el domo parcialmente hasta llegar a descubrirlas totalmente a las cuatro semanas y exponerlas a un 75 % de luminosidad. Durante el primer mes se regaron con *spray* cada dos o tres días con agua de tubo reposada por 24 horas. A partir de los 30 días las plántulas fueron fertilizadas semanalmente con solución MS a la mitad de concentración de las sales. Una vez adoptaron talla y aspecto vigoroso en función de la velocidad de crecimiento se trasladaron a potes individuales.

En la finca Villa Katy las plántulas se colocaron en potes comunitarios plásticos como sustrato se empleó pino pátula y carbón vegetal. En la base se colocó la tercera parte pino pátula con carbón de tamaño de 5-15 mm y en la parte superior se colocó pino de 3 a 5 mm. El pino pátula se dejó previamente en remojo durante 24 horas antes de la siembra y al carbón vegetal se le hicieron lavados con agua corriente por una hora. Se mezclaron en proporción 3:1. Los sustratos se enjuagaron con agua hirviente y unas gotas

de Hipoclorito de Sodio al 5 %. Los potes comunitarios se colocaron en un recipiente plástico transparente con tapa en casa de malla con temperatura promedio de 24 ^{0}C, reducción de luminosidad del 50 % por una semana. Se fueron destapando gradualmente hasta completar 15 días.

Se regaron con aspersión manual de manera regular a partir de la segunda semana y se empleó solución MS a la mitad de las sales cuando cumplieron 30 días de trasplantadas. Posteriormente las vitroplantas fueron transferidas a recipientes individuales con el mismo sustrato cuando mostraron mayor vigor e incrementaron su tamaño para que continuaran su desarrollo y con luminosidad del 75 %. A partir de este momento las plantas se regaron diariamente y fueron fertilizadas con solución 20-20-20 cada 15 días suplementado con Ortochide a razón de 2 g/L. Se evaluó cada semana durante el primer mes y se estimó formación de raíces (NR) y tamaño de la planta (AP) en el segundo mes. En los sitios seleccionados para la aclimatación y endurecimiento para determinar el porcentaje de sobrevivencia se tomaron 30 plántulas por especie a las cuales se les registró porcentaje de sobrevivencia, promedio de la altura (m) y número de raíces a los 60 días de trasplantadas.

7. Resultados y Análisis

Results and discussions

7.1. ESTABLECIMIENTO Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

7.1.1. Proceso de desinfección y selección de cápsulas

La aplicación del protocolo de desinfección de las cápsulas seminales cerradas en solución jabonosa y de hipoclorito de sodio al 2,5 % junto con el flameo en mechero fue eficiente para la totalidad de las cápsulas estudiadas. Resultados que coinciden con extensas fuentes bbliográficas que señalan que las semillas dentro de cápsulas aun no maduras tienen menor riesgo de aborto embrionario que cuando se desinfectan individualmente, pues se evita que sufran daños por acción directa de los desinfectantes empleados (Pierik, 1990). En la literatura se afirma que el uso de semillas inmaduras a partir de cápsulas aun verdes, desgasta menos la planta. Por lo cual, es recomendable conocer previamente los indicadores mofológicos de madurez del fruto para colectarlas sin tener que esperar a la apertura de forma natural.

El uso de cápsulas inmaduras indehiscentes como fuente de explantes primarios para la regeneración de orquídeas permitió la obtención de protocormos con potencial para producir plántulas en las especies cultivadas *in vitro*.

7.1.2. Respuestas germinativas de semillas de *Orchidaceae* cultivadas en medio MS (1962)

Los resultados del porcentaje promedio de germinación de las especies: *Rodriguezia lanceolata, Peristeria elata, Schomburgkia crispa, Oncidium sphacelatum, Oncidium hastilabium, Trichocentrum cebolleta, Encyclia cordigera, Prostechea fragrans, Epidendrum ibaguense, Cattleya trianae, Cattleya quadricolor, Cattleya mendelii, Catasetum lucis, Cycnoches chlorochilon, Mormodes buccinator, Epidendrum nocturnum, Eriopsis biloba, Sieverkingia sp, Anguloa clowessi, Acineta superba*, cultivadas en medio MS suplementado con agua de coco se pueden apreciar en la Tabla 3. Durante las tres primeras semanas de observación en todas las especies no hubo

evidencia de respuesta germinativa, pero a los 30 días de sembradas 9 (60 %) manifestaron aparición de protocormos y rizoides que alcanzaron la fase 2. Se obtuvieron porcentajes de germinación elevados cercanos al 50 % en las especies *Cattleya mendelii, Oncidium hastilabium* y *Schomburgkia crispa. En Cattleya trianae y C. quadricolor* germinaron en porcentajes un poco más bajos en este tiempo de observación respecto a *C. mendelii.* Mientras que en las especies de Peristeria *elata, Oncidium sphacelatum y Trichocentrum cebolleta* presentaron respuesta a la germinación baja con respecto a las demás a los 30 días después de la siembra.

Tabla 3. Registro del porcentaje de germinación de semillas de orquídeas cultivadas en medio MS.

	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (%) EN DÍAS		
Género	30	60	90
Rodriguezia lanceolata	30.4	60.5	80
Peristeria elata	10.5	68.5	90
Schomburgkia crispa	50.4	89.5	100
Oncidium sphacelatum	8.3	79.7	90
Oncidium hastilabium	50.5	85.8	100
T. cebolleta	13.2	89.6	100
Encyclia cordigera	--	35.5	70
Prostechea fragans	--	37.5	93
Epidendrum ibaguense	--	38.5	80
Cattleya trianae	38.4	76.3	95
Cattleya quadricolor	43.5	92.3	98
Cattleya mendelii	52.4	89.5	98
Catasetum lucis	--	60.7	80
Cycnoches chlorochilon	--	65.3	100
Mormodes buccinator	--	73.4	87
Epidendrum nocturnum	--	98.0	100
Eriopsis biloba	--	60.0	80
Sieverkingia spp	--	98.0	100
Anguloa clowessi	--	40.0	60
Acineta Superba	--	60.0	97

Las observaciones realizadas a los 30 días señalaron que todas las especies cultivadas estaban en fase de protocormo inicial o en fase de emergencia

de la primera hoja en porcentajes mayores que en la primera evaluación. Las especies que mostraron respuesta más tardía para llegar a la fase 2 del proceso germinativo fueron *Encyclia cordigera, Prosthechea fragrans, Epidendrum ibaguense* y *Anguloa clowessi* con porcentajes de germinación inferiores al 50 % a los 60 días de sembradas mientras que en *Cycnoches chlorochilon, Mormodes buccinator, Peristeria elata, Catasetum lucís, Rodriguezia lanceolata* y *Trichocentrum cebolleta* registraron porcentajes de germinación en rangos superiores al 50 %. Se apreció germinación uniforme en la mayoría de las especies y en la totalidad de las unidades experimentales hacia los 90 días de sembradas.

Se observó en *Peristeria elata* orquídea terrestre un buen índice de germinación en el medio MS a la totalidad de las sales a pesar de afirmarse que en orquídeas terrestres la germinación de semillas requiere de medios que posean concentraciones bajas de sales y por lo general un poco complejos (Pierik, 1990). De igual manera en este trabajo el uso del medio MS con carbón activado favoreció índices germinativos elevados en *Prostechea fragrans;* resultados contrarios a los hallados por Rodríguez, et al, (2007) quienes no observaron germinación en el medio MS a la mitad de concentración de sales.

En las especies de *Mormodes buccinator, Cycnoches chlorochilon* y *Catasetum lucis* se halló respuesta germinativa elevada en el medio MS; este grupo de plantas presentaron comportamientos similares en cuanto al porcentaje de germinación a los 60 días, valores que se incrementaron hacia los 90 días de sembrados, sin embargo en *C. chlorochilon* se encontró germinación en todas las unidades experimentales con dos hojas formadas y un pequeño pseudobulbo.

En cuanto a las especies *Epidendrum nocturnum* y *Sieverkingia sp* recolectadas del santuario de Virolin, presentaron también porcentajes de germinación elevados cercanos al 98 % en el medio MS en tiempos muy cortos, lo cual indica que se logró activar el potencial germinativo con los aditivos

del medio y las condiciones ambientales de incubación de temperatura y luz suministrada. Aunque la literatura reporta que en *E. nocturnum* se redujo en una semana la germinación de semillas al utilizar el medio MS con sales reducidas a la mitad y sin la adición de carbón activado como lo presentó Rodríguez et al. (2007) se muestra que el uso del medio MS a la totalidad de las sales y el carbón activado permitió alcanzar porcentajes altos de germinación en la especie, lo cual señala que este género tolera concentraciones altas y bajas de sales para inducir el proceso germinativo; además se infiere que el carbón activado no estaría interfiriendo en la captación de nutrientes ni fitorreguladores presentes en el agua de coco adicionado al medio de cultivo.

Por otro lado se apreció que en semillas de *Eriopsis biloba* hubo porcentajes de germinación más bajos a los 60 y 90 días de evaluación, lo cual permite establecer la manera como influye el genotipo en la respuesta al medio y las condiciones físicas del cultivo. Similares resultados se hallaron en *Anguloa clowessi* en donde las semillas alcanzaron valores más bajos de germinación hacia los 90 días; posiblemente para alcanzar porcentajes más efectivos sea necesario evaluar el efecto de sales y extractos vegetales que potencialicen la respuesta al medio de cultivo.

En *Sobralia uribei* se encontró respuesta al proceso germinativo a los 20 días después de la siembra en medio MS, un 43 % de las unidades experimentales se encontraba en la fase 2, aparición de protocormos en el medio. A los 40 días de sembradas se presentó emergencia y aparición de la primer hoja, se evidenció un 80 % de germinación. Los estudios de germinación asimbiótica en *S. uribei* no han sido reportados hasta el momento. Sin embargo, el presente estudio preliminar demuestra que las semillas tomadas de cápsulas indehiscentes recolectadas de su hábitat natural tuvieron un nivel de maduración adecuado por presentar semillas viables.

El uso del medio MS a la mitad de la concentración de sus sales así como la adición del extracto de banano, peptona y biotina que le confirió comple-

jidad al medio, favoreció la estimulación de la germinación con posterior formación de plántulas. El uso de biotina es esencial para la formación de clorofila y el homogenizado de plátano y peptona contienen alto contenido de vitaminas, los aminoácidos presentan un efecto estimulador en la germinación, y el crecimiento de *Paphiopedilum* también favoreció el crecimiento en *S. uribei* (Fast ,1971; Pierik et al., 1983, citado por Pierik, 1990). En este estudio se corroboró que en el cultivo *in vitro* de semillas en especies terrestres los medios con macronutrientes y micronutrientes en menores concentraciones evitan la inhibición del proceso germinativo.

Semillas de *Santanderella amadorinconiana* extraídas de cápsulas maduras tomadas de plantas que crecían en el Km 10 Vía Cúcuta en su hábitat natural y sembradas en medio MS a la mitad de sales mostraron evidencia germinativa a los 15 días de establecida la siembra en un 60 % de las unidades experimentales, a los 30 días el proceso avanzó a la fase de formación de protocormos con diferenciación de una hoja en porcentajes elevados. La concentración de macronutrientes y micronutrientes, la fuente de azúcar extraída de panela en polvo rica en sacarosa, junto con los reguladores de crecimiento presentes en el agua de coco ejercieron un efecto estimulador sobre la germinación y crecimiento de *S. amadorinconiana* al punto de garantizar uniformidad en la germinación en poco tiempo después de la siembra. Los resultados hallados en el presente estudio establecen que el medio y las condiciones de cultivo y la colecta de las semillas antes de la dehiscencia de la cápsula permitieron la germinación y desarrollo plantular en porcentajes elevados de tal manera que pueda incrementar y proteger las poblaciones de esta especie endémica de Santander con la implementación de otros trabajos .

La observación al microscopio de semillas de *S. amadorinconiana* en reposo coloreadas con KOH y Fucsina en estado de reposo extraídas de cápsulas indehiscentes antes de ser sembradas en el medio de cultivo permitieron conocer su morfología, asi se pudo identificar el embrión central grande que ocupa casi toda el espacio, con una escasa cubierta delgada y transparente

como se aprecia en la Figura 21. El uso del colorante Fuscina permitió teñir la cubierta de la semilla y corroborar que es reticulada.

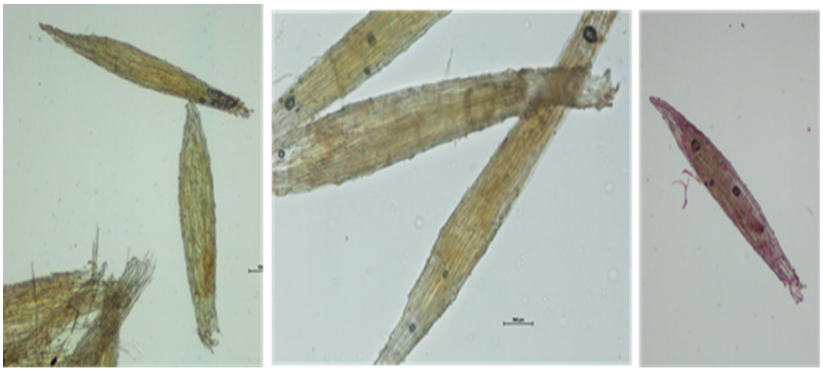

Figura 21. Observación de semillas de *Santanderella amadorinconiana* P. Ortiz.
En reposo con embrión central delgado no diferenciado, sin cotiledones con testa traslúcida.
Tinción con KOH y Fucsina. Valor de la escala 100 µm.
Fuente: LIIBAAM-Grupo Microbiota (2015)

7.1.2.1. Estructura de semillas de Cattleya mendelii. Descripción del proceso germinativo

Las semillas de *Cattleya mendelii* forman parte del grupo mayoritario de orquídeas, caracterizadas por ser indiferenciadas, carecer de cotiledones y endospermo (Harley 1951, citado por Wehner et al. 2002). Maheshwari & Narayanaswami, 1952. En algunos casos los embriones se encuentran unidos a la cubierta por una fina hebra de células, que permanecen en él, una vez este se desprende de la cubierta. Tienen células isodiamétricas y consta de diez células con gránulos citoplasmáticos densos con núcleos conspicuos (Scott & Arditti, 1959, citados por Wing-Yam & Arditti, 2009). Una vez el embrión se desprende de la cubierta se aprecian dos regiones: la posterior con células grandes y vacuoladas y la región anterior con células pequeñas, a partir de las cuales se desarrollará el meristemo apical de las futuras plántulas. El suspensor consta de células muertas, se asocia con la parte posterior y final del embrión en una larga elongación.

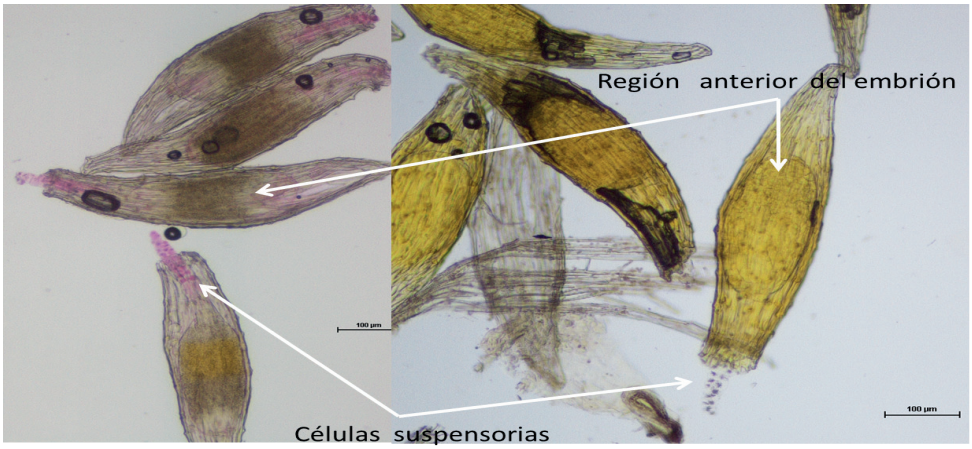

Figura 22. Estructura de semillas de *Cattleya mendelii* coloreada con Fucsina y KOH
Se diferencia la cubierta transparente de la semilla, posición cetral del embrion con células isodiamétricas con núcleos y las células suspensorias en la región posterior
Fuente: LIIBAAM-Grupo Microbiota (2015)

En la Figura 22 se puede ver la estructura de las semillas de *C. mendelii* coloreadas con Fucsina y KOH, la cubierta de aspecto reticular de la testa constituida de material membranoso intercalado de paredes gruesas y traslúcido. Embrión globular en posición central con células isodiamétricas y núcleo central. En la región posterior células suspensorias interconectadas al embrión.

El seguimiento microscópico realizado a la germinación y desarrollo de protocormos en semillas de *Cattleya mendelii* durante los primeros 30 días después de la siembra (dds). Semillas en fase O en reposo (Figura 23 A-B); se aprecia hinchamiento del embrión ocasionado por la absorción de agua tomada del medio a los 8 días después de la siembra (Figura 23B); rompimiento de la testa por parte del embrión 15 días posteriores a la siembra (Figura 23D).

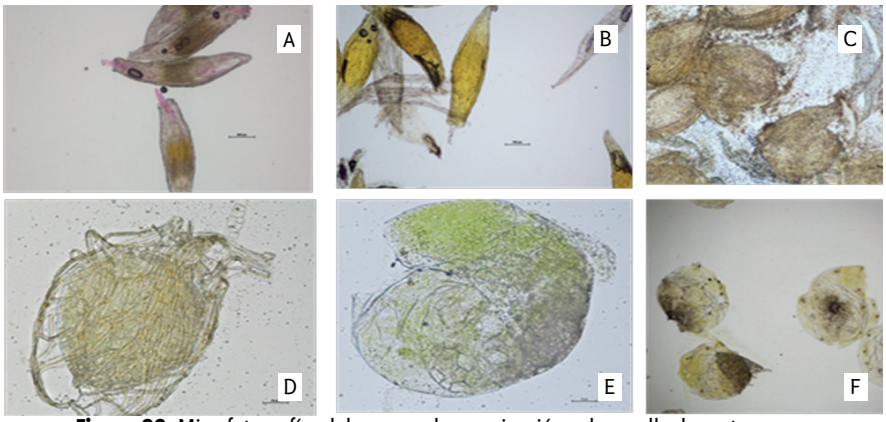

Figura 23. Microfotografías del proceso de germinación y desarrollo de protocormos de *Cattleya mendelii* en microscopio óptico.
A y B. Semillas en fase 0 coloreadas con fucsina y KOH (10 X) C. Semilla en fase de Imbibición (10 X). D. Germinación rompimiento testa (20 X) E. Protocormo inicios de fotosíntesis (20 X) F. Formación de primordios foliares (10 X). Escala 100 µm
Fuente: LIIBAAM-Grupo Microbiota (2015)

Posteriormente la formación del protocormo inicial con un complejo de células verde pálido señala actividad fotosintética como respuesta al estímulo lumínico a los 21 días (Figura 23E); aparición del primordio foliar a los 30 días del cultivo *in vitro* (Figura 23F), resultados descritos previamente por Arditti (1993).

