	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS	CÓDIGO	FO-GS-15
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN	VERSIÓN	02
		FECHA	03/04/2017
		PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ	
Jefe División de Biblioteca	Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad	

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): GUILLERMO JAVIER APELLIDOS: VALDERRAMA RIAÑO

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA AGRONOMICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): SEIR ANTONIO APELLIDOS: SALAZAR MERCADO

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA *IN VITRO* DE SEMILLAS DE *Cattleya gaskelliana* (N.E.BR) B.S. WILLIAMS Y *Cattleya warscewiczii*

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*. Esto debido a que estas especies enfrentan distintas amenazas en sus ecosistemas naturales. Se evaluó la viabilidad de semillas con la prueba de tetrazolio y la germinación asimbiótica *in vitro*, se evaluó las seis etapas de desarrollo de germinación en seis medios de cultivo. Dando como resultado, en primera medida que la viabilidad para *Cattleya gaskelliana* fue del 90,6% en concentración de tetrazolio del 0,5%, así como para la *Cattleya warscewiczii* fue de 90% en concentraciones del 0,25%, para los mismos tiempos de exposición (48 h). Mientras que los medios de cultivos más eficientes en la germinación de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, fueron los medios MS suplementados en jugo de piña y agua de coco, donde se encontraron excelentes resultados para su germinación y el desarrollo de plántulas en donde *Cattleya gaskelliana* fue de 90.7% y para la *Cattleya warscewiczii*, fue del 92,1% con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$; Tukey HSD), contribuyendo de esta manera al uso de componentes orgánicos con el fin de mejorar la germinación y desarrollo de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*.

PALABRAS CLAVES: germinación asimbiótica, viabilidad, germinación, tetrazolio, medios de cultivo

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 125 PLANOS: 0 ILUSTRACIONES: 10 CD ROOM: 1

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA *IN VITRO* DE
SEMILLAS DE *Cattleya gaskelliana* (N.E.BR.) B.S. WILLIAMS Y *Cattleya warscewiczii*.

GUILLERMO JAVIER VALDERRAMA RIAÑO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
SAN JOSE DE CUCUTA

2020

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA *IN VITRO* DE
SEMILLAS DE *Cattleya gaskelliana* (N.E.BR.) B.S. WILLIAMS Y *Cattleya warscewiczii*.

GUILLERMO JAVIER VALDERRAMA RIAÑO

Director
SEIR ANTONIO SALAZAR MERCADO
Magister en Práctica Pedagógica

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
SAN JOSE DE CUCUTA

2020

**ACTA DE SUSTENTACIÓN TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN**

FECHA: 06 de mayo 2020

HORA: 08:00 a.m.

LUGAR: Sustentación virtual

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO: modalidad Investigación: "EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA *IN VITRO* DE SEMILLAS DE *Cattleya gaskelliana* (N.E.BR) Bs. Williams Y *Cattleya Warscewiczii*."

JURADOS: LUZ YINETH ORTIZ ROJAS
ALINA KATIL CIGARROA RIECHE
ALBERTO SARMIENTO CASTRO

DIRECTOR: SEIR ANTONIO SALAZAR MERCADO

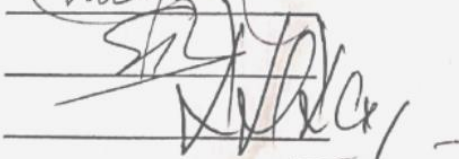
NOMBRE DEL ESTUDIANTE: GUILLERMO JAVIER VALDERRAMA RIAÑO.
CÓDIGO: 1620682

CALIFICACIÓN: 4,3

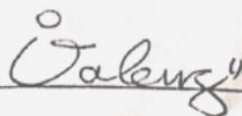
OBSERVACIONES:

APROBADO

FIRMA DE LOS JURADOS:



VoBo. Coordinador Comité Curricular





**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Cúcuta,

Señores
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS
Ciudad

Cordial saludo:

GUILLERMO JAVIER VALDERRAMA RIAÑO, identificado(s) con la C.C. N° 1090.367.748, autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA *IN VITRO* DE SEMILLAS DE *Cattleya gaskelliana* (N.E.BR.) B.S. WILLIAMS Y *Cattleya warscewiczii*, presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de INGENIERO AGRONOMO; autorizo(amos) a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que, con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que “**los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores**”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