Las observaciones realizadas en el estéreo microscopio se aprecian en la Figura 24; se evidencia el embrión en reposo (Figura 24a). Etapa de imbibición a los 15 días de sembradas (Figura 24b) Hacia los treinta días ya es notorio que en los agregados celulares hay esbozos de diferenciación de meristemo del vástago y rizoides en el lado opuesto (Figura 24 d-e) de color verdoso relacionado con el poder fotosintético en la masa protocórmica desde estadios tempranos.

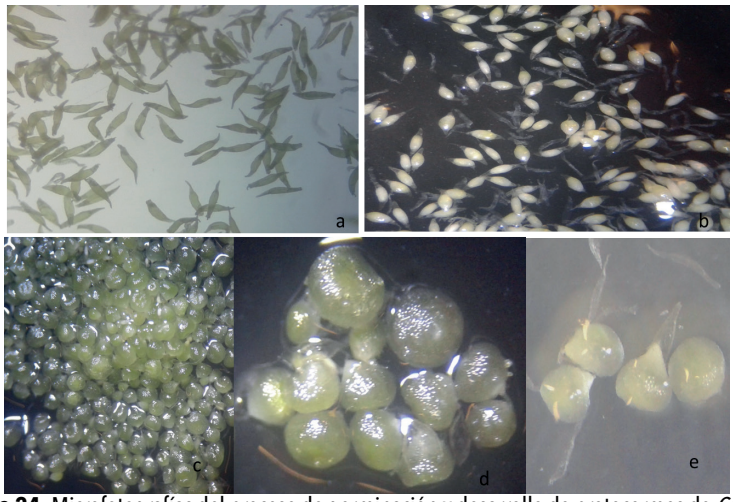

Figura 24. Microfotografías del proceso de germinación y desarrollo de protocormos de *Cattleya mendelii* en estereomicroscopio Nikon c leds.
A. Semillas en fase O.B. En inbibición fase 1 (15 días) C, D y E. Diderenciación de primordios foliares y rizoides (30 días).
Fuente: LIIBAAM-Grupo Microbiota (2015)

Detalle macroscópico del proceso de diferenciación y formación de brotes foliares y caulinares a partir de masas protocórmicas hasta la aparición de hojas correspondientes a la fase 4 (Figura 25).

Figura 25. Detalle de protocormos de *Cattleya mendelii* en proceso germinativo a los 60 días de sembradas en medio MS.
Diferenciación primera hoja (fase 3); emergencia de la primera y segunda hojas (fase 4)
Fuente: Contreras (2015)

En los recipientes de cultivo se apreció la diferenciación a protocormos tempranos con el cambio de color de las semillas de beige a verde. El tamaño

de los protocormos y la evidencia de la actividad fotosintética se aumentó gradualmente después de 60 días de la siembra (Fig. 26).

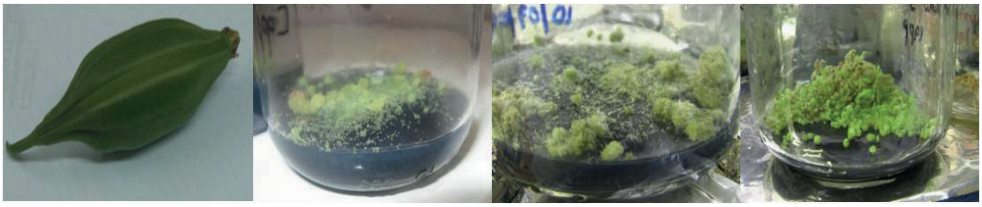

Figura 26. Proceso de germinación de *Cattleya mendelii* a los 60 días de sembrada. Cápsula, semillas con protocornos iniciales, protocormos con diferenciación de la primera hoja
Fuente: Cáceres (2014)

7.1.2.2. Estructura de semillas de Sobralia uribei. Descripción del proceso germinativo

Las observaciones microscópicas de las semillas *en Sobralia uribei* muestran una cubierta reticulada de paredes gruesas y traslúcidas, de forma elíptica con embrión central globular grande con células isodiametricas voluminosas (Figura 27b-c). En la parte superior se apreciaron semillas con embrión retraído, la estructura conspicua de la cubierta constituida por la distribución desigual de la celulosa y la lignina descrita desde 1940 por Arditti (1967), citado por Pierik (1990).

Las semillas observadas a los 15 días de sembradas en el medio MS a la mitad de las sales mostraron también una hilera de células suspensorias en la parte posterior, las cuales permanecieron aún después del rompimiento de la cubierta durante la imbibición y durante la etapa de protocormo temprano, como se aprecia en la Figura 28; en los recipientes se hizo evidente la aparición de plántulas a partir de protocormos con diferenciación de una a dos hojas (Figura 29).

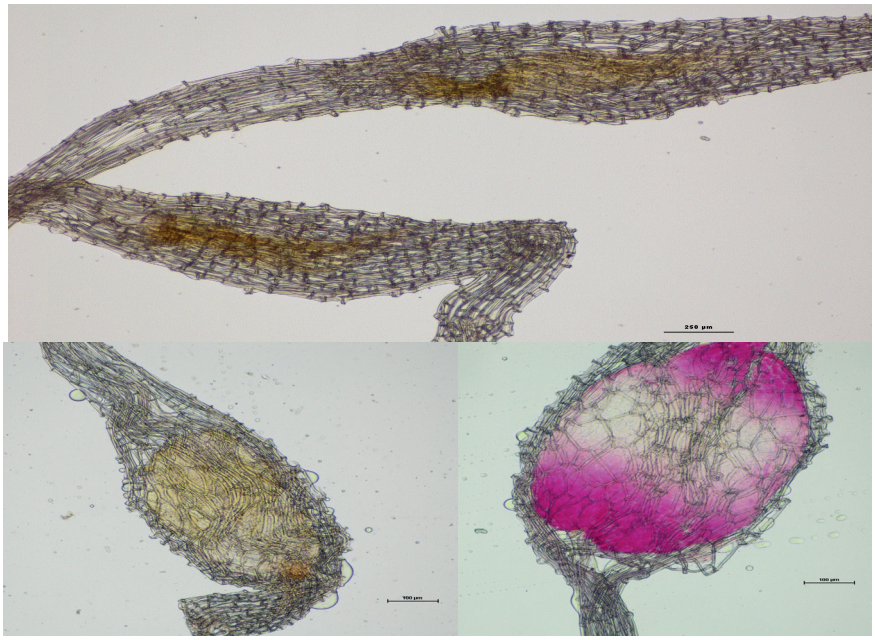

Figura27. Estructura de las semillas de Sobralia uribei.
Arriba se resalta la posición y forma del embrión, cubierta reticulada. Abajo: Semillas viables en reposo coloreadas con KOH y Fucsina Objetivo 10 X Escala 100 µm
Fuente: LIIBAAM-Grupo Microbiota (2015)

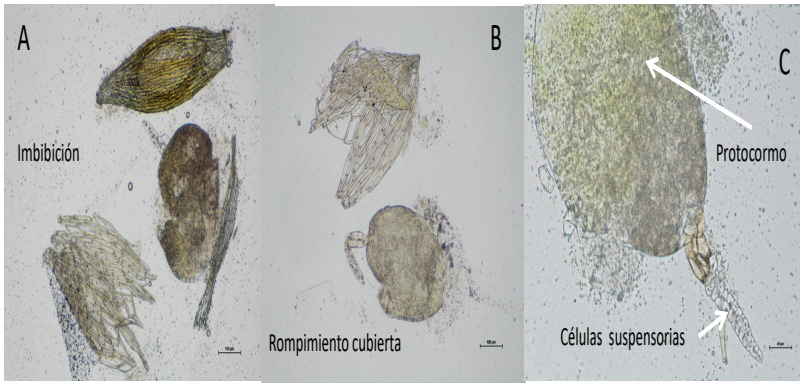

Figura 28. Germinación e imbibición en *Sobralia uribei* en microscopio óptico Nikon eclipse Ni.
A. Semilla en fase de Imbibición (10 X) a los 15 días de sembradas. B-C. Rompimiento de la cubierta (10 X). Protocormo inicial en fotosíntesis (20 X). Escala 100 µm
Fuente: LIIBAAM-Grupo Microbiota (2015)

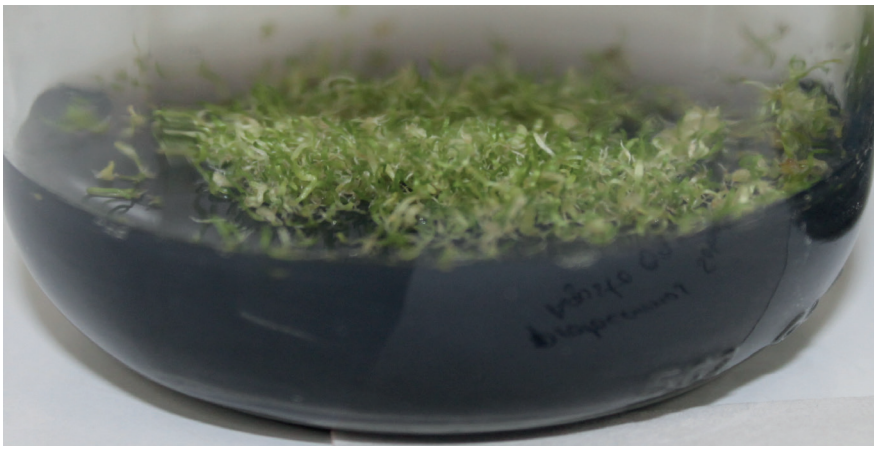

Figura 29. Diferenciación de plántulas a partir de protocormos de *Sobralia uribei* después de 60 días de sembradas en medio MS a la mitad de sales.
Fuente: Cáceres, H (2015)

7.1.2.3 Discusión de resultados del proceso germinativo

De acuerdo a los resultados encontrados en el presente estudio con respecto al comportamiento germinativo, se puede establecer que el medio MS suplementado con agua de coco y carbón activado favoreció la germinación de las semillas de las orquídeas de hábitos epífitos y una terrestre en porcentajes elevados. El uso de carbón activado en el medio contrarrestó la fenolización y permitió avanzar en las diferentes fases del proceso germinativo de las semillas establecidas. Hubo germinación en porcentajes superiores al 50 % en las especies cultivadas, resultados que coinciden con lo expresado por George, 1996, citado por Rodríguez, 2005 quien señaló que usualmente se presentan valores porcentuales altos mayores al 50 % de germinación en orquídeas epífitas cultivadas en medio asimbiótico.

La aparición de estructuras verdosas en la superficie del medio se presentó en la mayoría de las especies entre 30 a 40 días después de la siembra, sin embargo también se hallaron especies con respuesta germinativa después de los 60 días como lo afirmaron Lee y Lee (1991, citado por Ávila y Salgado, 2006). Se considera que la variabilidad en la respuesta en cuanto al tiempo

de germinación puede estar relacionado con diversos factores entre ellos madurez de la cápsula o el genotipo propio de cada especie (McKendrick, 2000) quienes encontraron que los tiempos de germinación en las especies sembradas fueron muy varibales entre 6 a 40 semanas.

El medio Murashige y Skoog (1962) sin reguladores de crecimiento y con diferentes concentraciones de sales ha sido empleado por diversos investigadores para cultivar diferentes semillas de orquídeas, y ha demostrado ser más eficiente para que ocurra germinación por su alto contenido en sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, el cual brinda cantidades de nitrógeno y potasio necesario para su adecuada nutrición (Salazar-Mercado, 2012). Así Aguilar-Morales y López-Escamilla (2013) hallaron respuestas diferentes al estímulo germinativo dependiendo de la concentración de sales y sin suplementos al colocar semillas de *Laelia spaciosa* en cuatro medios de cultivo MS y Knudson C(KC) al 50 y 100 % de sus componentes. En el medio MS al 50 % la germinación se evidenció a los 10 días, mientras que el medio MS al 100 % se manifestó a los 16 días; en el medio Knudson se presentó germinación a los 114 y 178 días al 50 y 100 % de sus sales respectivamente.

Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia (2006) encontraron que el medio óptimo de germinación en *Laelia speciosa* fue el MS sin reguladores de crecimiento y seis años después obtuvieron el 100 % de germinación en *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Euchile citrina, Epidendrum radicans*, *Laelia albida, Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Oncidium tigrinum* y *Oncidium cavendishianum*. Cada especie reportó variación en el momento de la germinación, pero estuvo en los rangos entre 30 a 45 días. También en *Euchile mariae y Encyclia adenocaula* se evidenció germinación efectiva a los 15 y 27 días de sembradas en el medio MS (Suárez-Quijada, Hernández-Altamirano, Chávez-Ávila, Sandoval-Zapotitla, & Martínez-Palacios, 2007).

En algunos géneros se ha podido establecer que la adición tanto de extractos vegetales como el agua de coco, jugo de tomate o de piña o reguladores

de crecimiento incrementan la efectividad y velocidad de germinación . El género *Cattleya* precisa de medios complejos como el MS para la germinación (Singh, 1993), lo cual fue comprobado por Salazar-Mercado (2012), quien con la adición de extractos naturales al medio basal MS incrementó la germinación de semillas de *C. mendelii*. En el estudio empleó cuatro medios de cultivo: MS, MS +JP (jugo de piña); MS+AC (agua de coco); MS+AIA; MS+AG3 y encontró que los medios MS suplementados con agua de coco y jugo de piña fueron más eficientes en la germinación asimbiótica y desarrollo de plántulas en donde se emplearon reguladores de crecimiento. La investigación realizada por Ávila y Salgado (2006) demostró que la adición de dosis bajas de BA (0.05 mg /L) al medio MS aceleró e hizo homogéneo el proceso de germinación en varias especies de orquídeas silvestres del estado de México.

Ha sido ampliamente demostrado que existen diferentes necesidades de nutrientes minerales para la germinación de semillas y desarrollo plantular dependiendo de cada especie, algunas de ellas pueden crecer muy bien en medios simples como el Knudson C. En el estudio realizado por Rodríguez (2005) de 21 especies evaluadas en los medios MS (50 %) de sales, Knudson C, Vancin-Went y Morel suplementados con agua de coco (10 %) y sacarosa (2 %) con y sin carbón activado encontraron que todas las especies fueron muy específicas en cuanto al tipo de sal y presentaron comportamientos variables frente a la presencia o ausencia de carbón activado. Por ejemplo resaltaron que tres especies germinaron en los medios independientemente de la presencia o ausencia de carbón activado; mientras que *Encyclia phoeniceae, Polystachya foliosa, Schomburgkia lyonsii* y *Phaius tankervilleae* fueron muy específicas en cuanto al tipo de sal para alcanzar la germinación en presencia de carbón activado.

De igual manera Chávez, Mosquera y Ospina (2015) con el propósito de comparar la germinación simbiótica y asimbiótica de *Comparettia falcata* emplearon los medios Knudson y MS para seleccionar el más adecuado para la germinación asimbiótica; encontraron que el medio Knudson fue

marcadamente superior en la respuesta germinativa en *C. falcata* que en MS (Surenciski, *et al*. 2012) al evaluar la germinación en *Cyrtopodium hatschbacii* en diferentes medios basales suplementados con carbón activado y puré de banana solos o combinados encontraron que en el medio MS diluido a la mitad de las sales y sin puré de banano favoreció el proceso germinativo en un 50 %. Resultados similares hallaron Flores-Escobar *et al*., (2008), quienes al adicionar extractos naturales al medio MS verificaron la influencia que estos ejercieron en la respuesta germinativa temprana y diferenciación de primordios foliares en *Oncidium stramineum* en tan solo 17 días después de la siembra de las semillas.

El trabajo de Salazar y Mercado (2012) al evaluar la germinación asimbiótica y formación de plántulas en *Prosthechea vespa* Vell. y *Sobralia klotzscheana* Rchb.f. en medio (MS) con dos suplementos orgánicos (jugo de piña y agua de coco) hallaron que la adición del jugo de piña tuvo mejor efecto en las fases del desarrollo de las especies comparado con las sembradas en el medio MS suplementado con agua de coco, mientras que en otro estudio se apreció que el medio MS a la mitad de la concentración de sus sales fue eficiente para la germinación de *Oncidium longicornu* y *O. bifolium* a los 49 días después de la siembra cuando fueron desinfectadas las semillas con hipoclorito de sodio al 0,5 % (Billard, Dalzotto & Lallana, 2014). En cuanto a la especificidad de las especies hacia un tipo de medio para incrementar la germinación ha sido también demostrado por Bakar *et al.* (2014), quienes encontraron germinación elevada a los 60 días con producción de protocormos maduros en *Dimorphics lowii* en los medios VW y MS, pero no así en el medio KC. Las respuestas podrían estar relacionadas con la disponibilidad de nutrientes y la concentración de los elementos mayores. Los medios KC y VW se consideran medios simples, mientras que el medio MS es categorizado como complejo. Presentan diferencias en la fuente de nitrógeno, en los medios VM y KC contienen amonio y nitrato, mientras que MS contiene fuente inorgánica (amonio y nitrato) y fuente orgánica (Glicina). Los autores afirman que el nitrógeno es importante para el desarrollo de las paredes celulares y la ausencia del ion de nitrógeno puede inhibir el crecimiento

de semillas. El nitrógeno inorgánico podría reducir la rata de germinación debido al decrecimiento de la actividad de la enzima nitrato reductasa. El nitrógeno en forma de amonio ha mostrado ser más efectivo en la germinación de semillas de orquídeas comparado con el nitrato y el nitrito (Suzuki, Moreira, Pescador & de Melo Ferreira, 2012).

Por lo tanto, se estableció que bajas concentraciones de nitrógeno favorecieron la germinación y desarrollo saludable asociado también a la presencia de magnesio y potasio en el medio; como también los iones inorgánicos, fuente de nitrógeno, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, vitaminas, sucrosa y hormonas vegetales del agua de coco (Goh, 1981). A manera de conclusión, la germinación asimbiótica para especies silvestres con fines de incrementar poblaciones y reintroducirlas a su hábitat natural, precisa de estudios detallados relacionados con madurez de las cápsulas, viabilidad de semillas, requerimientos nutricionales y selección de suplementos orgánicos o fitohormonas.

En esta experiencia se encontró que la adición del carbón activado y agua de coco al medio MS permitió potencializar la germinación de las semillas estudiadas tanto epífitas como terrestres de manera semejante a los resultados hallados por Salazar-Mercado,(2012) y sugerir además el medio nutricional apropiado para *Sobralia uribei* y *Santanderella amadorinconiana*.

7.2. RESPUESTA DE LOS PROTOCORMOS EN MEDIO DE PROLIFERACIÓN

7.2.1. Evaluación del comportamiento de protocormos de *Cattleya mendelii* en cuatro medios de cultivo

Protocormos de 0,8 a 1,0 cm de *Cattleya mendelii* después de 90 días de sembrados en medio MS sin reguladores de crecimiento fueron recultivados en medio MS y Knudson C suplementado con agua de coco, carbón activado, reguladores de crecimiento tipo auxinas (ANA, AIA, AIB) y citoquininas (BAP, KIN) y GA3. Los tratamientos contemplaron cuatro medios: **MC:**

0,3 mg/l AIA; 1,75 mg/l de AIB; 1,75 mg/l KIN; **MB:** 0,1 mg/l ANA; 0,5mg/l BAP; **MA:** 0,18 mg/l ANA, 0,22 mg/l KIN, 0,33 mg/l GA3; medio Knudson C **KC:** peptona 2g/L, agua de coco 100 ml/L, banano 60 g/l, BAP y ANA 1,75 mg/l. Las formulaciones seleccionadas permitieron comparar y evaluar el efecto ejercido sobre el tamaño y formación de raíces de las plantas de *C. mendelli*. El crecimiento de los protocormos hacia plántulas se examinó durante 180 días de recultivados a estos nuevos medios donde se pudo establecer un protocolo de crecimiento *in vitro* eficiente para obtener plantas vigorosas de *C. mendelii* aptas para ser trasplantadas a sustrato como aporte a implementar propagación masiva de esta especie para su protección.

Los resultados del efecto que ejercieron los medios sobre la altura de las plántulas de *C. mendelii* se aprecian en la Tabla 4. No se presentaron diferencias significativas *($P \leq 0,05$)* durante los 180 días de observación dado que hubo valores semejantes entre las medias resultantes; se infiere que las formulaciones empleadas ocasionaron un crecimiento homogéneo durante el tiempo de permanencia *in vitro.* Sin embargo, se aprecia que en el medio MC se presentó una media mayor con un valor de 2,65±0,098 y la más baja se presentó en el medio MA 2,175± 0,083.

Al examinar la variación del tamaño de las plantas en los cuatro tratamientos se presentaron diferencias significativas durante las cuatro observaciones realizadas: los minerales empleados y en las concentraciones seleccionadas, el agua de coco, reguladores de crecimiento y el uso de carbón activado fueron eficientes para incrementar la actividad mitótica de los brotes formados, como se puede evidenciar (Figura 30).

En cuanto al porcentaje de formación de raíces no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos empleados durante la etapa de desarrollo plantular (Tabla 5); sin embargo en el medio MK, la media obtenida presentó los valores más altos 46,25±0,402, con respecto a los demás tratamientos, lo cual indica que el medio Knudson estaría favoreciendo en esta especie una proliferación de brotes radiculares con mayor facilidad, probablemente

por las dosis bajas de sales que se manejan y la media más baja se halló en el medio MA (Figura 31).

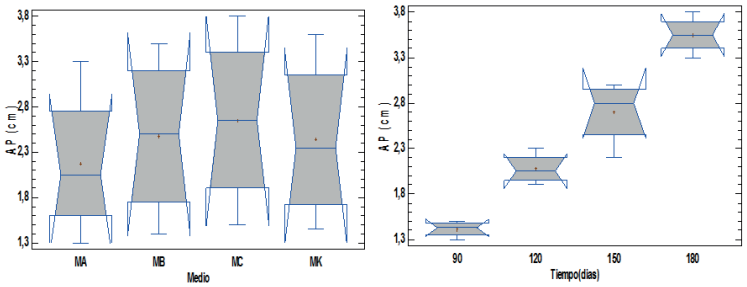

Figura 30. Efecto del tiempo y el medio de cultivo sobre el crecimiento de *C. mendelii*

Tabla 4. Efecto de la composición del medio y del tiempo en la formación de raíces en *C. mendelii*

FORMACIÓN DE RAÍZ* MEDIO					
MEDIO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
MA	36,25±0,36	18,8323	0,06	0,9791	X
MB	42±0,342	18,8323			X
MC	37±0,394	18,8323			X
MK	46,25±0,40	18,8323			X
FORMACIÓN DE RAÍZ* TIEMPO					
TIEMPO (DIAS)	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
90	1,25±0,025	4,0013	85,97	0,0000	X
120	20±0,081	4,0013			X
150	55,7±0,126	4,0013			X
180	84,5±0,049	4,0013			X

En cuanto a la formación de raíces en los cuatro medios a lo largo de las observaciones se apreciaron diferencias significativas, se evidenció formación temprana de raíces desde los 90 días de recultivados los protocormos y se fueron incrementando de manera proporcional al tamaño de las plantas (Figura 32).

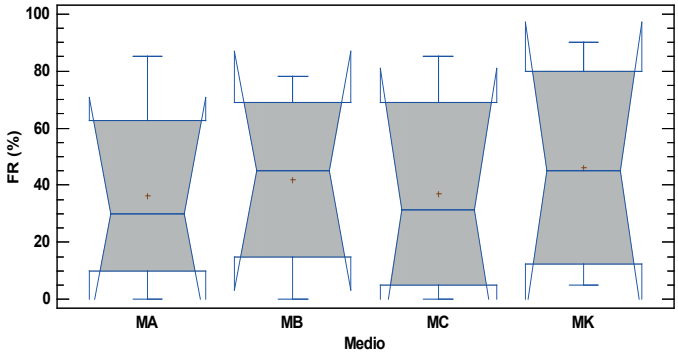

Figura 31. Representación gráfica del porcentaje de formación de raíces en plántulas de *C. mendelli* en diferentes medios de cultivo a través del tiempo

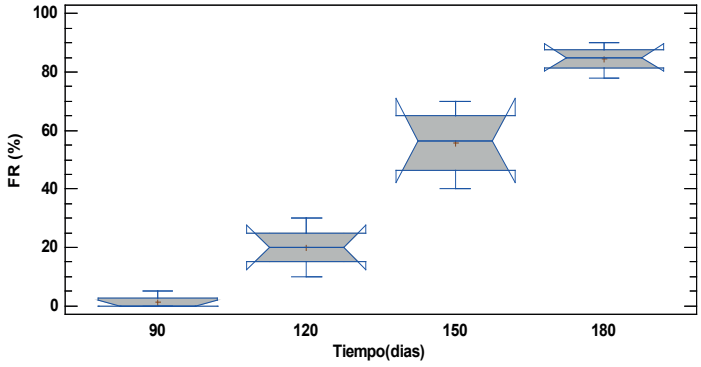

Figura 32. Efecto del tiempo y el medio de cultivo sobre la formación de raíces en *C. mendelii*

De acuerdo a lo anterior con el registro fotográfico (Figura 33) se pudo determinar que los tratamientos empleados permitieron el desarrollo de las plantas a partir de la siembra de semillas hasta la formación de protocormos vigorosos, con el posterior incremento de brotes verdes, elongación de hojas y formación de raíces.

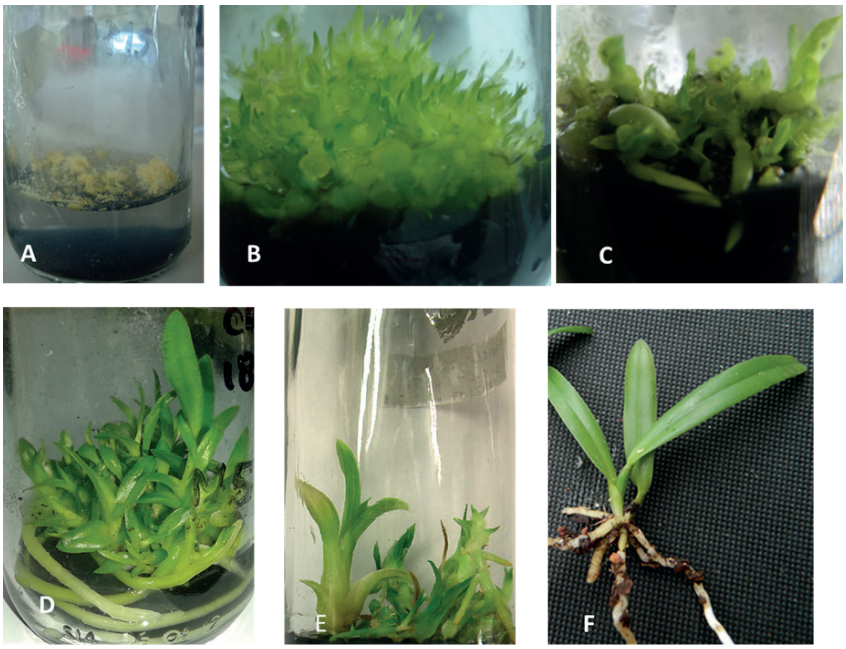

Figura 33. Proceso del crecimiento plantular en medios MS y MK.
A. Semillas B. Protocormos C-D-E. Desarrollo de brotes aumento de tamaño.
F. Planta desarrollada con raíces

A pesar de que la primera propagación exitosa de orquídeas *in vitro* fue lograda por Knudson en 1922 con especies de *Cattleya* y *Laelia* en agar y pocos minerales, en la actualidad la propagación de *C. mendelii* no tiene un medio específico que resulte ser el más adecuado para su desarrollo, ya que realizan diversos ensayos en donde se varían concentraciones de sales, uso de reguladores y extractos vegetales para potencializar el rendimiento proliferativo, así como sucede para otras especies. En el presente estudio se vio favorecido el desarrollo de brotes vigorosos verdes de *C. mendelii* con buena formación de raíces a partir de protocormos en el medio Knudson y MK caracterizado por tener concentración de macro y micronutrientes más bajos que en el medio MS, así como la presencia de peptona, agua de coco, extracto de banano y ANA y BAP con concentración de 1,75 mg/l fueron esenciales para promover el crecimiento de las plántulas, observaciones que concuerdan con las reportadas por Damon *et al*. (2004) en *Cattleya aurantiaca*.

Sin embargo, la formación de brotes radiculares y foliares, así como el incremento de altura de las plantas de *C. mendelii* en el medio MS en los tratamientos con combinaciones de auxinas y citoquininas, con agua de coco también se vieron favorecidos.

Los resultados de este trabajo indican que cada medio de cultivo presentó ventajas para el crecimiento de *C. mendelii* y se puede recomendar el medio KC modificado y MS adicionado con agua de coco, BAP, ANA, KIN, AIA, AIB y AG3 para el desarrollo de plantas aptas para el trasplante.

Varios factores pueden influenciar el enraizamiento y elongación de las plantas, entre ellos la concentración de sales en el medio MS, el tipo de auxinas y citoquininas, la concentración de sacarosa así como la intensidad de la luminosidad. En este estudio la elongación de las plantas cultivadas en medio MC adicionadas con 0,3 mg/L de AIA; 1,75 mg/l de AIB y KIN y agua de coco promovió plantas de mayor altura. La mezcla de hormonas en el medio MA con concentraciones más bajas 0,8 mg/l ANA, 0,22 mg/l de KIN y 0,33 mg/l de GA3 y el medio MB con 0,1 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de BAP no resultaron ser tan efectivas en el incremento de la altura de las plántulas de *C. mendelii.*

El estímulo de raíces se apreció en mayor porcentaje en los medios Knudson y MC con dosis de 1,75 mg/L de ANA y BAP y 1,75 mg /L de KIN y AIB respectivamente. La adición de dosis altas de auxinas y citoquininas al medio de cultivo favorecen la inducción y desarrollo de tallos y yemas. Las presencia de citoquininas es fundamental para desencadenar el proceso de división celular (Cañas, 1993; Perea, 2001).

Lo anterior contrasta con los resultados hallados por Dewir, El-Mahrouk, Murthy y Paek (2015), quienes encontraron que el enraizamiento *in vitro* en el género C*attleya* estuvo influenciado por la concentración de sales del medio MS, la adición de 2,4 mg/L de IBA y 3 % de sucrosa, con alta inten-

sidad de luz (60 PPFD). El medio MS a la mitad de sales favoreció plantas con mayor número de brotes, hojas y raíces, altura y peso fresco superior junto con porcentajes elevados de aclimatación.

Por el contrario, De la Barrera, Díaz Álvarez, Torres-Galeano y Rojas-Cortés (2015) encontraron que en *C. mendelli y C. quadricolor,* se vio favorecido el desarrollo plantular en el medio MS con dosis de 0,5 µM de AG3 y 1,5 µM de NAA; el número de raíces también se incrementó en medio MS con 0,5 µM GA3 y 1,0 µM NAA. En el medio KC se presentó menor longitud de raíces que en medio MS, mientras que en el medio MS fue mejor en las dos especies y en todos los tratamientos para las variables consideradas.

Por lo anterior para la propagación exitosa de *C. mendelii* el medio MS es recomendable para considerarlo en programas de conservación, por la enorme importancia ecológica y económica que presenta la especie a nivel regional y nacional.

7.2.2. Comparación del efecto de dos medios de cultivo en el estímulo radicular y desarrollo plantular de protocormos de *Trichocentrum cebolleta, Oncidium hastilabium y Mormodes buccinator*

Protocormos de *Trichocentrum cebolleta, Oncidium hastilabium y Mormodes buccinator* de aproximadamente 90 días después de sembrados en medio MS sin reguladores de crecimiento con dos o tres hojas, fueron recultivados a medio MS en presencia de agua de coco, carbón activado y reguladores de crecimiento a fin de evaluar el desarrollo plantular durante un tiempo de 240 días. Se logró establecer un protocolo de crecimiento *in vitro* para estas especies en medio MS obteniendo un elevado número de plántulas a los 8 meses con la finalidad que sea reproducible en programas de conservación.

Así la formación de brotes, incremento del tamaño de la planta, estimulación de raíces y formación de pseudobulbos especialmente en *M. buccinator* fue

obtenido al utilizar medio MS a la totalidad de las sales suplementado con agua de coco, carbón activado reguladores de crecimiento tales como ANA, BA y KIN (M1: Kin 0,05- ANA 0,5 mg/L y M2: ANA 0,3-BAP 2 mg/L).

Tabla 5. Efecto del medio y tiempo sobre la formación de raíces en *M. buccinator, T. cebolleta* y *O. hastilabium*

FORMACIÓN DE RAÍCES* ESPECIE					
ESPECIE	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M. buccinator	33,125±0,23	0,0675892			X
T. cebolleta	37,625±0,16	0,0675892	0,48	0,6247	X
O. hastilabium	42,5±0,162	0,0675892			X
FORMACIÓN DE RAÍCES* TIEMPO					
TIEMPO (DÍAS)	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
120	14,66±0,087	0,0377381			X
180	32,5±0,072	0,0377381	24,64	0,0000	X
210	45,16±0,10	0,0377381			X
240	58,66±0,186	0,0377381			X
FORMACIÓN DE RAÍCES*MEDIO					
MEDIO	PROMEDIO	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M1	39,66±0,188	0,0548356	0,24	0,626	X
M2	35,83±0,190	0,0548356			X

En la Tabla 5 se muestran el efecto del medio y el tiempo sobre la formación de raíces en las tres especies; no se apreciaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), sin embargo, para *O. hastilabium* se obtuvo una media de 42,5±0,162 que señala un comportamiento ligeramente mayor para el estímulo radicular.

En cuanto a la formación de raíces en las tres especies y en los dos medios durante los cuatro tiempos de observación se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$); fue evidente el incremento del porcentaje de raíces a medida que crecían las plántulas y se volvían más vigorosas. No se presen-

taron diferencias significativas (P ≤,0.05) entre el medio empleado con respecto al porcentaje de formación de raíces durante el tiempo de crecimiento plantular. Sin embargo en el medio M1 hubo un porcentaje ligeramente mayor que en el medio M2. Los dos medios empleados pueden ser utilizados para estimular formación de raíces en las tres especies.

Tabla 6. Efecto del medio y el tiempo en la altura de la planta de *M. buccinator, T. cebolleta* y *O. hastilabium*

ALTURA DE LA PLANTA*ESPECIE					
ESPECIE	PROMEDIO	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M. buccinator	4,325±0,015	0,0585675			X
T. cebolleta	4,656±0,013	0,0585675	0,6	0,5606	X
O. hastilabium	3,812±0,017	0,0585675			X
ALTURA DE LA PLANTA*TIEMPO					
TIEMPO (DÍAS)	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
120	2,59±0,735	0,0237488			X
180	3,556±0,754	0,0237488	46,44	0,0000	X
210	4,527±0,476	0,0237488			X
240	6,383±0,58	0,0237488			X
ALTURA DE LA PLANTA*MEDIO					
MEDIO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M1	4,345±0,152	0,0451241	0,06	0,8014	X
M2	4,183±0,159	0,0451241			X

Con respecto al incremento del tamaño de las plántulas no se apreciaron diferencias significativas (P≤ 0,05) entre las especies estudiadas en los dos tratamientos y el tiempo de observación (Ver Tabla 6).

No obstante se encontraron diferencias significativas en el incremento del tamaño de las plantas durante el tiempo de observación, hallándose a los 240 días las mayores longitudes en las vitroplantas de las tres especies. En cuanto a la altura promedio alcanzada por las plantas y el tipo de medio ensayado tampoco se presentaron diferencias significativas (P≤ 0,05) en las especies, lo que permite inferir que los dos medios de cultivo pueden

ser utilizados para estimular el crecimiento plantular de *M. buccinator*, *T. cebolleta y O. hastilabium.*

Tabla 7. Efecto del medio y tiempo en la formación de pseudobulbos sobre *M. buccinator, T. cebolleta y O. hastilabium*

PSEUDOBULBO*ESPECIE					
ESPECIE	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M. buccinator	61,25±0,378	0,07399	3,75	0,0396	X
T. cebolleta	0	0,07399			X
O. hastilabium	1,125±0,031	0,07399			X
PSEUDOBULBO*TIEMPO					
TIEMPO (DÍAS)	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
120	4,166±0,102	0,0148603	0,81	0,5041	X
180	16±0,25	0,0148603			X
210	29,666±0,43	0,0148603			X
240	33,333±0,516	0,0148603			X
PSEUDOBULBO*MEDIO					
MEDIO	PROMEDIO	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M1	20,83±0,386	0,0106087	0,0	0,9956	X
M2	20,75±0,347	0,0106087			X

En la Tabla 7 se puede apreciar la formación de pseudobulbos (PBS) en las tres especies; se hallaron diferencias altamente significativas (P≤0,05) durante el tiempo de crecimiento, siendo *M. buccinator* la especie que obtuvo una media mayor (61,25±0,378) comparada con *O. hastilabium* (1,125±0,031), lo cual indicó tener mayor predisposición a expresar el pseudobulbo durante el crecimiento *in vitro,* mientras que en *O. hastilabium* se apreció menor cantidad de pseudobulbos. Sin embargo en las plántulas de *T. cebolleta* no diferenciaron pseudobulbos a lo largo del crecimiento *in vitro*.

En cuanto al efecto del tiempo sobre la formación de PBS no se presentaron diferencias significativas (P≤0,05), pues se apreció que estos se fueron diferenciando progresivamente durante el avance de crecimiento plantular.