1090.367.748 DE CUCUTA
FIRMA Y CEDULA

Resumen

En la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*. Esto debido a que estas especies enfrentan distintas amenazas producto de la invasión del hombre en sus ecosistemas naturales, ocasionado por la introducción a sus hábitats producto de actividades ganaderas, así como el incremento desmesurado de la tala de bosques nativos para el aumento de siembra de cultivos, lo que ha desplazado los hábitats naturales de estas especies, de igual forma los pesticidas están eliminando los agentes polinizadores lo que impide la oferta de semillas, pues eso ocasiona bajos niveles de supervivencia de las semillas en condiciones in vivo, motivo por el cual se hace necesario proponer alternativas que pretendan dar solución a esta problemática. Para esto se implementó un estudio experimental en donde se realizó a través de la observación e indagación de la evaluación en la viabilidad de semillas y las condiciones óptimas de germinación y desarrollo de plántulas en diferentes medios de cultivos para una futura conservación de especie en vía de extinción, dicho estudio tuvo en cuenta distintas variables y se desarrolló en distintos momentos, las cuales básicamente consistió en la recolección de capsulas maduras, provenientes del municipio de Bochalema, Norte de Santander. Se evaluó la viabilidad de semillas con la prueba de tetrazolio, se realizó un diseño experimental tipo factorial 2X2X5, en el cual se tiene dos concentraciones de tetrazolio (0,25% y 0,5%), en dos tiempos de exposición (24h y 48 h) y cinco pretratamientos (Control, Cloro 0,5%, Cloro 1%, H₂O₂, Sacarosa). En donde como resultados, en primera medida la viabilidad para *Cattleya gaskelliana* fue del 90,6% en concentración de tetrazolio del 0,5%, así como para la *Cattleya warscewiczii* fue de 90% en concentraciones del 0,25%, para los mismos tiempos de exposición (48 h). Para lo cual, el pretratamiento con Cloro al 1%, fue el más adecuado en la optimización de la viabilidad cuando se aplica la prueba de tetrazolio en las dos especies evaluadas. En cuanto, a la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, se realizó un diseño experimental tipo factorial 6X6, el cual consto de seis etapas de desarrollo de germinación y seis medios de cultivo experimentales que estuvieron compuestos por un medio de cultivo Murashige-Skoog (MS control, MS+ 0,5 mg*L⁻¹ GA₃, MS+0,5 mg*L⁻¹ AIA, MS+AC, MS+JP Y OSSM). Las semillas se desinfectaron y se cultivaron aplicando el método de la jeringuilla. con un porcentaje de germinación entre todos los medios de 89,18 % en *C. gaskelliana* y 91,35% en *C. warscewiczii* (P ≤ 0,05: Tukey HSD). Los medios de

cultivos más eficientes para la germinación de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* a las 18 semanas de cultivo fueron los medios MS suplementados en jugo de piña y agua de coco, donde se encontraron excelentes resultados para su germinación y el desarrollo de plántulas en donde *Cattleya gaskelliana* fue de 90.7% y para la *Cattleya warscewiczii*, fue del 92,1% con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$: Tukey HSD), con respecto a los demás medios de cultivo empleados en esta investigación., contribuyendo de esta manera al uso de componentes orgánicos con el fin de mejorar la germinación y desarrollo de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*.

Palabras claves: germinación asimbiótica, viabilidad, germinación, tetrazolio, medios de cultivo, componente orgánico.

Abstract

In the present investigation, the objective was to evaluate the viability and asymbiotic germination in vitro of *Cattleya gaskelliana* and *Cattleya warscewiczii* seeds. This is because these species face different threats as a result of the invasion of man in their natural ecosystems, caused by the introduction to their habitats as a result of livestock activities, as well as the excessive increase in the felling of native forests for increased crop planting. , which has displaced the natural habitats of these species, in the same way pesticides are eliminating pollinating agents, which prevents the supply of seeds, since this causes low levels of survival of the seeds in in vivo conditions, which is why makes it necessary to propose alternatives that seek to solve this problem. For this, an experimental study was implemented where it was carried out through the observation and investigation of the evaluation on the viability of seeds and the optimal conditions of germination and seedling development in different culture medium for a future conservation of species in the process of extinction, said study took into account different variables and was carried out at different times, which basically consisted of the collection of mature capsules from the municipality of Bochalema, Norte de Santander. The viability of seeds was evaluated with the tetrazolium test, an experimental 2X2X5 factorial design was carried out, in which there are two concentrations of tetrazolium (0.25% and 0.5%), in two exhibition times (24h and 48 h) and five pre-treatments (Control, Chlorine 0.5%, Chlorine 1%, H2Od, Sucrose). Where as results, firstly the viability for *Cattleya gaskelliana* was 90.6% in tetrazolium concentration of 0.5%, as well as

for *Cattleya warscewiczii* it was 90% in concentrations of 0.25%, for the same exposure times (48 h). For which, the pretreatment with 1% Chlorine was the most adequate in optimizing the viability when the tetrazolium test is applied in the two evaluated species. As for the in vitro asymbiotic germination of *Cattleya gaskelliana* and *Cattleya warscewiczii* seeds, a 6X6 factorial type experimental design was made, which consisted of six stages of germination development and six experimental culture medium that were composed of a Murashige-Skoog culture (Control (MS), MS + 0.5 mg * L-1 GA3, MS + 0.5 mg * L-1AIA, MS + AC, MS + JP, and OSSM). The seeds were disinfected and cultivated using the syringe method. with a germination percentage among all the mediums of 89.18% in *C. gaskelliana* and 91.35% in *C. warscewiczii* ($P \leq 0.05$: Tukey HSD). The most efficient culture mediums for the germination of *Cattleya gaskelliana* and *Cattleya warscewiczii* at 18 weeks of culture were the MS medium supplemented in pineapple juice and coconut water, where excellent results were found for their germination and seedling development where *Cattleya gaskelliana* was 90.7% and for *Cattleya warscewiczii*, it was 92.1% with statistically significant differences ($P \leq 0.05$: Tukey HSD), with respect to the other culture medium used in this investigation., Contributing from this way to the use of organic components in order to improve the germination and development of *Cattleya gaskelliana* and *Cattleya warscewiczii*.