Al examinar el efecto del medio en la formación de PBS tampoco se presentaron diferencias significativas, dado que independientemente de los estímulos hormonales y nutrientes presentes en el medio, la diferenciación de PBS se evidenció claramente en el estudio en los dos medios ensayados como se aprecia en la Tabla 7. La formación de pseudobulbos no ha sido un parámetro considerado como variable respuesta en estudios de crecimiento *in vitro* en determinadas especies, sin embargo en este estudio para *Mormodes buccinator* se hicieron notorios desde los 120 días después de la siembra en medios de proliferación plantular el efecto interactivo entre los factores raíces (FR), altura de la planta (AP) y formación de pseudobulbos (PSB) con los dos medios ensayados se presentan en la Figura 34.

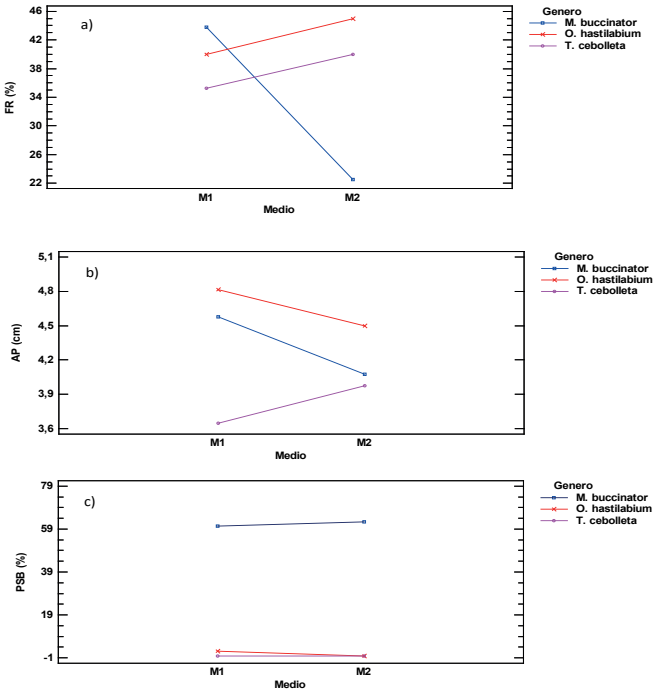

Figura 34. Efecto interactivo del medio sobre el porcentaje de formación de raíces (FR%); AP (cm) y formación de PBS en *T. cebolleta, O. hastilabium y M. buccinator* durante el desarrollo plantular

Para *M. buccinator* se propició un mayor estímulo radicular en el medio M1, mientras que en *T. cebolleta* y O. *hastilabium* el desarrollo del sistema

radical se presentó en porcentajes altos en el medio M2 (Figura 33A) con diferencias significativas (P≤0,05) entre el medio y la especie.

En el medio M1 se alcanzaron plantas de mayor tamaño en *O. hastilabium* y *M. buccinator*, mientras que en *T. cebolleta* por el contrario hubo plantas de mayor altura en el medio M2 (Figura 34b) sin que se hallaran diferencias significativas (P≤0,05) entre los medios ensayados y el factor altura de la planta. La formación de PBS se presentó de igual manera en los dos medios para *M. buccinator* y *O. hastilabium* (Figura 34c), pero se presentaron diferencias altamente significativas entre la especie y el tiempo (P≤0,05) para esta variable respuesta.

Al examinar el efecto interactivo que se presentó entre la formación de raíces (FR), altura de la planta (AP) y formación de pseudobulbos (PSB) en las cuatro observaciones realizadas, se pueden apreciar en la Figura 35 diferencias significativas entre el medio empleado con la especie en cuanto a la formación de raíces. No hubo interacción significativa entre el factor medio de cultivo con el factor tiempo de observación, ni entre especie con el tiempo. Sin embargo, la formación de raíces en los primeros 120 y 180 días después de la siembra fue mayor en *O. hastilabium* y este patrón se mantuvo a lo largo de permanencia en el cultivo *in vitro* hacia los 240 días de observación (Figura 35b).

En relación a la interacción entre la altura de las plantas y los factores no se apreciaron diferencias significativas. En la Figura 35b se muestra que hubo incremento de las plantas durante el tiempo de permanencia en los dos tratamientos quedando claro un adecuado desarrollo estructural de las especies cultivadas.

En cuanto a la interacción entre la formación de PBS y los factores se hallaron diferencias significativas entre la especie con el tiempo. En la (Figura 35c) se aprecia el aumento en el porcentaje formativo de PBS al final del periodo de permanencia en el cultivo *in vitro* para *M. buccinator* que desarrolló visible-

mente esta estructura. El efecto de los medios sobre el desarrollo y elongación de plántulas *in vitro* de *T. cebolleta* y *M. buccinator* fue progresivo a lo largo de los tiempos de observación. Los resultados anteriormente indican que la selección de reguladores de crecimiento ANA, BAP y KIN adicionados al medio de cultivo MS fueron esenciales para el crecimiento y desarrollo plantular junto con la formación de raíces.

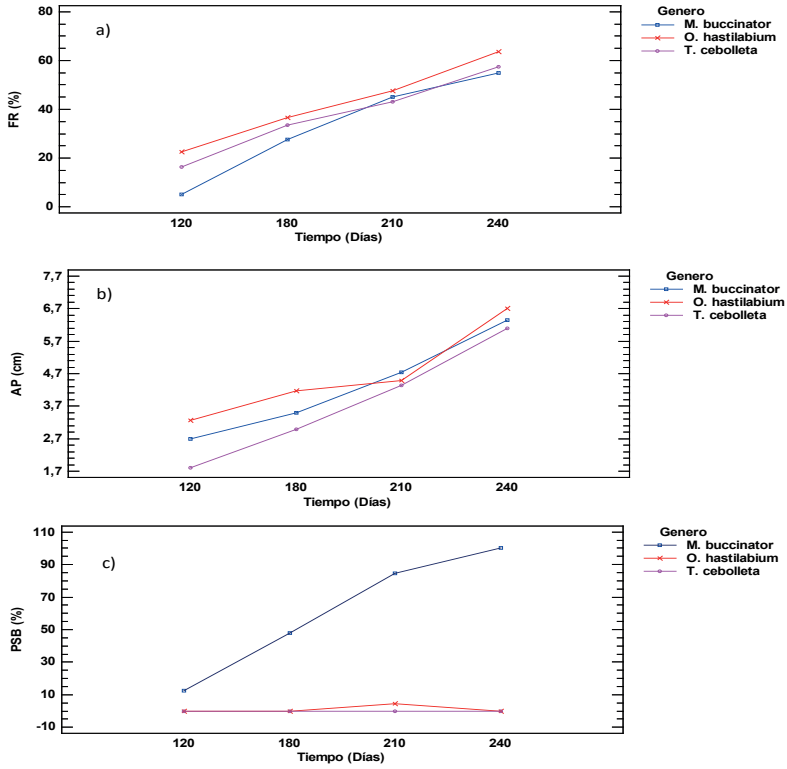

Figura 35. Efecto interactivo del tiempo sobre el porcentaje de formación de raíces (FR), altura de la planta (AP) y formación de pseudobulbos (PBS) en *T. cebolleta, O. hastilabium* y *M. buccinator* durante el desarrollo plantular

Los resultados obtenidos en este ensayo son similares a los encontrados por Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia (2006) en la regeneración de plántulas a partir de callos y cuerpos protocórmicos de *Epidendrum radicans*, *Oncidium cavendishianum* y *Oncidium tigrinum* en medio MS suplementado con dosis variadas de ANA, BA y AG3. Con similitud Kalimuthu et al. (2007) obtuvieron un número elevado de brotes y raíces en *Oncidium sp.* en medio MS suple-

mentado con BAP 2mg/l, así como en *Epidendrum nocturnum* la proliferación fue alta en el mismo medio y dosis hormonal (Yates & Curtis, 1949).

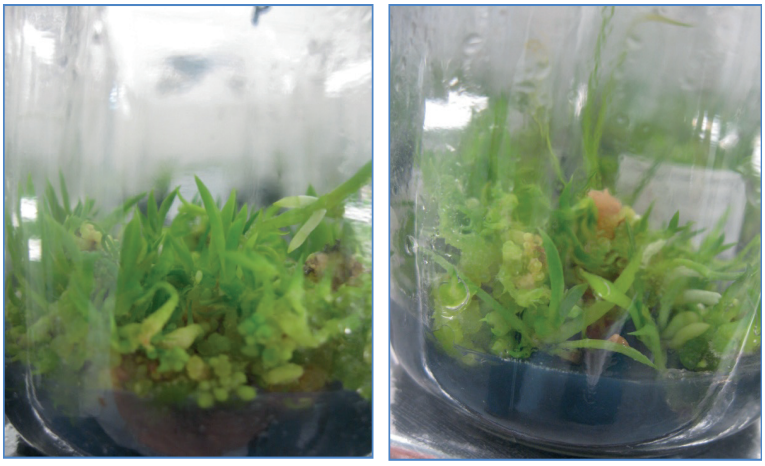

Figura 36. Formación de brotes de *Oncidium hastilabium* en fase de crecimiento plantular.
Fuente: Cáceres (2013)

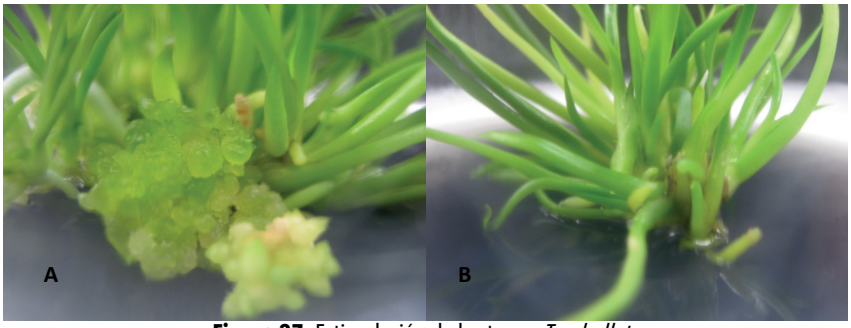

Figura 37. Estimulación de brotes en *T. cebolleta*
A. Formación de cuerpos parecidos a protocormos en el medio M2 (ANA 0,3-BAP 2 mg/L.) B. Detalle formación de raíces y hojas
Fuente: Cáceres (2013)

Resultados similares fueron encontrados previamente en *Oncidium stramineum,* que al colocarse en medio con 4 mg/l de BAP disminuyeron la producción de cerpos parecidos a protocormos. Se ha establecido que las auxinas (ANA, AIA e IBA) incrementan la germinación y desarrollo de plantas como lo afirman Arditti, (1979, citado por Pierik (1990), Cañas (1993) y Perea (2001).

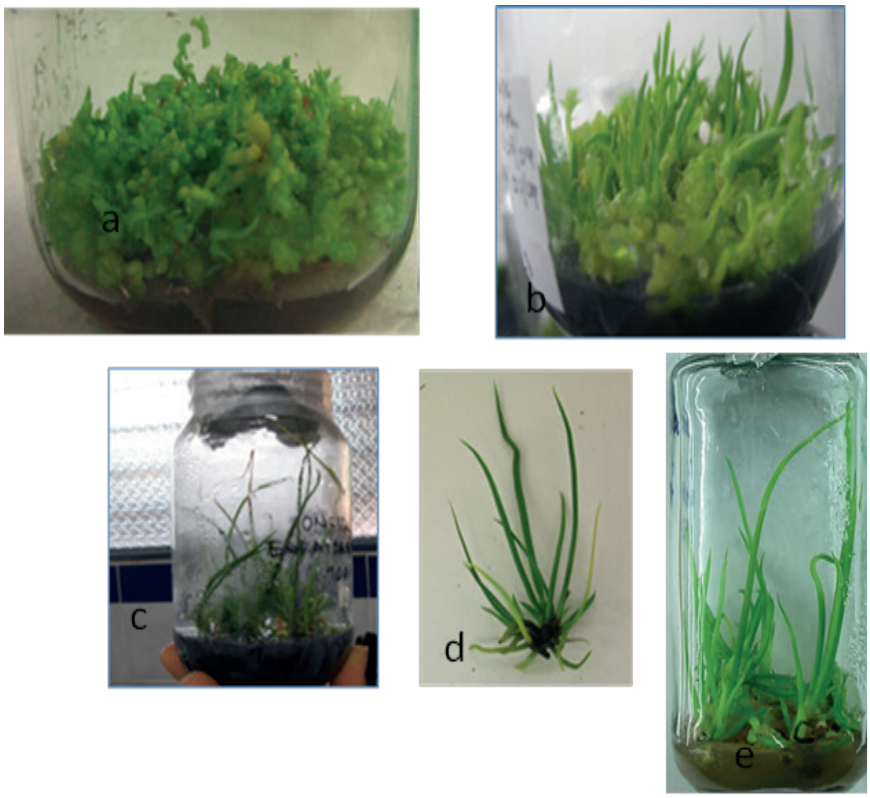

Figura 38. Desarrollo de protocormos de *T. cebolleta* durante el periodo de multiplicación de brotes. A-B. EStadios tempranos 120 días. C-D-E. Plántulas con 240 días. C. Planta con una flor *in vitro*

El desarrollo de plántulas a partir de protocormos de *Trichocentrum cebolleta*, *Oncidium hastilabium* y *Mormodes buccinator* se alcanzó en los medios seleccionados y presentaron características vigorosas adecuadas para ser trasplantadas y aclimatadas (Figuras 35-39). La adición de reguladores de crecimiento en las concentraciones en M1: KIN 0,05-NA 0,5 mg/L y en M2: ANA 0,3-BAP 2 mg/L junto con el agua de coco y carbón activado en esta fase de cultivo fueron de gran beneficio para el crecimiento de estas especies.

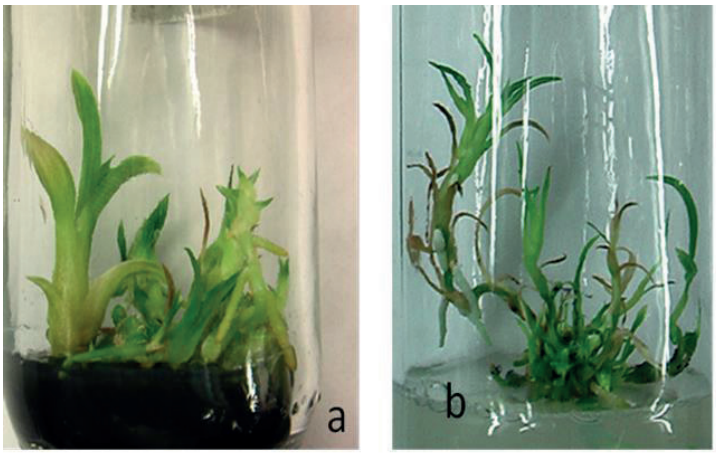

Figura 39. Desarrollo de protocormos de *M. buccinator* durante el periodo de multiplicación de brotes. A y B. Diferenciación de tallo y hojas
Fuente: Cáceres (2013)

El medio MS con agua de coco suplementado con ANA, BAP y KIN empleado en este ensayo en las dos combinaciones estimuló el crecimiento de brotes foliares y radiculares en *O. hastilabium*. De manera similar Billard, Dal Zotto y Lallana (2013) obtuvieron plantas vigorosas de *O. bifolium* en medio MS suplementado con agua de coco y fertilizante 20-20-20 que presentaron pseudobulbos antes de ser llevados a trasplante.

Se observó que el uso de reguladores de crecimiento en el tratamiento con ANA 0,3-BAP 2 mg/L estimuló la formación de cuerpos parecidos a protocormos (PLB) en *T. cebolleta* (Figura 37), como también se presentó previamente *en Oncidium sp* con el uso de 1,0 mg/l de BAP y 1,5 mg/l NAA, estudio realizado por Kalimuthu et al. (2007). Estas estructuras incrementan la cantidad de brotes por cada semilla si el medio contiene los reguladores de crecimiento apropiados.

En *Mormodes maculata* se estudió el efecto de diferentes dosis de BAP sobre la formación de cuerpos parecidos a protocormos de manera directa sin pasar por la fase de callo, alcanzaron de hasta 12 PBL por una sola semilla

en tan solo 33 días; los cuales fueron utilizados en el establecimiento de un banco de germoplasma como alternativa de conservación *ex situ* (Real Carrasco et al., 2007).

También se ha encontrado un buen número de plántulas de *Oncidium stramineum* reproducidas *in vitro* con el uso de diversos extractos vegetales de manzana, plátano y jitomate así como la adición de peptona y polivinil pirrolidona al medio MS (Flores-Escobar *et al.*, 2008). Se ha establecido que el éxito para alcanzar respuesta adecuada de semillas de especies de orquídeas silvestres depende de cada género y aun entre las especies se presentan marcadas diferencias en la respuesta al desarrollo plantular. Es prioritario realizar estudios para encontrar el método que favorezca el vigor y proliferación masiva de la especie de interés que incluye el tipo de medio y condiciones de cultivo. En resumen, según los resultados de este ensayo se puede recomendar el medio MS para la producción de estas plántulas.

7.2.3. Comportamiento de protocormos de *Peristeria elata, Catasetum lucis, Epidendrum ibaguense y Prostechea fragrans* en medio MS con y sin carbón activado

Protocormos que alcanzaron una altura aproximada de 1-1,5 cm procedentes de medio MS sin reguladores de crecimiento y con carbón activado fueron recultivados en recipientes con cuatro medios de cultivo: **M1C** y **M1SCA** suplementados con KIN 0,05; ANA 0,5 mg/L, y agua de coco; **M2 CA** y **M2SCA:** ANA 0,3; BAP 2 mg/L alcanzaron desarrollo plantular cercano a los 5 cm. Se encontró un protocolo para obtener plántulas en cantidades elevadas con crecimiento vigoroso por el aspecto de los brotes, color de las estructuras foliares, grosor del tallo, tamaño y formación de raíces en los medios usados que podría ser empleado para establecer programas de conservación y producción sostenible para estas especies.

Al examinar el porcentaje de formación de raíces en las cuatro especies estudiadas no se encontraron diferencias significativas *(P≤0,05)* (Tabla 8),

se aprecia que en C. *lucis se* obtuvo una media de 30,66±0,27 que señala un comportamiento ligeramente mayor para el estímulo radicular, mientras que en *P. fragans* la media fue un poco menor, pero en general las especies formaron raíces durante el tiempo de cultivo. En cuanto a la formación de raíces en las cuatro especies y en los cuatro tratamientos durante los tres tiempos de observación se presentaron diferencias significativas *(P≤0,05)* (Tabla 8), puesto que se evidencia incremento de la formación de raíces a lo largo del proceso de desarrollo de las plántulas.