Key words: Asymbiotic germination, viability, germination, tetrazolium, culture medium, organic components.

DEDICATORIA

A Dios, por dame la fuerza, el impulso, la motivación y sostenerme en tiempos de crisis, a mis padres porque todo lo que soy se lo debo a ellos y por inculcarme la importancia de estudiar y superarme cada día más, a mi hija y a mi esposa, por el estímulo y apoyo incondicional en todo momento y ser la inspiración y fundamento en terminar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A Dios,

Por darme sabiduría, discernimiento, entendimiento y fuerza para culminar con éxito esta etapa académica.

A mi madre María Victoria Riaño Ramírez.

Por ser mi guía, mi sustento y por impulsarme cada día a ser mejor a creer en mis capacidades y apoyarme incondicionalmente en la culminación de mis estudios profesionales.

A Magister Seir Antonio Salazar Moncada, mi director de tesis.

Por su guía, comprensión, paciencia, entrega y valiosos consejos a lo largo del proceso de la investigación.

A mi Esposa Hazbreidy Katherine Merchán Camargo.

Por su amor, su entrega, su paciencia, su apoyo y entrega incondicional, en cada proceso y circunstancia de la vida y por motivarme y ayudarme en el desarrollo del proceso de investigación culminado.

A mi hija Annaly Victoria Valderrama Merchán.

Por ser mi constante inspiración, motivación, impulso y el soplo de mi vida

A la universidad Francisco de Paula Santander.

Por formarme y darme las bases necesarias para asumir el Título de Ingeniero Agrónomo, basado en principios de compromiso social, responsabilidad y eficiencia, así como permitirme utilizar las distintas dependencias e implementos de laboratorio para el desarrollo de esta investigación.

Tabla de contenido

Introducción	21
1. Problema	24
1.1 Titulo	24
1.2 Planteamiento del problema	24
1.3 Formulación del problema	27
1.4 Justificación	27
1.5 Objetivos	30
1.5.1. Objetivo general	30
1.5.2. Objetivos específicos	31
1.6 Delimitaciones	31
1.6.1 Espacial	31
1.6.2 Temporal	32
2. Marco referencial	33
2.1 Antecedentes	33
2.2 Marco teórico	39
2.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	39
2.2.2 Micropropagación	41
2.2.3 Morfogénesis <i>in vitro</i>	44
2.2.3.1 Organogénesis	45
2.2.3.2 Embriogénesis somática.	46
2.2.3.3. Embriogénesis cigótica	51
2.2.4 Generalidades de las orquídeas	53
2.2.5. Germinación <i>in vitro</i> de las Semillas de Orquídeas	58
2.2.5.1 Germinación <i>in vitro</i> simbiótica	60
2.2.5.2 Germinación <i>in vitro</i> asimbiótica	60
2.3 Marco legal	61
Constitución Política de 1991	61
Ley 99 de 1993, ley del medio Ambiente	62
Ley 299 de 1996, protege la flora colombiana	62
Resolución 956 de 2010, declara como año nacional de la orquídea	63
Ley 115 de 1994, ley general de educación.	63

3. Diseño metodológico	64
3.1 Tipo de investigación	64
3.2 Población y muestra	64
Población	64
Muestra	65
3.3 Hipótesis	65
Hipótesis investigativa (HI)	66
Hipótesis nula (HO)	66
3.4 Variables	66
Variables Dependientes	66
Variables independientes	66
Variables intervinientes	67
3.5 Diseño instrumental	68
3.5.1 Instrumentos	68
3.5.2 Técnicas de recolección de datos.	71
Lista de cotejo	71
Experimento	72
Observación cuantitativa	73
3.6 Fases de la investigación	73
Fase I: Preparación del material experimental	73
Material vegetal	74
Preparación de medios de cultivo	74
Fase II. Análisis experimental de las semillas	76
Pre acondicionamiento y viabilidad de las semillas	76
Fase III: Evaluación de medios de cultivo	77
Desinfección del material, Siembra de cultivo	77
Desarrollo fenológico	78
3.7 Técnicas de análisis	79
Viabilidad de semillas	79
Germinación en medios de cultivos	80
4. Resultados y análisis	83
4.1. Efecto de los pretratamientos en el porcentaje de viabilidad de las semillas de <i>Cattleya gaskelliana</i> y <i>Cattleya warszewiczii</i>	83

4.2. Germinación de las semillas en medios de cultivo <i>in vitro</i> para la germinación asimbiótica de semillas de las especies <i>Cattleya gaskelliana</i> y <i>Cattleya warscewiczii</i> .	89
5. Conclusiones	96
6. Recomendaciones	98
Referentes bibliográficos	99
Anexos	124

Listado de figuras

	PAG.
Figura 1. Preparación de explante y establecimiento in vitro. (Vitrocultivo 2018).	40
Figura 2. Etapas del cultivo de tejidos vegetales. (Rojas, 2015).	43
Figura 3. Esquema general de organogénesis (Rosales, 2006).	46
Figura 4. Esquema del Ciclo de vida del Paraíso cultivado in vitro. (Gonzales, 2005)	51
Figura 5. Embriogénesis cigótica. Sánchez et al (2003)	52
Figura 6. Partes de la orquídea según tipo de crecimiento. (Asoc. Jalisciense de orquideología,2015).	54
Figura 7. Partes de la flor de la orquídea. (Asociación Jalisciense de orquideología,2015)	57
Figura 8. Proceso de siembra de <i>C. gaskelliana</i> y <i>C. warszewiczii</i> . (A). Lavado de material de vidrio. (B). Material de uso (servilletas, papel aluminio, papel Kraft, gasa) en la siembra in vitro. (C). Esterilización de material de vidrio y de uso en la siembra. (D y E). Desinfección de las capsulas. (F). Corte longitudinal de las capsulas (G y H). Siembra en los medios de cultivos de estudio con método de la jeringuilla. (I) . Visualización de la germinación en estereoscopio.	79
Figura 9. Viabilidad de semillas usando la prueba de tetrazolio. (A) Semillas viables (coloración roja) y no viables (color normal) de <i>C. gaskelliana</i> (B) Semillas viables y no viables de <i>C. warszewiczii</i> . V: Viable. NV: No viable.	84
Figura 10. Etapas del desarrollo de <i>C. gaskelliana</i> . (A) Flor (B) Capsula (C). Fase 0. (D). Fase 1. (E) Fase 2. (F) Fase 3: Protocormo (G) Fase 3: Protocormo con rizoides. (H y I). Fase 4: Aparición de la primera hoja. (J) Fase 5: Elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior.	93

Listado de tablas

	PAG
Tabla 1 Operacionalización de variables de investigación	67
Tabla 2 Formato de registro y seguimiento para germinación de la <i>C. gaskelliana</i> y <i>C. warscewiczii</i>	69
Tabla 3 Formato de evaluación y seguimiento para viabilidad de semillas	70
Tabla 4 Medios de cultivo utilizados en el desarrollo de las semillas de <i>Cattleya gaskelliana</i> y <i>C. warscewiczii</i> .	75
Tabla 5 Descripción de las etapas de desarrollo fenológico	78
Tabla 6 Diseño experimental de viabilidad de semillas	80
Tabla 7 Diseño experimental para medios de cultivo	81
Tabla 8 Prueba de tetrazolio en semillas de <i>C. gaskelliana</i> utilizando diferentes pretratamientos	85
Tabla 9 Prueba de tetrazolio en semillas de <i>C. warscewiczii</i> utilizando diferentes pretratamientos.	86
Tabla 10 Porcentaje de germinación en las semillas de orquídeas de <i>C. gaskelliana</i> y <i>C. warscewiczii</i>	88
Tabla 11 Efecto del medio de cultivo en la germinación y formación de plántulas de <i>C. gaskelliana</i> a las 18 semanas de desarrollo.	90
Tabla 12 Efecto del medio de cultivo en la germinación y formación de plántulas de <i>C. warscewiczii</i> a las 18 semanas de desarrollo.	92

Listado de anexos

	PAG.
Anexo 1 Formato de registro y seguimiento semanal de las fases de desarrollo fenológico en <i>C. gaskelliana</i> y <i>C. warscewiczii</i>	124
Anexo 2 Formato de observación de semillas viables de <i>C. gaskelliana</i> y <i>C. warscewiczii</i>	125

Glosario

Agar. Es un gel incoloro e insípido y absorbe agua que varía entre 200 y 300 veces su peso formando una gelatina. Es utilizado para preparar medios de cultivos, excipientes, agentes suspensor y emulsificante (Fonnegra & Jiménez, 2007). El Agar es obtenido a partir de algas marinas de la familia Rhodophyceae que se encuentran en el océano pacífico, indico y el mar de Japón y tiene características como solubilidad en agua, resistencia a la actividad de la mayoría de microorganismos, fusión a 98°C y solidificación entre 42 y 45°C (Rodríguez *et al.*, 2005).

Asepsia. Conjunto de procedimientos encaminados a preservar el organismo de gérmenes infectivos (Perez, 1974). Permitiendo que los microorganismos no pueden destruir tales cultivos y no puedan competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Para establecer cultivos asépticos es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivos, desinfectar superficialmente los explante, liberándolos de bacterias y hongos exógenos y respetar ciertas normas de asepsia (Roca & Mroginski, 1991).