Tabla 8. Efecto del tiempo y medio sobre la formación de raíces en *C. lucis, E. ibaguense, P. fragans y P. elata*

FORMACIÓN DE RAÍCES * ESPECIE					
ESPECIE	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
C. lucis	30,66±0,279	27,9556	0,1	0,9608	X
E. ibaguense	29,5±0,257	25,7205			X
P. fragrans	26±0,198	19,8219			X
P.elata	26,91±0,222	22,2034			X
FORMACIÓN DE RAÍCES*TIEMPO					
TIEMPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
120	3,4375	3,09771	133,12	0,0000	X
180	25,625	8,83082			X
210	55,75	12,6886			X
FORMACIÓN DE RAICES*MEDIO					
MEDIO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M1CA	30,5833	28,2793	0,08	0,9723	X
M1SCA	27,0833	23,2827			X
M2CA	29,0833	22,7335			X
M2SCA	26,3333	21,7646			X

El efecto de los medios empleados con y sin carbón activado ejercido sobre el porcentaje de formación de raíces no mostró diferencias significativas en las cuatro especies estudiadas. Los resultados hallados indican que las

combinaciones empleadas de auxinas (0,5 y 0,3 mg/L de ANA) y citoquininas (0,05 y 2 mg/l de KIN y BAP) favorecieron el estímulo de raíces sean las dosis bajas o elevadas reiterando la importancia de la combinación entre estos dos tipos de reguladores. Al evaluar la variable altura de la planta alcanzada en las cuatro especies no se presentaron diferencias significativas entre ellas lo que permite considerar que se presentó activación celular de manera semejante en todas las especies con cada formulación empleada en el ensayo (Tabla 9). Por otro lado, al evaluar el efecto de los medios sobre el crecimiento y elongación de las plantas, no se hallaron diferencias significativas entre las medias de altura halladas en las cuatro especies.

Tabla 9. Efecto del tiempo y medio sobre la altura de las plantas de *C. lucis, E. ibaguense, P. fragrans* y *P. elata*.

ALTURA DE LA PLANTA*ESPECIE					
ESPECIE	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
C. lucis	4,43±0,021	0,005	0,57	0,6358	X
E. ibaguense	5,35±0,019	0,005			X
P. fragrans	5,36±0,018	0,005			X
P.elata	4,83±0,022	0,005			X
ALTURA DE LA PLANTA*TIEMPO					
TIEMPO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
120	2,762±0,061	0,0019	135,29	0,0000	X
180	4,91±0,094	0,0019			X
210	7,31±0,075	0,0019			X
ALTURA DE LA PLANTA*MEDIO					
MEDIO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M1CA	5,0±0,022	0,0059	0,058	0,6301	X
M1SCA	4,35±0,018	0,0059			X
M2CA	5,37±0,021	0,0059			X
M2SCA	5,25±0,019	0,0059			X

Al revisar el comportamiento de las plantas a lo largo de las tres observaciones se apreciaron diferencias altamente significativas en cada registro, lo cual indica que las plántulas de las cuatro especies respondieron favorablemente a las formulaciones basales empleadas, hubo crecimiento continuo hasta quedar aptas para el trasplante.

Por otro lado, al examinar el efecto de los medios sobre el crecimiento y elongación de las plantas, no se hallaron diferencias significativas entre las medias de altura halladas en las cuatro especies (Tabla 10), lo cual permite inferir que las plántulas crecieron de manera similar independientemente de la presencia o ausencia de carbono activado en el medio de cultivo y las dosis de fitorreguladores de cada tratamiento.

Tabla 10. Efecto del tiempo y medio sobre la formación de pseudobulbos en *C. lucis, E. ibaguense, P. fragans* y *P. elata*.

FORMACIÓN DE PSEUDOBULBO* ESPECIE					
ESPECIE	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
C. lucis	43±0,268	5,876	16,04	0	X
E. ibagense	0±0	5,876			X
P. fragrans	0±0	5,876			X
P.elata	38,25±0,30	5,876			X
FORMACIÓN DE PSEUDOBULBO* TIEMPO					
TIEMPO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
120	4,4375±0,62	0,0639	6,69	0,0029	X
180	19,0625±0,20	0,0639			X
210	37,4375±0,38	0,0639			X
FORMACIÓN DE PSEUDOBULBO* MEDIO					
MEDIO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
M1CA	18,3333±0,26	8,4763	0,09	0,9636	X
M1SCA	17,8333±0,26	8,4763			X
M2CA	22,5833±0,32	8,4763			X
M2SCA	22,5±0,31	8,4763			X

Al revisar el efecto de los medios, tipo de especie y el tiempo en la formación de pseudobulbos (PBS), se encontraron diferencias altamente significativas (P>0,05) (Tabla 10) en la diferenciación de pseudobulbos, pues fue evidente la presencia en *C. lucis* y *P. elata,* como ocurre cuando crecen en su hábitat natural. En las especies *E. ibaguense* y *P. fragans* no se formaron pseudobulbos, también se pudieron apreciar medias mayores (43±0268) en la formación de pseudobulbos en *C. lucis* que en *P. elata* independientemente del medio empleado. Hubo diferencias significativas entre el número de pseudobulbos formados y los tiempos de observación, se aumentaron en la medida del desarrollo y elongación de las plántulas en los cuatro tratamientos empleados (Tabla 10c). El efecto del medio sobre el porcentaje de formación de pseudobulbos en las dos especies no mostró diferencias estadísticamente significativas; la ausencia o presencia de carbón activado no fue un factor determinante en la expresión de esta estructura.

Se revisó el efecto interactivo entre el porcentaje de formación de raíces, altura de las plantas y formación de pseudobulbos con respecto a los medios empleados y los tiempos de observación (Figura 40). La interacción entre medio y especie para el porcentaje de formación de raíces, no fué significativas (P>0,05); sin embargo, en *C. lucis* hubo una tendencia a formar mayor cantidad de raíces en el medio M1CA que en el medio M2CA, mientras que en las demás especies se hallaron porcentajes mayores en el medio M2CA con respecto a los demás (Figura 40a). No hubo interacción significativa entre los medios ensayados con respecto a los tiempos de observación para la formación de raíces halladas en las cuatro especies; su formación fue creciente en los cuatro tratamientos ensayados y en cada una de las especies (Figura 41a).

Por el contrario, sí se evidenció interacción significativa entre las especies cultivadas con respecto a los tiempos de observación para la formación de raíces (P=0,056), se incrementó el porcentaje en la medida que permanecieron en el medio (Figura 41a).

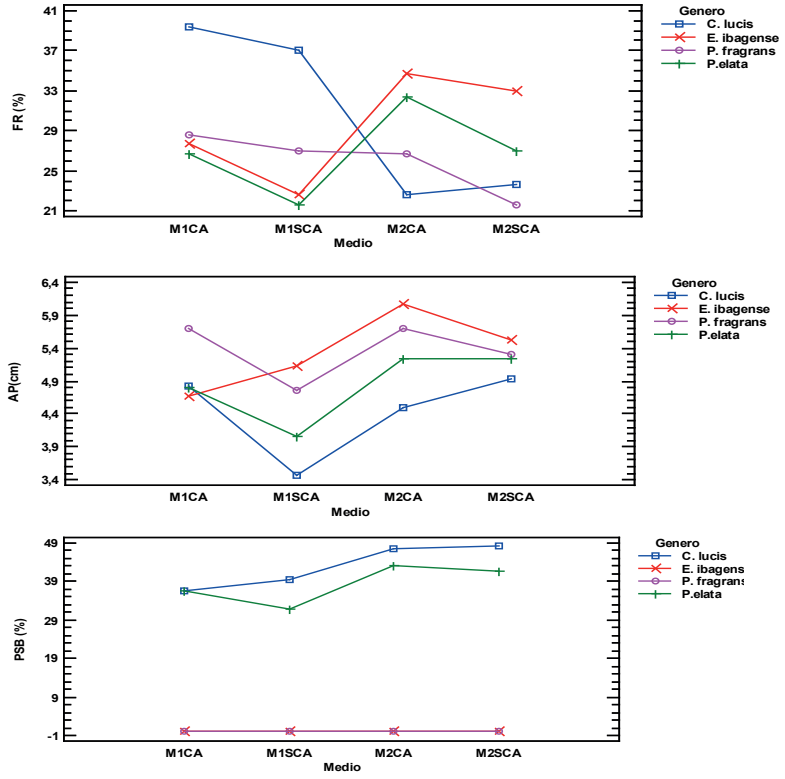

Figura 40. Efecto interactivo del medio sobre la formación de raíces, pseudobulbos y AP (cm) y en *P. elata, C. lucis, E. ibaguense* y *P. fragrans.*

Se presentó interacción altamente significativa entre tipo de medio y las especies ensayadas en cuanto a la formación de pseudobulbos (Figura 40c); se aprecia que en el M2CA y M2SCA hay una tendencia a favorecer el desarrollo de pseudobulbos.

No se presentaron interacciones significativas entre los tratamientos empleados y los tiempos de observación con respecto al porcentaje de formación de pseudobulbos en las especies que los formaron a pesar de los porcentajes variados hallados (Figura 40c),

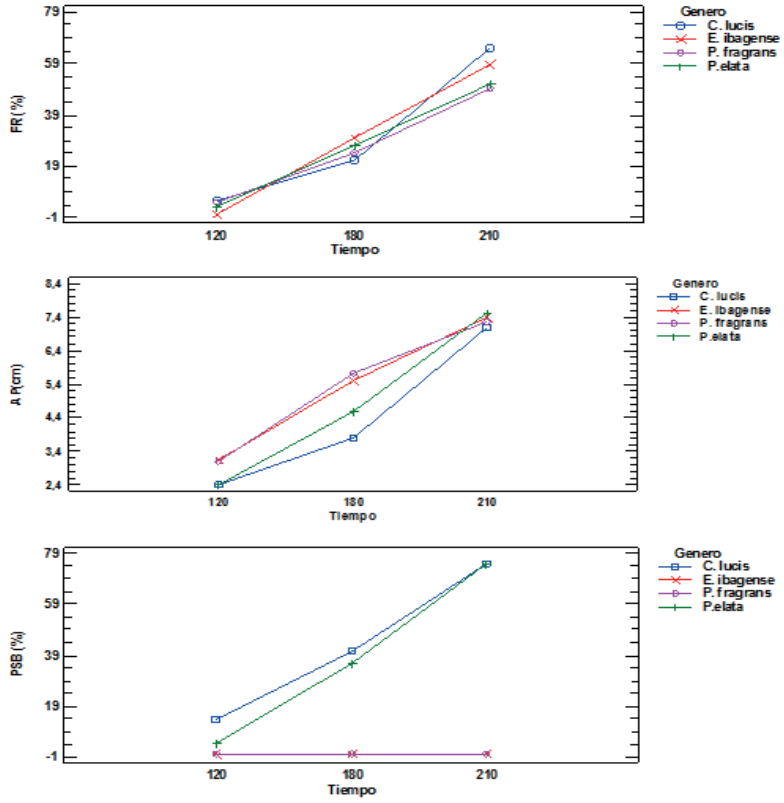

Figura 41. Efecto interactivo del tiempo sobre la FR, AP y formación de PBS en *P. elata, Catasetum lucis, Epidendrum ibaguense* y *Prostechea fragrans*

Hubo interacción altamente significativa ($p<0,05$) entre las especies y los tiempos de observación en cuanto a la formación de pseudobulbos, los cuales se diferenciaron a lo largo del periodo de crecimiento en los tratamientos seleccionados (Figura 41c).

Tampoco hubo interacción significativa entre los medios empleados y la formación de pseudobulbos, pero entre porcentaje de formación de pseudobulbos y especie se vio influenciada de manera significativa.

La diferenciación de brotes de *P. elata* a partir de protocormos en medio MS con y sin carbón activado a la totalidad de las sales se evidencia (Figura 42)

e indica proliferación elevada de brotes en cada medio, así las posibilidades que ofrece el cultivo *in vitro* para producir plántulas en forma masiva en un espacio mínimo es de gran expectativa.

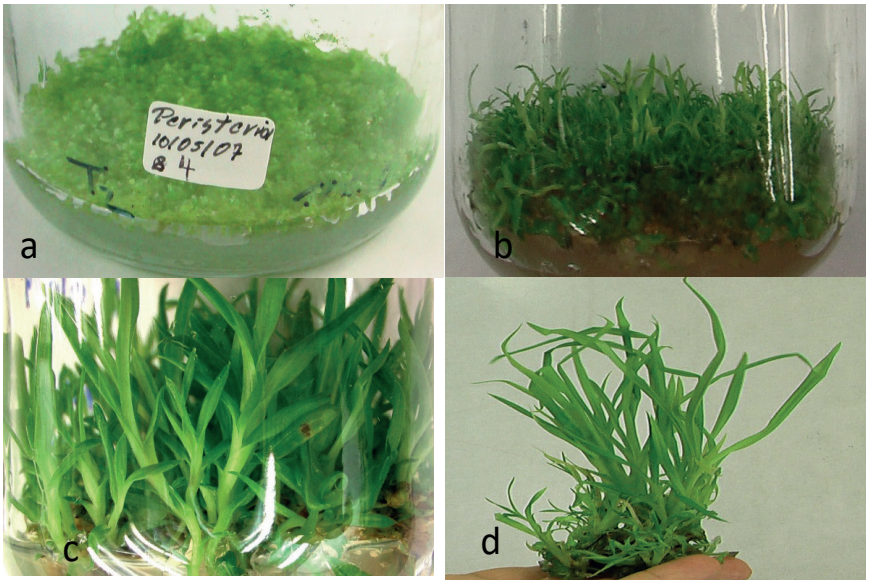

Figura 42. Desarrollo protocormos de *P. elata* durante el periodo de multiplicación de brotes. Ay B. Estadios tempranos 120 días; C y D. Plántulas con 210 días de sembradas antes del trasplante a sustrato
Fuente: Cáceres (2013)

La formación de pseudobulbos fue manifiesta en plántulas de *P. elata* y *C. lucis* especialmente al final del cultivo *in vitro,* estructura que permitió considerar un estado de madurez y desarrollo adicional a la altura y formación de raíces como adecuado para el trasplante ex *vitro* para estas especies (Figura 43a).

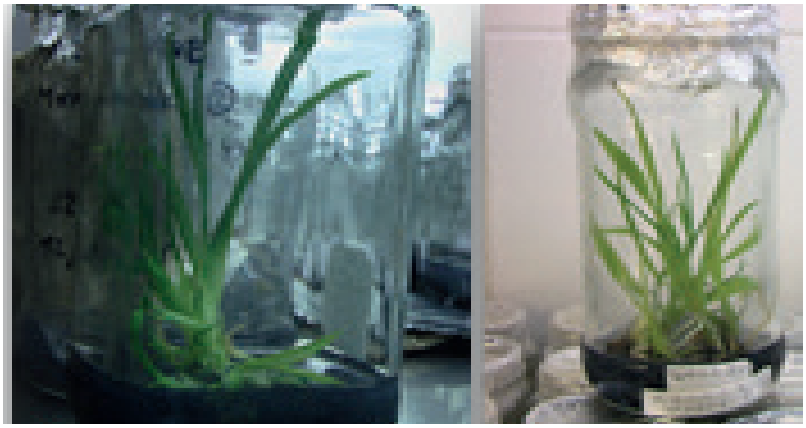

Figura 43. Formación de pseudobulbos en *P. elata* y *C. lucis* durante el periodo de multiplicación de brotes a los 120 días de cultivado.
Fuente: Cáceres (2011)

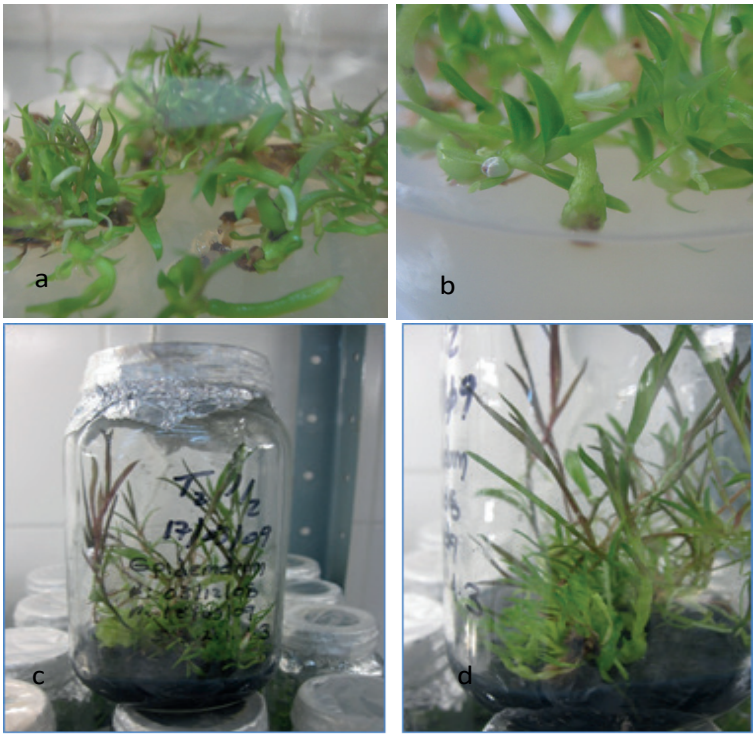

Figura 44. Desarrollo de protocormos de *E. ibaguense* en periodo de multiplicación. A-B. Estadios tempranos 120 días; C-D. Plántulas a los 210 días
Fuente: Cáceres (2011)

En *E. ibaguense* se puede apreciar (Figura 44) la diferenciación de brotes alcanzada durante la fase plantular a partir de protocormos junto con el vigor de las plántulas, formación de raíces y elongación de hojas.

A pesar que se ha reportado que las especies terrestres requieren medios de cultivo menos exigentes en cuanto a concentración de sales, pero con mayor complejidad (Arditti, 1993), *P. elata* de hábito terrestre creció bien en el medio MS a la totalidad de sales con agua de coco, reguladores hormonales con y sin carbón activado con una alta tasa multiplicativa desde los primeros estadios hasta el desarrollo requerido para la aclimatación. Se evidenció que no hubom oxidación durante el desarrollo de los protocormos de *P. elata* en medio MS sin carbón activado, por lo tanto se podría inferir que no se liberó al medio fenoles ni compuestos carboxílicos responsables de dicha oxidación.

Son pocos los reportes relacionados con el cultivo *in vitro* de *P. elata* probablemente por la facilidad con que se propaga vegetativamente, sin embargo los resultados hallados en el presente estudio contrastan con otros reportes similares en orquídeas terrestres como en *Bletia striata* cultivadas en medio MS a la mitad de las sales sin reguladores de crecimiento tanto para la germinación de semillas como el desarrollo plantular con altas tasas de multiplicación germinativa (Billard et al., 2014). Son escasos también los estudios de cultivo *in vitro* en las especies *E. ibaguense* y *P. fragrans*, sin embargo se comportaron de manera similar que *P. elata* en medio MS con y sin carbón activado con respecto al desarrollo de las plantas y formación de raíces, resultados que contrastan con lo hallado por Pedroza-Manrique (2009) en *Epidendrum elongatum* donde la tasa media de crecimiento y la formación de raíces fue mucho mayor en los tratamientos donde se empleó el carbón activado en concentraciones inferiores al 2 %.