Auxinas. Fueron descubiertas por Went en 1926, en cual denominó a esta sustancia química auxina, del griego auxein que significa *aumentar* el cual es reconocido por su papel en la regulación de la elongación celular. (Raven *et al.*, 1992). Las auxinas estimulan el alargamiento vegetal, interviene en el fototropismo, el geotropismo, la dominancia apical y la diferenciación vascular e induce en la formación de raíces adventicias (Curtis & Schnek, 2008).

AIA. El ácido 3- indolacético (AIA), es una auxina, la más abundante y fisiológicamente, la más relevante, debido a que tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y la formación de raíces adventicias en hojas y tallos cortados. (Taiz & Zeiger, 2006). Esta fitohormona, se sintetiza en los

meristemas apicales de los tallos y las hojas jóvenes, los frutos en desarrollo y las semillas. (Jung *et al.*, 2001; Flòrez & Cruz, 1994).

Célula. Es la unidad básica de la vida, su organización y tamaño son críticos para el mantenimiento de la homeostasis y su tamaño y forma se adaptan para cumplir esta función. (Solomon *et al.*, 2011). La célula es una unidad anatómica más pequeña de la materia, capaz de realizar funciones fisiológicas de los seres vivos y tiene la capacidad de dar origen a otras células y estas se reproducen para perpetuar la especie (Campos, 2002).

Contaminación microbiana. Es cualquier inóculo, cualquier patógeno (hongos, bacterias), que se introducen dentro de un medio de cultivo en el cual este un explante y prolifera afectando dicho cultivo. (Stanier & Villanueva, 1996).

Cultivo de tejidos vegetales. Es una técnica, en el cual las células se aíslan de las plantas y se hacen crecer en un medio de nutriente. (Solomon *et al.*, 2011).

Explante. Es el órgano, tejido o fragmento de tejido, célula, etc., extraído del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. Hay factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico que tienen una importancia de acuerdo al objetivo perseguido (Abdernour & Vicent, 1994).

Fenolización. Pardeamiento enzimático causado por la oxidación de los compuestos fenólicos de la vacuola por las enzimas polifenoloxidasas, que se encuentran en los demás organelos de la célula generalmente en la mitocondria y plástidos provocando la coloración negra del tejido (Pérez, 2005).

Genotipo. Se refiere a la composición genética que tiene un organismo, que es más frecuentemente expresado en símbolos (Solomon *et al.*, 2011).

Giberelinas. Fitohormona, aislada por primera vez del hongo *Giberella fujikuroi*, regula el crecimiento y el desarrollo de los vegetales superiores. (Azcon & Talon, 2000). Estimula el alargamiento del vástago; estimula el crecimiento desmandado y la floración en las plantas bienales; regula la producción de enzimas hidrolíticas en los granos, interrumpe la dormición (Curtis & Schnek, 2008).

Hormona. Son reguladores químicos que participan en el crecimiento y desarrollo y la actividad metabólica de las plantas (Curtis & Schnek, 2008). Son mensajeros químicos que transmiten mensajes de una parte del organismo a otra, son importantes en la señalización celular. (Solomon *et al.*, 2011).

In Vitro. Se le llama *in vitro*, debido a que se cultiva en recipientes de vidrio y en estos consiste cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas (Abdenour & Vicent, 1994).

Luz. En condiciones *in vitro*, la intensidad y la calidad de la luz es muy bajo (10 W/m² en comparación de condiciones normales). La calidad de la luz también es muy baja y se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para obtener diferentes longitudes de ondas. El espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros. Dos fenómenos importantes dependen de la luz son: fotosíntesis y fotomorfogénesis (Abdenour & Vicent, 1994).

Micropropagación. Es una forma de propagación vegetativa empleando la técnica de cultivo de tejidos, desarrollándose bajo condiciones asépticas controladas, con ella se garantiza grandes volúmenes de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria (Sandoval, 1985; Arias & Valverde, 1988).

Protocormo. Estructura tuberosa que se forma tras la germinación de las semillas de orquídeas y a partir de la cual se desarrolla una planta completa. Tal estructura proviene de un embrión no organizado y solo contiene unos pocos cientos de células. En cultivos *in vitro*, los explantes vegetativos de varias especies de orquídeas forman protocormos redondos y lisos que pueden multiplicarse indefinidamente o inducirse para regenerar una planta completa (Jáuregui & Chávez, 2006).

Semillas de orquídea. Son polvorosas y carecen de endospermo, por tal razón tiene pocas reservas energéticas para su germinación y establecimiento en el medio natural (Manrique *et al.*, 2016).

Totipotente. Es la capacidad de las células vegetales de regenerar plantas enteras a partir de una o muy pocas células en cultivo *in vitro* (Azcón & Talón, 2000).

Introducción

Las orquídeas pertenecen a la familia *Orchidaceae*, son plantas herbáceas perennes, su origen se remonta hace más de 60 millones de años en las zonas templadas de Asia y América del Norte, sitios en los que antes había bosques subtropicales o templados calientes. Se estima que debe haber alrededor de 35.000 especies de orquídeas en todo el mundo, pertenecientes a unos 750 géneros distintos, además de miles de híbridos que se multiplican cientos por cada año, estas poseen un mayor riesgo de extinción en el mundo (Abbas *et al.*, 2011, Thorpe & Yeung, 2011, Zhang *et al.*, 2015), debido a su poder evolutivo ya que, se han presentado una gran variedad morfológica (Nagaraju & Mani, 2005).