La mezcla de auxinas como ANA con citoquininas sea KIN o BAP al medio MS, promovió en este trabajo la diferenciación y crecimiento de protocormos en los cuatro tratamientos, lo cual permite establecer que los fitorreguladores fueron funcionales fisiológicamente en concentraciones bajas tanto

en *E. ibaguense* y *P. fragrans*; resultados que coinciden con los hallados por Pedroza-Manrique (2009), quien encontró efectos beneficiosos al adicionar AIA al medio MS para el desarrollo de *E. elongatum*. De igual manera Ávila-Diaz y Salgado-Garciglia (2006) obtuvieron plántulas en cuatro meses de hasta 5 cm de altura con pseudobulbo y velamen en *Encyclia adenocaula* y *Epidendrum radicans* ajustando las dosis y tipos de reguladores para cada especie, en este caso ANA, BAP y GA_3 en medio MS sin carbón activado.

Para el caso de *C. lucis* los resultados obtenidos señalan que el protocolo empleado para la producción *in vitro* de esta especie endémica de Santander puede ser utilizado para generar tasas multiplicativas elevadas sin que se alteren las poblaciones naturales existentes, contario a lo planteado en diversos trabajos que afirman que el carbón activado en el medio inhibe la acción de los fitorreguladores, se encontró que en esta especie cultivada el efecto fue similar en medio con y sin carbón activado, lo cual indica que los nutrientes y fitorreguladores no fueron afectados y pudieron ser absorbidos por las plantas de forma adecuada.

Contrario a los hallazgos de Leles, Pereira y Vera (2014), quienes estudiaron el comportamiento *in vitro* de *Catasetum schmidtianum* en medio Knudson con diferentes agentes gelificantes pero sin carbón activado, hallaron que la producción de protocormos y plántulas fue favorable en este medio bajo en sales minerales. Otro estudio examinó el comportameinto *in vitro* de *Catasetum x apolloi* en medios de cultivo con diferentes dosis de extracto de pirolenhoso y carbón activado, agua de coco, fertilizante B&G presentando crecimiento similar en las dosis empleadas, lo cual indica que diferentes medios podrían estimular brotes foliares y radiculares en el género de *Catasetum* (Pereira, Vieira & Vera, 2014).

7.2.4. Evaluación del medio MS, reguladores de crecimiento y carbón activado sobre el desarrollo de protocormos de *Cycnoches chlorochilon*

Protocormos de C. chlorochilon con una altura entre 1 a 1,5 cm fueron recultivados en dos formulaciones de MS al 100 % de la totalidad de las sales con

y sin carbón activado con los siguientes tratamientos hormonales: T1CA y T1SCA (Kin 0,05mgL-1; ANA 0,5 mgL-1); T2CA y T2SCA (ANA 0,3mg L-1; BAP 2 mgL-1). Las formulaciones seleccionados permitieron evaluar el efecto ejercido sobre la altura de las plántulas, estimulación de raíces y formación de pseudobulbos en *C. chlorochilon* hasta los 210 días; se pudo establecer que en los tratamientos empleados hubo crecimiento de ´plantas de forma adecuada en cuanto al desarrollo de hojas, estimulación de raíces y aspecto vigoroso con escasa oxidación de las plántulas y expresión de pseudobulbos durante el crecimiento *in vitro*.

Los resultados para mostrar el efecto de los medios sobre la formación de raíz en las plantas de *C. chlorochilon* durante los primeros 180 días en medio MS al 100 % se pueden apreciar en la Tabla 11. Se halló una diferencia significativa en los dos periodos de observación en cuanto al porcentaje de formación de raíces, lo cual indica que los medios permitieron estimular raíces de manera temprana e incrementar el estímulo radicular a lo largo del tiempo de cultivo. También se puede apreciar que no se encontraron diferencias significativas entre la formación de raíces en los tratamientos empleados con y sin carbón activado, dado que las plántulas pudieron mantener medias relativamente similares para esta variable respuesta indicando que las raíces de estas plantas facilitan su formación en medios oscurecidos con carbón activado o en su ausencia (Figura 45).

Tabla 11. Efecto del tiempo y medio sobre la formación de raíces en *C. chlorochilon*.

FORMACIÓN DE RAÍZ * MEDIO					
MEDIO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
T1 CA	54,375±0,15	13,39	0,16	0,9151	X
T1SCA	52±0,18	13,39			X
T2CA	60±0,28	13,39			X
T2SCA	64±0,084	13,39			X
FORMACIÓN DE RAÍZ*TIEMPO					
TIEMPO (DÍAS)	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
120	45,18±0,087	3,986	19,37	0,0046	X
180	70±0,07	3,986			X

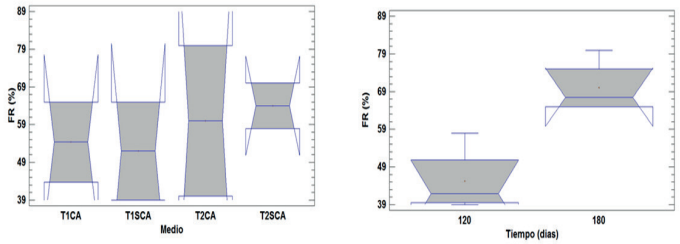

Figura 45. Representación gráfica del porcentaje de formación de raíces de *C. chlorochilon* en cuatro medios de cultivo ensayados durante los 180 de cultivo *in vitro*

El efecto ejercido de los medios sobre el porcentaje de formación de pseudobulbos (PBS) en el tiempo de observación y en los cuatro tratamientos se puede apreciar en la tabla 12; no se presentaron diferencias estadísticas significativas sobre el porcentaje de formación de pseudobulbos durante los primeros 180 días de observación. Sin embargo, en el medio T2SCA se presentó la media más alta (71±0,287) que señala una tendencia a que esta estructura morfológica se exprese mejor con la dosificación hormonal utilizada y sin la presencia de carbón activado (Figura 46). El desarrollo de pseudobulbo un poco después de subcultivadas las plántulas al medio, constituye un rasgo fenotípico que se expresa en esta especie a pesar de la existencia de alta humedad y nutrientes del medio.

El análisis ANOVA señaló que se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la media de porcentaje de formación de pseudobulbos en los dos tiempos de observación evaluados para esta variable,

Tabla 12. Efecto del medio y tiempo en la formación de pseudobulbos en *C. Chlorochilon*

FORMACIÓN DE PSEUDOBULBOS * MEDIO					
MEDIO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
T1 CA	44.5±0,275	13,39	0,23	0,8732	x
T1SCA	56,5±0,473	13,39			x
T2CA	49±0,438	13,39			x
T2SCA	71,5±0,287	13,39			x
FORMACIÓN DE PSEUDOBULBOS *TIEMPO					
TIEMPO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
120	34,75±0,256	9,93	8,62	0,0261	X
180	76±0,114	9,93			X

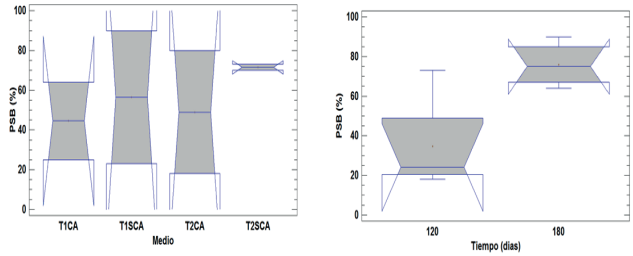

Figura 46. Representación gráfica del porcentaje de formación de pseudobulbos en plántulas de *C. chlorochilon* en cuatro medios de cultivo durante los 180 de cultivo *in vitro*

lo cual permite establecer que a medida que evolucionan las plantas en elongación y tiempo de permanencia, la tendencia para esta especie a formar PBS fue evidente en los medios seleccionados.

El efecto de los medios sobre la altura de las plantas cultivadas *in vitro* no mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 13). Las medias encontradas después de 180 días de observación fueron semejantes, sin embargo en el medio T2SCA se aprecia que la altura alcanzada por las plantas fue ligeramente mayor (5,85±0,021) con respecto a los datos obtenidos en los demás medios (Figura 47).

Tabla 13. Efecto del medio sobre la altura de las plantas en *C. chlorochilon*

ALTURA DE LA PLANTA*MEDIO					
MEDIO	MEDIA	ERROR EST.	RAZÓN-F	VALOR-P	GRUPOS HOMOGÉNEOS
T1 CA	4,59±0,057	0,658659	0,77	0,5671	X
T1SCA	4,95±0,014	0,658659			X
T2CA	4,665±0,094	0,658659			X
T2SCA	5,85±0,021	0,658659			X

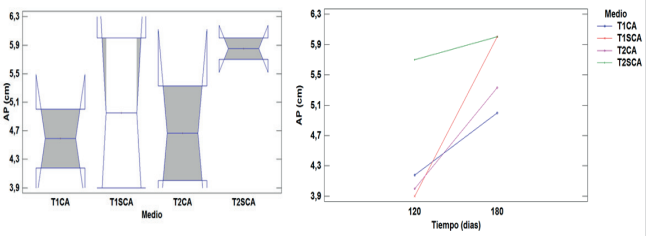

Figura 47. Representación gráfica sobre la altura de las plántulas de *C. chlorochilon* en cuatro medios de cultivo

Figura 48. Proceso de diferenciación de hojas, tallo y raíces en protocormos de *C. chlorochilon* después de 60 días de recultivados en medio MS.
Fuente: Contreras (2014)

La formación de brotes foliares y radiculares se expresan fuertemente por la adición de las hormonas empleadas BAP en concentraciones mayores con respecto a la concentración de ANA. El registro del desarrollo de brotes y diferenciación de hojas y raíces grandes con velamen durante los primeros 120 días de cultivo fue muy particular (Figura 48).

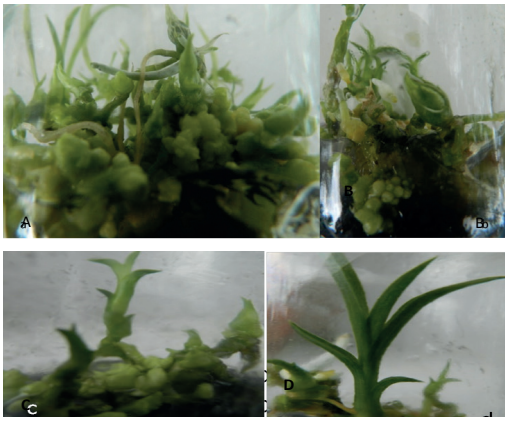

Figura 49. Proceso del crecimiento plantular de *C. chlorochilon* en medio MS.
A-B. Proliferación de brotes estimulación de pseudobulbos a los 60 días de recultivados. C-D. Crecimiento de plántulas a los 120 días (c-d).
Fuente: Cáceres (2013)

Después de los 180 días de estar cultivadas en medio MS al 100 % de la totalidad de las sales, se trasladaron a medio MS con carbón activado a la mitad de las sales y sin reguladores de crecimiento para favorecer la elongación de las plántulas y alcanzar tamaños (Nongdam & Tikendra, 2014) adecuados para el trasplante a sustrato.

El comportamiento *in vitro* en los medios seleccionados para esta especie resultó ser muy particular, se destaca la formación prematura de raíces y pseudobulbos que continuaron a lo largo crecimiento plantular (Figura 49). Con respecto al desarrollo de las plántulas de *C. chlorochilon* se pueden comparar con los resultados de Nongdam y Tikendra (2014), quienes reportaron que la estimulación de brotes en el cultivo *in vitro* estuvo relacionada con el tipo y dosis de citoquininas y auxinas empleadas en el medio, así hallaron que la incorporación de altas concentraciones de BAP o KIN en combinación con bajas concentraciones de ANA indujo la formación de brotes y hojas en *Dendrobium chrysotoxu*.

Son escasos los trabajos reportados para la propagación de esta especie a partir de semillas, sin embargo se establece con el presente ensayo que las concentraciones empleadas en el medio MS favorecieron el desarrollo de las plantas de manera adecuada.

El protocolo *in vitro* mediante germinación asimbiótica de semillas para el desarrollo de plantas de C. *chlorochilon* implementado en esta investigación podría ser usado para la propagación masiva de esta especie de alto valor económico y ecológico para el departamento de Santander.

7.3. ACLIMATACIÓN DE PLANTAS

Se pudo establecer un protocolo para la aclimatación y endurecimiento de las especies de orquídeas cultivadas *in vitro* en el presente ensayo en los dos ambientes seleccionados: Invernadero adaptado para el cultivo de orquídeas ubicado en la Universidad de Santander (UDES) y en la casa de malla Finca Villa Katy ubicada en Morrorico. Las condiciones ambientales tales como reducción del 50, 60 y 75 % de luz, humedad relativa de 70-80 %, tipo de riego empleado, temperatura de ±24°C , sustratos empleados para el trasplante de vitroplantas; así como el nivel de desarrollo alcanzado en los medios nutritivos seleccionados favorecieron porcentajes altos de sobrevivencia y adaptación de las vitroplantas. Los resultados permiten recomendar

que el protocolo de aclimatación y adaptación empleado en la presente investigación podría ser utilizado para incrementar las poblaciones genéticas endémicas seleccionadas o para otras especies de interés ornamental de manera sostenible.

En la Tabla 14 se observa el porcentaje de sobrevivencia alcanzado en las vitroplantas trasplantadas en invernadero adaptado para el cultivo de orquídeas ubicado en las instalaciones de la UDES. Los elevados porcentajes de adaptación de las vitroplantas de estas nueve especies de orquídeas demuestran que tuvieron desarrollo adecuado, y teniendo en cuenta que las plántulas al ser trasladadas a sustrato se ven sometidas a estrés hídrico se logró que gracias al manejo de los factores mencionados anteriormente desarrollaran mecanismos de adaptación que incluyen cambios en el espesor de la cutícula, funcionamiento apropiado del aparato estomal, activación de los mecanismos de autotrofia, captación de agua y nutrientes a través de las raíces, para que pasen con menores dificultades de una condición de relativa heterotrofia a un estado de autotrofia.

Tabla 14. Porcentaje de sobrevivencia de las vitroplantas y nivel de desarrollo alcanzado a los 60 días de sembradas en sustrato en condiciones de invernadero de la UDES

	30 DÍAS		60 DÍAS
ESPECIE	% SOBREVIVENCIA	AP (CM)	N R / PLANTA
Catleya mendelii	75	5,3	3
Peristeria elata	85	8,9	3
Trichocentrum cebolleta	80	11,3	4
Catasetum lucis	90	10,5	3
Oncidium hastilabium	75	8,5	3
Mormodes lucinatum	70	7,8	5
Epidendrum ibaguense	70	7,4	3
Prostechea fragrans	70	6,7	3
Cycnoches chlorochilon	80	7,9	5

*30 vitroplantas evaluadas por especie. AP: Altura promedio (cm); NR: Número de raíces

La especie que logró mayores porcentajes de sobrevivencia en estas condiciones a los 30 días de transferirse a sustrato fue *Catasetum lucis*, mientras la adaptación de las vitroplantas de *P. elata, T. cebolleta* y *C. chlorochilon* fue ligeramente más baja, pero a pesar de ello se puede considerar un resultado aceptable dado que las pérdidas podrían ser mayores por los ajustes fisiológicos y anatómicos que atraviesan las plántulas en el periodo de aclimatación. En las Figuras 49-50 se puede ver el aspecto de las vitroplantas en el sustrato empleado durante el tiempo de observación.

Para *C. mendelii* se obtuvieron porcentajes de establecimiento *ex vitro* en valores del 75 % , así también se apreció en *O. hastilabium, M. lucinatum, E. ibaguense* y *P. fragrans*.

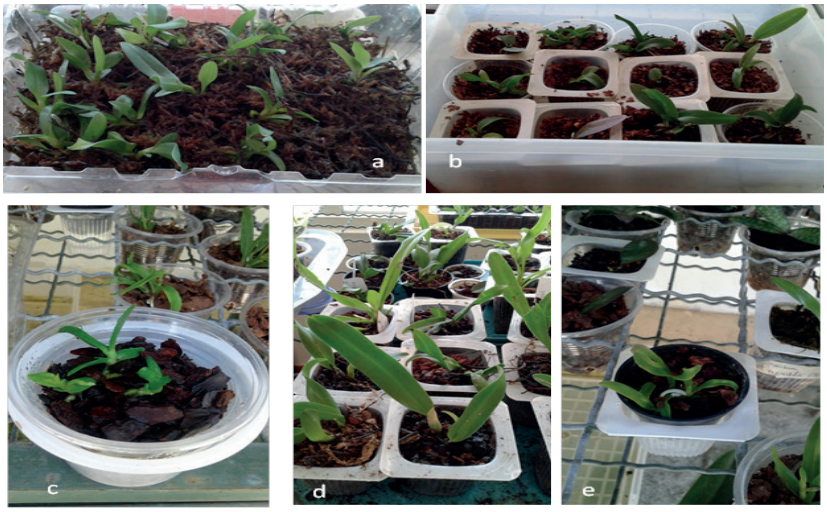

Figura 50. Vitroplantas de *C. mendelii* en fase *ex vitro* en invernadero UDES.
A-B. En potes comunitarios destapados a los 30 días de transplantadas. C-D-E. C. Potes individuales con hojas engrosadas y formación de nuevas raíces a los 60 días del transplante
Fuente: Chacón (2015)

En este experimento se establece que las plantas de *C. mendelli* que crecieron en medio MS y Knudson con agua de coco, carbón activado y reguladores de crecimiento presentaron elevados porcentajes de sobrevivencia (Figura 50) a pesar de que Vidoz et *al.*, (2008) encontraron que la adición de carbón activado y puré de banana en el medio MS ocasionó

porcentajes de sobrevivencia bajos o nulos en híbridos de *Brassavola y Cattleya*. En general son pocos los estudios realizados para la interrelación entre procedencia del medio con el nivel de aclimatación *ex vitro*. Vieira *et al* (2009) aclimataron un híbrido de *Cattleya* cultivado en medio MS con agua de coco y puré de banano y encontraron porcentajes de sobrevivencia del 100 % utilizando como sustrato fibra de coco, después de seis meses de sembradas en los potes.

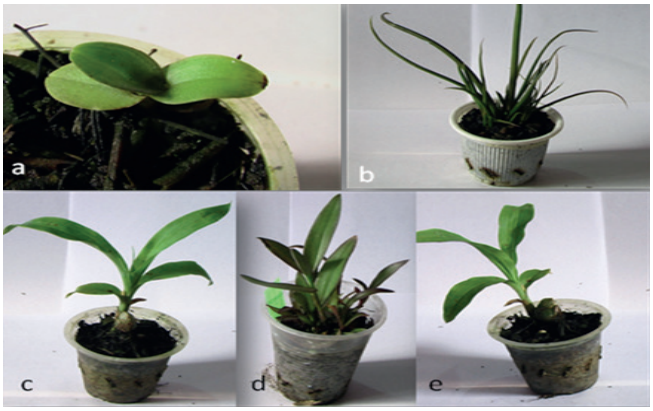

Figura 51. Plantas endurecidas después de 90 días de trasplantadas.
A. *Cattleya mendelli*. B. *Trichocentrum cebolleta*. C y E. *Cycnoches chlorochilon*. D. *Epidendrum ibaguense*
Fuente: Cáceres (2014)

En *Cycnoches chlorochilon* y *Epidendrum ibaguense* se presentaron porcentajes de sobrevivencia elevados y las plantas tuvieron alturas adecuadas en el sustrato empleado como se constata (Figura 51).

Figura 52. Plántulas en aclimatación de *Peristeria elata* a los 60 días de transplantadas
Fuente: Chacón, Cáceres (2014)

Para *Peristeria elata* se presentaron adecuados porcentajes de sobrevivencia durante el establecimiento *ex vitro* mostrando que el uso de pino pátula, carbón vegetal, helecho arborescente y turba favoreció el anclaje de las raíces y captura de nutrientes a pesar de ser una orquídea de hábito terrestre (Figura 52). Desde 1976 Penningsfeld había recomendado para este tipo de orquídeas el uso de corteza de pino silvestre, hojas secas de roble, turba molida y musgo esfagnáceo (Nieto, Mogollón & Torres, 2010).

Resultados obtenidos en la aclimatación de vitroplantas de *C. mendelii* y *C. chlorochilon* en la finca Villa Katy (Tabla 15) muestra que en las dos especies el comportamiento ex *vitro* manifestó porcentajes altos de sobrevivencia.

Tabla 15. Porcentaje de sobrevivencia y nivel de desarrollo de las vitroplantas de *C. mendelii* y *C. chlorochilon* alcanzado a los 60 días de sembradas en sustrato en condiciones de casa de malla finca Villa Katy Morrorico

	30 DÍAS		60 DÍAS
ESPECIE	% SOBREVIVENCIA	AP(CM)	N R / PLANTA
Catleya mendelii	90	6,1	5
Cycnoches Chlorochilon	95	7,9	3

*30 vitroplantas evaluadas por especie. AP: Altura promedio (cm); NR: Número de raíces.

Figura 53. Plántulas de *C.mendelii* antes de ser sembradas en sustrato. Comparación del aspecto radicular y foliar antes y a los 60 días de aclimatadas.
Fuente: Contreras (2014)

El aspecto de las plántulas de *C. mendelii* después de 60 días de trasplantadas se caracterizó por presentar hojas engrosadas, raíces alargadas con

altura promedio alcanzada de 5,3 cm independientemente del medio de procedencia (Figura 53).

Los porcentajes elevados de sobrevivencia encontrados en este ensayo permiten establecer que el sustrato empleado (Figura 54) favoreció el desarrollo plantular y vigor del sistema foliar y radicular en *C. mendelli* (Figura 55) y en *C. chlorochilon* (Figura 56). La combinación del pino pátula, carbón vegetal y musgo de helecho arborescente o esfágneo en la proporción y el tamaño seleccionado favoreció la retención de agua y nutrientes por poseer espacio poroso favorable para el anclaje y aireación de las raíces como fue sugerido previamente por diversos investigadores. Sin embargo dependiendo de la disponibilidad del sustrato otros autores utilizaron fibra de coco con excelentes resultados para la aclimatación de *Oncidium luridium* y *Encyclia phoenicea* (Rodríguez, 2005)

Figura 54. Pino pátula, carbón vegetal y musgo esfágneo empleado durante la aclimatación de vitroplantas de *C. mendelii* y *C. chlorochilon* en la finca Villa Katy
Foto: Contreras (2014)

La forma y periodicidad del riego dado a las plántulas, el mantenimiento de la humedad mediante la elaboración de la cámara húmeda, el tipo de agua, el riego de sales MS a la mitad de su concentración durante los primeros 30 días, el pretratamiento con *Ortochide*, reducción de luz en un 50 y 75 % permitieron de manera conjunta favorecer la adaptación *ex vitro* no solo *de C. mendelii* sino de todas las demás especies cultivadas en el presente trabajo.

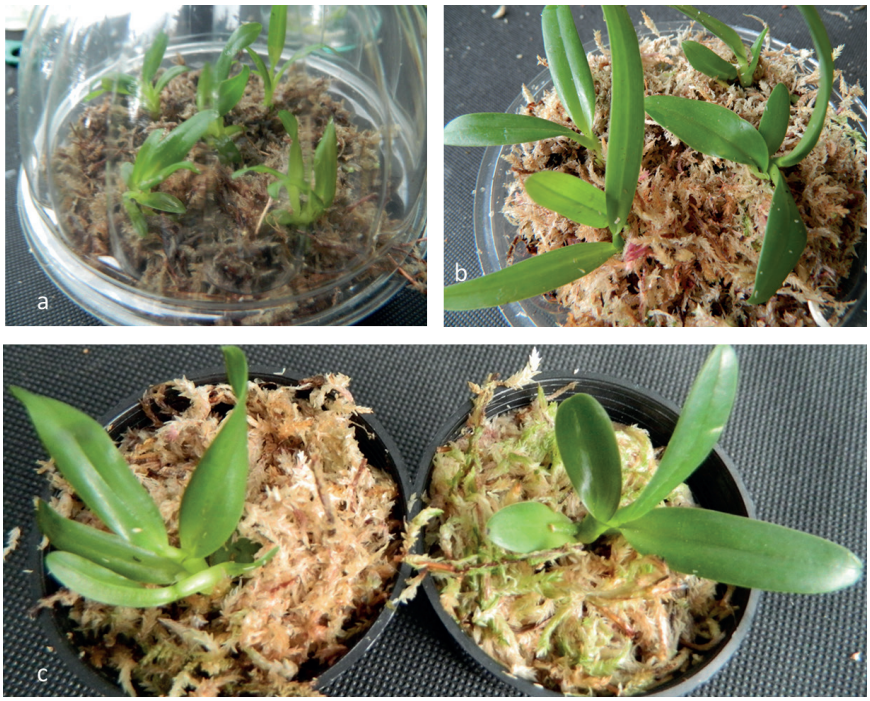

Figura 55. Aclimatación de plántulas de *C. mendelii*.
A. Plántulas en pote comunitario. B. Pote destapado a los 30 días. C. Plántulas individualizadas a los 60 días de trasplantadas
Foto: Contreras (2014)

Para *Cycnoches chlorochilon* se obtuvieron porcentajes de establecimiento *ex vitro* favorables y elevados del 95 %, mayores a los obtenidos en el invernadero (80 %). Se partieron de plantas con un promedio aproximado de 6 cm de altura con dos o tres raíces, al final del proceso de endurecimiento se alcanzaron alturas promedio de 8 cm con evidente incremento del número de raíces. No hubo aumento en el número de hojas pero sí en su longitud y con aspecto vigoroso; también se evidenciaron raíces más gruesas y funcionales dispuestas a la captación de agua y nutrientes, como se precia en las Figuras 56 y 57.

Figura 56. Plántulas de *C. chlorochilon* antes del transplante a sustrato.
A. Pseudobulbo con una raíz y dos hojas renovadas en cultivo *in vitro.* B. Planta antes de la siembra y despúes de 60 días de aclimatadas. C. Longitud de las plantas a los 60 días del cultivo *ex vitro*
Fuente: Contreras (2014)

Son pocos los estudios que se han adelantado con respecto a la germinación *in vitro* de esta especie y sobre el proceso de aclimatación, por tanto los resultados hallados pueden ser un punto para dar comienzo a programas de propagación sostenible y por consiguiente para su conservación.

El proceso de aclimatación de *C. chlorochilon* (Figura 57) permite evidenciar la fase temprana en pote cerrado donde permanecieron por 30 días y después de descubierto para quedar expuesto a las condiciones ambientales de la casa de malla reductora de luz del 60 % hasta los 60 días de observación. En esta especie se evidenció la formación de pseudobulbo funcional desde el cultivo *in vitro* en fase de crecimiento y en algunos plantas se pudo apreciar caída de las hojas. En la Figura 57c-d se presenta una planta recién desenfrascada con nueva brotación foliar hasta terminar en plántula

vigorosa con hojas elongadas y en número mayor después de 60 días de sembrada.

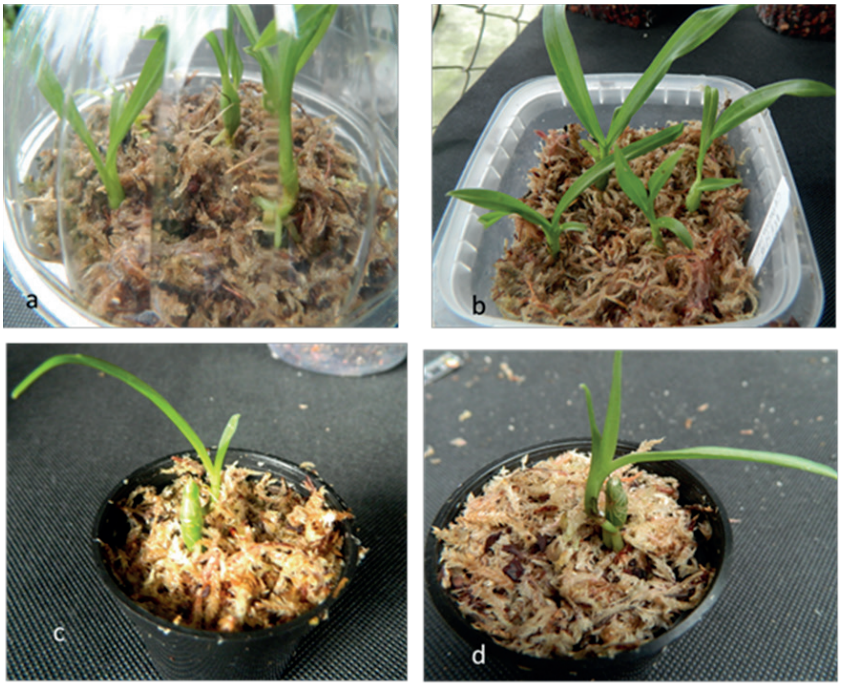

Figura 57. Plántulas de *C. Chlorochilon* durante la aclimatación y endurecimiento.
A. Pote comunitario. C. Pote comunitario destapado. C y D. Plántula despúes del desenfrascado y a los 60 días de transplantado
Foto: Contreras (2014)

En términos generales se presentaron diferentes respuestas de acuerdo a la especie vegetal y las condiciones ambientales donde se disponen las vitroplantas y si se considera que no existen protocolos estandarizados para la aclimatación de orquídeas, se precisa tener en cuenta diversas variables para propiciar con éxito el ulterior desarrollo de las plántulas. Un programa de fertilización que garantice el suministro de nutrientes, la selección de un sustrato adecuado, mantenimiento de la humedad ambiental, uso de malla reductora de luz del 80 %, manejo preventivo de enfermedades fúngicas y bacterianas serán quizá los principales factores a considerar durante el proceso de aclimatación y endurecimiento de vitroplantas de orquídeas.

Algunos estudios han reportado sobrevivencia del 80 a 90 % como por ejemplo en *Cattleya lueddemanniana y C. mossie* aplicando nebulización por dos semanas (Torres, 1997, citado por Torres & Sanabria, 2011) y en plántulas de *Dimorphics lowii* dejadas en el invernadero durante 40 días garantizaron porcentajes de sobrevivencia altos (Bakar *et al.,* 2014); así como en plántulas de *Laelia anceps* de aproximadamente 4 cm de altura se trasladaron a invernadero después de tres meses en cultivo con un 95 % de sobrevivencia (Lee Espinosa, et al., 2007).

Otro aspecto que debe ser tenido en cuenta es la selección del sustrato, en el presente estudio el uso de pino pátula, carbón vegetal y musgo fueron favorables en la aclimatación de plántulas en todas las especies. Resultados exitosos se obtuvieorn en la aclimatación de vitroplantas de *Cymbidium mastersii,* las cueales fueron transferidas a potes con una mezcla de ladrillo y carbón mezclados con vermicompost como sustrato y alcanzaron porcentajes de sobrevivencia del 88 % después de 12 semanas de cultivadas (Mohanty, Paul, Das, Kumaría & Tandom, 2012). De manera similar se puede mencionar que vitroplantas de *Brassavola perinnii* y tres híbridos se trasplantaron en potes con sustratos a base de corteza de pino triturada, carbón vegetal y perlita colocados en casa de malla reductora de luz del 80 % arrojando sobrevivencia alta.

Por otro lado, Suñer, (1995) y Billard, *et al.* (2013) en pruebas de aclimatación con la especie terrestre *B. striata* obtuvieron el 95 % de las plántulas enraizadas y rebrotadas, adoptando un color verde intenso a los 30 días de cultivadas.

8. Conclusiones

Conclusions

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, se plantean las siguientes conclusiones:

- Para garantizar germinación adecuada de semillas en cultivo *in vitro* en especies de orquídeas silvestres de interés ecológico y económico, se precisan estudios detallados en relación con la madurez de las cápsulas, viabilidad de semillas, requerimientos nutricionales, suplementos orgánicos o fitohormonas. Se evidenció que la adición del carbón activado y agua de coco al medio MS a la totalidad de sales permitió potencializar la germinación de las semillas estudiadas en especies de hábitos epífitas como terrestres.

- La germinación de semillas en *Sobralia uribei* y *Santanderella amadorinconiana* fue efectiva en medio MS con la mitad de la concentración de las sales.

- La variabilidad en la respuesta a la germinación en las especies cultivadas en medio MS podría estar relacionada con la madurez de la cápsula y el genotipo.

- Se aporta conocimiento en la estructura microscópica de semillas de *C. mendelii, Sobralia uribei y Santanderella amadorinconiana.* y se reporta el proceso germinativo en *C. mendelii y S. uribei* en relación a la imbibición, rompimiento de la testa y formación de protocormos.

- Se ha generado conocimiento básico en cuanto a la propagación *in vitro* de los géneros de *Trichocentrum cebolleta, Cycnoches chlorochilon, Mormodes lucinatum, Catasetum lucis, Epidendrum ibaguense, Encyclia fragrans, Peristeria elata.* El estudio es útil como estrategia conservacionista del material genético de *Orchidiaceas* para la región de Santander con posibles aplicaciones ecológicas y económicas.

- A través de los diferentes ensayos realizados a lo largo del estudio se pudieron seleccionar los mejores medios de multiplicación y desarrollo de los protocormos para los géneros estudiados en cada una de las fases de multiplicación, donde se estimuló el desarrollo caulinar, foliar y radicular propicio para continuar el desarrollo posterior en ciertos sustratos.

- La adición de reguladores de crecimiento tales como ANA, BAP y KIN al medio MS mostraron ser esenciales para el crecimiento, desarrollo plantular de aspecto vigoroso, formación de raíces en *T. cebolleta, O. hastilabium* y *M. buccinator* con pocas diferencias entre los tratamientos empleados que permitieron el trasplante a sustrato.

- La formación de pseudobulbos fue manifiesta en plántulas de *P. elata* y *C. lucis* especialmente al final del cultivo *in vitro*, lo que permite considerarlo como un indicador del nivel de madurez y desarrollo adecuado para el trasplante *ex vitro* para estas especies.

- El uso de reguladores de crecimiento 0,3 mg/l ANA y 2 mg/l BAP favoreció la formación de pseudobulbos en *P. elata* y *C. lucis* especialmente al final del cultivo *in vitro.*

- *P. elata* de hábito terrestre creció bien en el medio MS a la totalidad de sales con agua de coco, reguladores hormonales con y sin carbón activado con una alta tasa multiplicativa desde los primeros estadios hasta el desarrollo requerido para la aclimatación.

- *Epidendrum ibaguense* y *Prostechea fragrans* crecieron bien en medio MS con y sin carbón activado.

- La combinación de auxinas como ANA y citoquininas como KIN y BAP garantizó en este trabajo el crecimiento de protocormos en los cuatro tratamientos, lo cual permite establecer que estos fitorreguladores

fueron funcionales fisiológicamente en concentraciones bajas tanto en *E. ibaguense* como en *P. fragrans*.

- Para el caso de *C. lucis* los resultados obtenidos señalan que el protocolo empleado para la producción *in vitro* de esta especie endémica de Santander puede ser utilizado para generar tasas multiplicativas elevadas sin que se alteren las poblaciones naturales existentes. Contario a lo planteado en diversos trabajos que afirman que el carbón activado en el medio inhibe la acción de los fitorreguladores, se encontró que en esta especie cultivada el efecto fue similar en medio con y sin carbón activado lo cual indica que los nutrientes y fitorreguladores no fueron afectados y pudieron ser absorbidos por las plantas de forma adecuada.

- Las variables tenidas en cuenta para la aclimatación de orquídeas tales como suministro de nutrientes, la selección de un sustrato, mantenimiento de la humedad ambiental, uso de malla reductora de luz del 50 y 70 %, manejo preventivo de enfermedades fúngicas y bacterianas fueron favorables para el proceso de aclimatación y endurecimiento de las vitroplantas desarrolladas.

9. Referencias

Literature cited

Abdelnour, A. & Muñoz, A. (1997). Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación in vitro de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Cartago, Costa Rica: *Instituto Tecnológico de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión*, 4-10.

Aguilar-Morales, M. & López-Escamilla, A. (2013). Germinación in vitro de Laelia speciosa (Kunth) Schltr, una herramienta para su conservación ex situ. *Estudios Científicos en el Estado de Hidalgo y Zonas Aledañas, 3*, 18-25.

Alvarado-Ulloa, C. (2000). Micropropagación de Cattleya skinneri y Cattleya skinneri x Cattleya maxima por cultivo de ápices. *Gayana Bot, 67*(1), 19-26.

Ángel, C. A., Tsubota, N., Leguizamón, J. E., Cárdenas, R., Chávez, B., Cadena, G. & Bustillo, A. (2001). *Enfermedades y plagas en Catleyas; antecedentes e investigaciones en Colombia*. Chinchiná, Colombia: Cenicafé.

Arditti, J. & Krikorian, A. D. (1996). Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society, 122*(3), 183-241.

Arditti, J. (1993). Lewis Knudson: plant physiologist and orchidologist. *Proceedings of the 14th World Orchid Conference. Glasgow*, 361-367.

Arditti, J. (2008). *Micropropagation of Orchids*. 2nd Edition. Oxford: Blackwell Publishing.

Arroyave, C. (29 de 08 de 2010). *Orquídeas de Celio Arroyave*. Obtenido de http://orquideasarroyave.blogspot.com/2010/08/cattleya-mendelii.html

Ávila-Díaz, I. & Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas, 8*(8), 138-149. https://doi.org/10.3847/2515-5172/aac887

Bakar, B., Abdul, L. M. & Gansau, J. A. (2014). Asymbiotic Germination and Seedling Development of Dimorphics lowii (Orchidaceae). *Asian Journal of Plant Biology, 2*(1), 34–40. Retrieved from http://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/AJPB/article/view/85.

Banks, D. (2005). *Orquídeas*. España: Edición Omega.

Billard, C. E., Dalzotto, C. A. & Lallana, V. H. (2013). Germinación de Bletilla striata (Thunb.) Rchb. f. en medio líquido y evolución de plantas en medio semisólido. *Investigación Agraria, 15*(1), 7-14.