En Colombia, según datos más recientes, se registran 4.010 especies, distribuidas en 260 géneros (Mejía & Pino, 2010). Son abundantes en los trópicos, aunque también hay especies en las zonas templadas con rangos altitudinales que varían desde el nivel del mar hasta los subparamos. Algunas viven sobre las ramas de los árboles (epífitas), otras en el suelo, sobre rocas e incluso en ambientes subterráneos o semiacuáticos (Escobar & Múnera, 1990). En Norte de Santander se han descrito 37 géneros y 105 especies, dentro de los que se destaca *Cattleya mendelii* (Díaz *et al.*, 2004).

La familia *Orchidaceae* se encuentra en latente amenaza, dado a la pérdida de sus ecosistemas naturales, siendo las orquídeas epífitas las más vulnerables, debido a que estas se sitúan en selvas y bosques, los cuales son blanco de actividades antropogénicas del hombre (Ramírez,

1990). Esto sumado a lo ocasionado por la introducción de sus hábitats producto de actividades ganaderas, así como el incremento desmesurado de la tala de bosques nativos para el aumento de siembra de cultivos, lo que ha desplazado los hábitats naturales de estas especies, de igual forma los pesticidas están eliminando los agentes polinizadores lo que impide la oferta de semillas, pues eso ocasiona bajos niveles de supervivencia de las semillas en condiciones *in vivo* (Franco *et al.*, 2007). De igual modo la reproducción en estado silvestre de las semillas de orquídeas es demorada y depende de diversos factores ambientales, tales como la humedad, la temperatura y la luz. Finalmente, las orquídeas tienen algunas limitaciones en las que se destacan la poca reserva de nutrientes en el embrión y la simbiosis con un hongo micorriza específico para cada especie (Chen & Chen, 2007).

Dada las limitaciones que las orquídeas presentan a nivel ambiental, reproductivo y el efectuado por el hombre, se deben determinar estrategias que permitan la propagación y conservación de las especies que se encuentran en peligro de extinción (Bhattacharyya *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2015; Salazar, 2012). Por ello la técnica *in vitro*, resulta ser la más viable, ya que esta permite la germinación de las semillas y la propagación a través de medios de cultivo suplementados con carbohidratos, sales basales, vitaminas, minerales y hormonas (Kauth *et al.*, 2011; Arditti y Ghani, 2000; Knudson 1946; Kim *et al.*, 2019). A su vez varios autores complementan los medios de cultivos con componentes orgánicos (Gallo *et al.*, 2016; Salazar *et al.*, 2013; Salazar & Cancino, 2012).

Por lo anterior, es que gesta la necesidad de aumentar el conocimiento sobre estas especies, así como desarrollar metodologías e implementar técnicas *in vitro*, puesto que estas resultarían de gran importancia para garantizar la multiplicación, conservación y a largo plazo una reintroducción a sus hábitats naturales. De allí la relevancia de esta investigación que radica en evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*. Puesto que esta contribuye en generar un conocimiento desde la academia en la propagación, conservación y germinación de semillas en condiciones *in vitro*.

1. Problema

1.1 Título

Evaluación de la viabilidad y germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya gaskelliana* (n.e.br.) B.S.Williams y *Cattleya warscewiczii*.

1.2 Planteamiento del problema

La investigación denominada *evaluación de la germinación asimbiótica in vitro de semillas y desarrollo de Cattleya gaskelliana y Cattleya warscewiczii* se basó en ser un estudio de corte experimental en el cual su intencionalidad estuvo guiada a la conservación y a la diversificación de sus distintas especies independientemente su connotación, empleando como base el método para la germinación de semillas de orquídeas con interés Hortícola descubierta por Moore (1849), e implementando los procedimientos prácticos desarrollados por Kudson (1946), los cuales están orientados a la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas, en donde se demostró que las semillas eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro* y que solo se necesitaba un medio simple que contuviera minerales y azúcares.

Por lo cual en este estudio se buscó desarrollar estrategias de conservación, multiplicación de las orquídeas en condiciones *in vitro* encaminadas a determinar medios de cultivos óptimos para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas de especies *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* , dado que estas en condiciones naturales, es decir en su estado silvestre presenta

algunas limitaciones, como lo es la poca reserva alimenticia, lo cual conlleva, a que exista una relación simbiótica con un hongo micorriza para que puedan germinar en condiciones naturales (Rasmussen *et al.*, 1995; Chen & Chen, 2007), haciendo aún más complicada su germinación, por ello la técnica de cultivo *in vitro* resulta ser una alternativa eficaz para la conservación de especies de orquídeas en peligro de extinción (Kitsaki *et al.*, 2004; Philip *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2007). Ya que estas especies deben coexistir con amenazas latentes en sus ecosistemas naturales.