Billard, C. E., Dalzotto, C. A., & Lallana, V. H. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género Oncidium. *Polibotánica,* (C), 145-157.

Bonilla, M. M., Aguirre, A. C., Yepes-Rapelo, D., Gallego D, E., & Tupac-Otero, J. (2016). Catasetum (Orchidaceae: Catasetinae) en Colombia: lista actualizada. *Revista Facultad de Ciencias Básicas, 12*(1), 22-35.

Bonilla, M., Hernández, O., & Aguirre, A. (2016). Distribución y preferencias climáticas de Sobralia uribei (Orchidaceae): una especie endémica de Santander, Colombia. *Luna Azul*, (43), 128-144. https://doi.org/10.17151/luaz.2016.43.7

Bonilla, M., Otero, J., & Durán, E. (2013). *Lista preliminar de Catasetinae (Orchidaceae) en Colombia*. Memorias VII Congreso Colombiano de Botánica, 544p.

Bonilla-Morales, M. M. & Aguirre M., A. C. (2016). Análisis espacial y conservación de Lepanthes magnifica Luer (Orchidaceae: Pleurothallidinae) en Colombia. *Orquideología, XXXIII* (June), 5-13.

Bonilla-Morals, M., Yepes-Rapelo, D., Otero, J. T., Bonila-Morales, M. M., Rapelo, D. A. Y., & Otero, J. T. (2014). Diversidad y distribución de Catasetum rectangulare G.F.Carr (Catasetinae: orchidaceae). *Orquideología, 31*(1), 15-25.

Bottom, S. (2017). Orchid plant parts and why they matter. St. *Augustine Orchid Society*, 1-4.

Buenavista, T. S. (2010). *A guide book in orchid micropropagation, the plant biotechnology project.* Mandaluyong, Filipinas: Rizal Technological University.

Calderón-Sáenz, E. (2006). *Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 6: Orquídeas, primera parte. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia.* Bogotá, Colombia: Instituto Alexander von Humboltdt - Ministerio de Ambiente.

Camargo-Celis, C., & Delgado-Cárdenas, C. A. (2006). *Flora Orchidaceae de La Mesa de los Santos* (Piedecuesta-Santander) (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Colombia.

Cameron, K. M. (2010). On the value of taxonomy, phylogeny, and systematics to Orchid Conservation: Implications for China's Yachang Orchid Reserve. *Botanical Review, 76*(2), 165-173. https://doi.org/10.1007/s12229-010-9052-x

Campbell, B. (27 de 08 de 2014). *Naturalista*. Obtenido de Orchid Species: https://www.naturalista.mx/lists/147934-Orchid-Species?page=2

Cañas, B. M. C. (1993). *Metodologías in vitro de vegetales.* Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.

Carnevali, G., Ramírez-Morillo, I., Romero-González, G., Vargas, C. & Foldats, E. (2003). *Orchidaceae.* (Vols. Vol. 7: Myrtaceae-Plumbaginaceae.). Missouri Botanical Garden, St. Louis: Timber Press.

Chávez, H. K., Mosquera, A. T. & Ospina, J. T. O. (2015). Propagación in vitro de semillas de la orquídea Comparettia falcata Poepp. & Endl.(Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronómica, 64*(2), 125-133.

Damon, A., Aguilar-Guerrero, A., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco. Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura, X*(2), 195-203. https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2002.05.025

De la Barrera, E., Díaz-Álvarez, E. A., Torres-Galeano, C. & Rojas-Cortés, Á. P. (2015). In vitro germination and development of two endangered endemic Colombian orchids Cattleya mendelii and Cattleya quadricolor. *Gaytana Bot, 72*(2), 213-220. https://doi.org/10.4067/S0717-66432015000200005

Dewir, Y. H., El-Mahrouk, M. E., Murthy, H. N., & Paek, K. Y. (2015). Micropropagation of Cattleya: Improved in vitro rooting and acclimatization. *Horticulture Environment and Biotechnology, 56*(1), 89-93. https://doi.org/10.1007/s13580-015-0108-z

Díaz, L., Namur, J., & Bollati, S. (2007). Micropropagación de cyrtopodium punctatum por cultivo de semillas. *Boletín Latinoamericano y del Ca-*

ribe de ..., 6, 395-396. Recuperado de: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617472040

Flachsland, E., Schinini, A., Terada, G., Furst, G., & Mronginski, L. A. (2005). Regeneración de plantas de Rhabdadenia Ragonesei (Apocynaceae) por cultivo in vitro de explantes foliares. *Bonplandia*, 91-96.

Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. T. (2008). Propagación in vitro de oncidium stramineum lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Chapingo Serie Horticultura, 14*(3), 347-353.

Galván-Carvajal, S. Y. & Rojas, A. (2010). *Flora amenazada, útil e invasura. Corporación Autónoma Regional para la defensa de la Meseta de Bucaramanga CDMB.* Bucaramanga: Tricolor Editores.

Goh, C. J. (1981). *Clonal propagation of orchids through tissue culture* [in Singapore]. Singapore: Malayan Orchid Review.

Grattapaglia, D. & Machado, M. A. (1998). Micropropagação. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, (1), 183-260.

Havrylchyk, O. & Poncet, S. (2007). Orquídeas de la Serranía de Grazalema. *The World Economy* (Vol. 30). Recuperado de: https://doi.org/10.1161/01.STR.32.1.139

Hidalgo, R. H. (2014). *Bases para el estudio de los recursos genéticos de especies cultivadas*. Bogotá, Colombia: Univ. Nacional de Colombia.

IUCN (1987). The IUCN position statement on translocation of living organisms: introductions, re-introductions and re-stocking. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. International Union for Conservation of Nature, Natural Resources. Species Survival Commission, International Union for Conservation of Nature, Natural Resources. Commission on Ecology, IUCN Commission on Environmental Policy, Law, & Administration.

Kalimuthu, K., Senthilkumar, R. & Vijayakumar, S. (2007). In Vitro micropropagation of Orchid, Oncidium sp. (Dancing Dolls). *African Journal of Biotecnology, 6*(10), 1171-1174. https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1007/s11239-017-1554-5

Kuan, C. & González, L. (1993). Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. *Instituto Nacional de Aprendizaje*, 1-16.

Lecoufle, M. (2008). *Atlás ilustrado de las orquídeas*. Madrid, España: Susaeta.

Lee Espinosa, H. E., Cerda, A. L., González, J. M., Martínez, P. E., Andreu, L. I., Rosas, B. G., ... & Buzzy, N. S. (2007). In vitro Regeneration of Laelia Anceps ssp. Dawsonii. *Revista Científica UDO Agrícola, 7*(1), 58-67.

Leles G. R. R., Pereira, M. D. & Vera, K. I. (2014). Germinação in vitro de sementes de Catasetum schmidtianum Miranda & Lacerda em diferentes geleificantes alternativos. *Enciclopedia Biosfera, 10*(18), 1862-1870.

López, H. (2011). *Orquídeas nativas de Santander. Gobernación de Santander*. 319 p.

Martínez, S., Bonilla, M. M., & López, H. (2016). Listado de la Flora Orchidaceae de Santander y Comentarios sobre sus Especies Endémicas. *Revista Facultad de Ciencias Básicas, 11*(2), 54. https://doi.org/10.18359/rfcb.1299

McKendrick, S. (2000). *In vitro germination of orchids: a manual. Ceiba Foundation for Tropical* .... Retrieved from http://orchideenvermehrung.at/downloads/seed sowing manual.pdf

Mohanty, P., Paul, S., Das, M. C., Kumaria, S., & Tandon, P. (2012). *A simple and efficient protocol for the mass propagation of Cymbidium mastersii: an ornamental orchid of Northeast India*. AoB plants.

Morales, I., Penacho, E., Quispe, E. (2004). *Producción in vitro y conservación de las orquídeas en Bolivia*. Santa Cruz, Bolivia: IV Reunión Nacional de biotecnología.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*(3), 473-497.

Nieto, C., Mogollón, N. & Torres, J. (2010). Desarrollo en vivero de vitroplantas de Dendrobium Lorrie Mortimer cultivadas en seis sustratos. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 44*(2).

Nongdam, P., & Tikendra, L. (2014). *Establishment of an efficient in vitro regeneration protocol for rapid and mass propagation of Dendrobium chrysotoxum lindl. Using seed culture. Scientific World Journal*. https://doi.org/10.1155/2014/740150

Ochoa, A. M. (24 de 04 de 1998). *La agonía de la diosa natura*. Obtenido de ciencia al día: http://aupec.univalle.edu.co/informes/abril98/natura.html

Orchids, V. (2002). *A Comprehensive Guide to Orchid Culture*. Brewster, New York: Orchid Culture.

Ordóñez, J. C. & Pulido, C. R. M. (2015). Orquideoflora de la Reserva Natural Quininí, Tibacuy, Cundinamarca, Colombia y consideraciones para su bioprospección. *Orquideología, 30*(1), 17.

Orejuela-Gartner, J. E. (2010). La conservación de orquídeas en Colombia y un caso en proceso en la cuenca del río Cali, municipio de Santiago de Cali, Valle del Cauca. *El hombre y la máquina, 35*, 53-66.

Ortega-Larrocea, M., Martínez-Palacios, A., & Chávez-Ávila, V. (2007). Conservación y propagación de orquídeas. *Conservación y Propagación de Orquídeas*, 483-495.

Ortiz, P. (2015). Tres nuevas especies y dos nuevos nombres de orquídeas de Colombia. *Orquideología, 25*(2), 119.

Ortiz, V. P. (1995). *Orquídeas de Colombia. Bogotá, Colombia: Corporación Capitalina de Orquideología*.

Otero, T., Ospina, J., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica, 58*(4), 270-276.

Panduro, G., & Aly, R. (2005). *Desarrollo de protocolo para la propagación in vitro del phragmipedium kovachii attwood dalstrom & Fernandéz (orchidaceae) a partir de semillas*. Argentina: Universidad Nacional de San Martín.

Pedroza-Manrique, J. A. (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.

Perea, M. (2001). *Biotecnología agrícola: Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*. Bogotá, Colombia: Guadalupe Ltda.

Pereira, M. D., Vieira A. & Vera K. I. (2014). *Crecimiento in vitro de Catasetum x apolloi benelli & grade (Orchidaceae) em meio de cultura com adi*. Brasil: Enciclopedia Biosfera.

Pérez-Martínez, B. A., & Castañeda-Garzón, S. L. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ conservation. *Biotecnología Vegetal, 16*(3), 143-151.

Pfahl, J. (1998). *Oncidium cebolleta (Jacq.) Sw. 1800 SECTION cebolletae*. Obtenido de http://www.orchidspecies.com/onccebolleta.htm

Pierik, R. L. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Dordrecht, Holanda: Ediciones Mundi-Prensa.

Ramírez D. F. (09 de 08 de 2010). *Clasificación taxonómica de las orquídeas nativas*. Obtenido de https://fernandoramirezdiaz.blogspot.com/2010/11/clasificacion-taxonomica-de-las.html?_escaped_fragment_

Rasmussen, H. N. (1995). *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.

Real Carrasco, S., Moreno Martínez, D., & Menchaca García, R. (2007). Cultivo de protocormos de Mormodes maculata var. unicolor L. O. Williams (orchidaceae). *Foresta Veracruzana, 9*(1), 55-59.

Reed, B. M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., & Pence, V. C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 47*(1), 1-4.

Rodríguez, L. (13 de 02 de 2005). *Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas*. doi:ISBN 959-250-156-4

Rodríguez, L., González, R., Alvarado, K., & Telles, E. (2007). Germinación asimbiótica in vitro de semillas de orquídeas silvestres. *Biotecnología Vegetal, 7*(3), 139-142.

Salazar Rojas, V. M., & Mata Rosas, M. (2003). Micropropagación y conservación de orquídeas mexicanas en el Jardín Botánico Calvijero. *Lankesteriana, 3*(2). https://doi.org/10.15517/lank.v3i2.23042

Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de Cattleya mendelii Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica, 61*(1).

Sampaio-Mayer, J. L., Carmello-Guerreiro, S. M., & Appezzato-da-Glória, B. (2011). Anatomical development of the pericarp and seed of Oncidium flexuosum Sims. *Flora, 206*(6), 601-609. https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.01.009

Samper K., C. & García M., H. (2001). *Estrategia Nacional para la Conservación de Plantas. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt*. https://doi.org/10.1166/jbmb.2014.1455

Sarmiento, J. (2007). La familia Orchidaceae en Colombia. A*ctualidades Biológicas, 29*(Supl 1), 21-84.

Schiff, J. L. (2018). *Rare and Exotic Orchids, their nature and cultural significance* (1st ed.). Mairangi Bay, Auckland, New Zeland: Springer.

Seaton, P. & Ramsay, M. (2005). *Growing orchids from seed. Royal Botanic Gardens, Kew.*

Singh, F. (1993). *In vitro orchid seed germination and cloning of orchids. En Plant Biotecnology Science Publishers, inc. Lebanon*, USA. p.289.

Suárez-Quijada, I., Hernández-Altamirano, M., Chávez-Ávila, V. M., Sandoval-Zapotitla, E., & Martínez-Palacios, A. (2007). Propagación in vitro y aclimatización de Euchile mariae (AMES) withner (ORCHIDACEAE). *Lankesteriana, 7*(1-2), 388-393.

Suñer, T. G. (1995). *Cultivo in vitro de orquídeas. Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*, (108), 99-100.

Surenciski, M. R., Flachsland, E. A., Terada, G., Mroginski, L. A. & Rey, H. Y. (2012). Cryopreservation of Cyrtopodium hatschbachii Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. *Biocell, 36*(1), 31-36.

Sutter, E. (1988). Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from in vitro culture. *J. Am. Soc. Hortic. Sci., 113*, 234-238.

Suzuki, R. M., Moreira, V. C., Pescador, R., & de Melo Ferreira, W. (2012). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of the threatened orchid Hoffmannseggella cinnabarina. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 48*(5), 500-511.

Terada, E. A., Mroginski, G., & Luis, A. (2000). *Regeneración de protocormos y yemas de Oncidium bifolium Sims por cultivo in vitro de láminas foliares. Plant Cell Reports*, (3400), 5-7. https://doi.org/10.1007/s00421-010-1649-6

Torres A., J., & Sanabria CH., M. E. (2011). Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía foliar de Cattleya jenmanii Rolfe y C. lueddemanniana RCHB.F. (Orichidaceae). *Acta Botánica Venezolana, 34*(1), 199-214.

Valencia-Duarte, J. E., & González-Garavito, F. (2004). Las orquídeas de San José de Suaita (Santander, Colombia). *Acta Biológica Colombiana, 9*(2).

Vidoz, M. L., Flachsland, E. A., Rey, H. Y., & Mroginski, L. A. (2008). Comportamiento ex vitro de Plantas de Brassavola perrinii (Orchidaceae) y de tres Híbridos Intergenéricos. *Ciencia y Técnica, 1*, 12-15.

Vieira, J. G. Z., Unemoto, L. K., Yamakami, J. K., Nagashima, G. T., de Faria, R. T., & de Aguiar, R. S. (2009). Propagação in vitro e aclimatização de um híbrido de Cattleya Lindl.(Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. *Científica, 37*(1), 48-52.

Wehner, U., Zierau, W., & Arditti, J. (2002). History-Biography. In T. Kull & J. Arditti (Eds.), *Orchid biology: reviews and perspectives, VIII* (1st ed., pp. 30-280). Estonia: Springer.

Wing, Y. T., Nair, H., Sin, H. C. & Arditti, J. (2002). Orchid seeds and their Germination: An historical account. (J. Arditti, & T. Kull, Edits.) *Chapter 7, In Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. VIII. Netherlands: Kluwer Academic Publisher.

Wing-Yam, T., & Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology*, (3), 1-56. https://doi.org/10.1007/s11816-008-0066-3

www.minambiente.gov.co. (05 de 05 de 2015). Obtenido de: http://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/1772-colombia-pais-con-mayor-numero-de-especies-de-orquideas-en-el-mundo

Yates, R. C., & Curtis, J. T. (1949). The effect of sucrose and other factors on the shoot-root ratio of orchid seedlings. A*merican Journal of Botany, 36*(5), 390-396.

Zettler, L. W. & McInnis, T. M. (1993). Symbiotic seed germination and development of Spiranthes cernua and Goodyera pubescens (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana, 8*(3), 155-162.

Acerca de los autores

Martha Rocío Chacón Velasco

Licenciada en Biología de la Universidad Industrial de Santander (UIS) y posterior titulación en Maestría en Microbiología Industrial en convenio con la Pontifica Universidad Javeriana y la UIS. Dedicada al estudio del cultivo de tejidos vegetales bajo la dirección de la Maestra Margarita Cañas durante el pregrado. Profesora de la Universidad de Santander en la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales por 25 años impartiendo la cátedra de Biología para estudiantes del área de Salud. Gestora de la cátedra Cultivo de tejidos vegetales del programa de Microbiología industrial. Apoyó la creación del laboratorio de tejidos vegetales y orquideario de la UDES e implementó un banco de germoplasma con cerca de 25 especies de orquídeas nativas de Santander y de otras regiones del país obtenidas por cultivo *in vitro* para contribuir a su conservación. Forma parte de la Asociación de Orquídeas de Santander; imparte talleres de Biología de las orquídeas.

Helmar Ernesto Cáceres

Maestro en Bellas Artes de la Universidad Industrial de Santander. Presidente de la Asociación de Orquídeas de Santander (ASORQUISAN) (2008-2010) y

actual Vicepresidente. Fotógrafo de la naturaleza y cultivador de orquídeas. Tallerista del cultivo de orquídeas. Participó en el proyecto cultivo *in vitro* de orquídeas de la UDES en el registro fotográfico y en la consecución de las cápsulas nativas. Asesor del proyecto Orquídeas de Virolin (Convenio con el Colegio Santuario de Virolin (2010-2018). Participó en la adaptación del libro *Viajes y aventuras de un cazador de orquídeas* en convenio con Libro Total.

Olga Marina Contreras Acero

Ingeniera Química de la UIS, Especialista en Computación para la Docencia de la UAN, Licenciada en Educación con Especialidad en Química. Docente de la IE Nuestra Señora del Pilar. Maestra Tutora de Colciencias Programa ONDAS 2003-2012 realizando trabajos de investigación con Orquídeas, Energías limpias, Producción de Micorrizas en Cacao, Huertas Caseras, Cultivo y utilización de Stevia en productos, logrando diferentes Premios a nivel nacional el Internacional. Merecedora de dos premios de Ecopetrol a la Innovación 2010 con trabajos sobre Orquídeas con la I.E. Nuestra Señora del Pilar, y Flora de la Quebrada Miraflores con la IE Oriente Miraflores. Asesora del Proyecto de Orquídeas de Colegio El Santuario de Virolin en Charalá desde al año 2010. Presidenta de la Asociación de Orquideologia de Santander durante ocho años. Dedicada al Cultivo de Orquídeas y su propagación *In Vitro*.