Siendo esta la mayor problemática que presenta la familia de las *Orchidaceae* en sus distintas especies, puesto que diversas investigaciones de corte internacional y nacional han demostrado la inminente amenaza de extinción a la cual esta se enfrenta, producto de las invasiones atípicas en sus hábitats naturales en sus distintas modalidades; por ello se han realizado distintos estudios los cuales están orientadas a la propagación, y germinación de estas especies en condiciones controladas para mitigar en gran medida dicha problemática, encontrando al desarrollo de los mismos índices favorables para la conservación de estas especies así como lo menciona Pedrosa *et al.* (2005) en donde evaluaron el efecto de tres reguladores de crecimiento en la germinación de semillas de *Comparettia falcata* bajo condiciones *in vitro*. encontraron que la combinación de las hormonas ácido giberélico en concentraciones de 15 μ M en el medio de cultivo básico MS, produce un efecto sinérgico que causa una respuesta positiva en el porcentaje de germinación de semillas (100%) y desarrollo de las plántulas. Asimismo, Rodríguez *et al.* (2007), comprobó la germinación de semilla de 15 especies diferentes, en condiciones controladas en las cuales implementaron distintos medios de cultivos, los cuales arrojaron respuestas favorables y significativas en la propagación, conservación y multiplicación de semillas de orquídea.

Por lo anterior y teniendo en cuenta que en Norte de Santander se han desarrollado algunos estudios de cultivo *in vitro* en orquídeas del género *Cattleya* y han aportado hallazgos significativos en la diversificación de la especie, se gestó esta investigación, en la cual su importancia radica en la necesidad de evaluar esta técnica de propagación que permitía la regeneración y/o multiplicación masiva de orquídeas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warszewiczii* por medio de la germinación asimbiótica de sus semillas, utilizando los medios artificiales empleados en cultivo de tejidos vegetales; aspecto que contribuye a la recuperación de esta especie de orquídea, ya que se encuentra en vía de extinción a causa de la intervención antropogénica en sus hábitats naturales y a los bajos niveles de supervivencia que tienen sus semillas en condiciones *in vivo*. (Franco *et al.*, 2007). Es por ello que desde la academia y los espacios investigativos se buscó implementar estrategias que contribuyan a hacerle frente a esta situación, por ello se han desarrollado en los últimos años distintos estudios donde buscan minimizar con la germinación *in vitro* los efectos antropogénicos e incentivar de forma eficaz y efectiva la propagación de estas especies en condiciones controladas.

En Norte de Santander la germinación y propagación de estas especies no es muy frecuente, ya que por condiciones climáticas solo se encuentran en ciertos pisos térmicos con condiciones favorables para su germinación, sino que a su vez se enfrenta a distintas amenazas producto de la invasión del hombre en sus ecosistemas naturales, ocasionando la introducción de subhábitats producto de actividades ganaderas, así como el incremento desmesurado de la tala de bosques nativos para el aumento de siembra de cultivos, lo que ha desplazado los hábitats naturales de estas especies, de igual forma los pesticidas están eliminando los agentes polinizadores lo que impide la oferta de semillas, pues eso ocasiona bajos niveles de supervivencia de las semillas en condiciones

in vivo, motivo por el cual se hace necesario proponer alternativas que pretendan dar solución a esta problemática en la flora nacional.

1.3 Formulación del problema

¿Al evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* se permitirá determinar la germinación y el desarrollo de las plántulas aplicando la técnica de propagación *in vitro*?

1.4 Justificación

El interés especial que se tiene por las orquídeas se debe principalmente a su valor ornamental frente a la creciente demanda internacional. El cultivo y exportación de orquídeas resulta ser una importante alternativa económica. (Tombolato & Costa, 1998; Ferreira & Suzuki, 2008).

La importancia de éste proyecto radica en la necesidad de evaluar una técnica de propagación *in vitro* para las especies de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, (Ramos & Carneiro, 2007) con el propósito de realizar un estudio que permita determinar el medio de cultivo más óptimo, logrando de esta manera establecer el tratamiento indicado desde la fase de germinación hasta la formación de plántulas, el cual permitirá a partir de la germinación

asimbiótica de sus semillas, obtener grandes volúmenes de material vegetal en cortos periodos de tiempo. (Murashige & Skoog, 1962).

La técnica de cultivo *in vitro* permite la utilización de diferentes medios artificiales más complejos que para la germinación asimbiótica, los cuales contribuyen a la propagación de una gran cantidad de plantas sin la intermediación mutualista del hongo requerida por la semilla para su desarrollo. Tal característica se debe al tamaño que presentan las semillas de orquídeas y a su poca reserva alimenticia, por consiguiente, la germinación tiene más probabilidad de éxito por medio del cultivo *in vitro*, teniendo en cuenta la disponibilidad de los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares están disponibles para la orquídea en una forma apropiada (Mckendrick *et al.*, 2000).

Resultando así una alternativa eficaz para la conservación de especies de orquídeas, dado que, al tener la posibilidad de germinación de estas especies en condiciones controladas, se contribuye en gran medida en el desarrollo y sustentabilidad de las especies, las cuales cada día presentan cambios significativos que determinan la dinámica ambiental existente.

De este modo, el impacto que generara este estudio, se enmarca en cuatro escenarios particulares: el académico, educativo, el ambiental y el económico. Desde lo académico este estudio contribuye de alguna manera a develar una parte de la dinámica de propagación, germinación, conservación y multiplicación de las especies de orquídea a partir de la implementación de medios de cultivos compuestos y la aplicación de la prueba de tetrazolio como

medio eficaz para determinar la viabilidad de las semillas, con distintos procedimientos prácticos que conllevan al brote de las semillas en periodos cortos y con alta favorabilidad de germinación, lo que se pretende es llegar a un conocimiento más profundo en cuanto a la determinación de medios de cultivos desde bases vegetales, los tiempos de exposición, las variables de conservación durante el desarrollo fenológico de las semillas y los distintos factores intrínsecos presentes en el proceso de germinación.

El presentar información detallada a través de un estudio descriptivo, pretende contribuir también a que los estudiantes y profesionales dedicados al estudio de estas temáticas, adquieran conocimiento acerca conservación, germinación y multiplicación de semillas en condiciones in vitro, ya que estas configuran elementos esenciales para el desarrollo y preservación de las especies en sus ecosistemas naturales. para de esta manera aportar elementos esenciales en la intervención que se haga en este campo, y por ende los resultados y las experiencias sea más efectivas y significativas.

Es importante resaltar también que en la actualidad se ha realizado pocas investigaciones a nivel de instituciones de educación superior, que aporten información acerca de la relevancia que tienen la preservación y conservación de estas especies en condiciones controladas.

En lo educativo se pretende dar a conocer información de primera mano, que permita saber más profundamente acerca de la temática, que contribuya a minimizar los impactos negativos de las acciones antropogénicas que afectan los ecosistemas, de la misma manera se busca de manera

holística, resaltar y determinar cuáles medios de cultivo se puede implementar para la germinación de semillas. De la misma manera esta investigación pretende adicional a todos los aspectos mencionados con anterioridad, que los estudiantes y profesionales de áreas interesadas, se motiven a desarrollar estrategias de conservación y multiplicación de especies en peligro de extinción de sus ecosistemas naturales, a fin de realizar innovaciones, cambiar perspectivas ambiguas y crear nuevas estrategias de desarrollo para propagación, y multiplicación de semillas.

En el ámbito ambiental, se pretende avanzar de forma significativa en la mitigación de la amenaza de extinción que sobre estas reposan ya que el resultante de la germinación *in vitro* es la multiplicación y conservación de esta, buscando en su desarrollo generar la posibilidad de multiplicación masiva de las orquídeas, lo que sería beneficioso para la conservación de la especie y finalmente a nivel económico tendría un impacto positivo y favorable dado que el valor ornamental que este tiene a nivel internacional es muy alto, esto sumado a la alta demanda de exportación, que estas tiene en los mercados comerciales, lo que aumentaría lo ingresos económicos y el incremento PIB lo que posicionaría económicamente mejor al país.

1.5 Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*.

1.5.2. Objetivos específicos

Determinar el pretratamiento más adecuado para optimizar la viabilidad de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* utilizando la prueba de tetrazolio.

Evaluar los porcentajes de germinación de las semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*.

Determinar el medio de cultivo *in vitro* más adecuado para la germinación asimbiótica de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*.

1.6 Delimitaciones

1.6.1 Espacial

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología vegetal de la sede de *Campos Elíseos* de la Universidad Francisco de Paula Santander, que se encuentra ubicada en el municipio de Los Patios, en el departamento de Norte de Santander. La muestra será recolectada en el restaurante y vivero “El orquidial”, ubicado en el municipio de Bochalema.

1.6.2 Temporal

El desarrollo del presente proyecto de investigación se llevó a cabo durante un periodo de seis meses.

2. Marco referencial

2.1 Antecedentes

El primer método para la germinación de semillas de orquídeas con interés Hortícola (Arditti, 1984; Yam *et al.*, 2002) fue un cambio importante y radical de la manera en que otras semillas de orquídeas fueron germinadas hace 160 años; el estudio de David Moore (1807–1879) fue un avance innovador a nivel biológico y para la horticultura (Moore, 1849). Medio siglo después del descubrimiento de Moore, Noël Bernard (1874–1911) formuló un método para la germinación simbiótica de semillas de orquídeas *in vitro* (Arditti, 1990; Rasmussen, 1995; Yam *et al.*, 2002).

Lewis Knudson (1884–1958), desarrolló un método para la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas (Knudson, 1921; Yam *et al.*, 2002), el cual fue el primer procedimiento práctico para la propagación *in vitro* de cualquier planta en condiciones axénicas, demostrando que era posible la germinación sobre un medio simple que contuviera minerales y azúcares, La investigación desarrollada por Knudson conmocionó en el mundo de las orquídeas, al demostrar que las semillas de *Cattleya*, *Vanilla* y otras orquídeas eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro* (Knudson, 1946). Otros autores como Arditti (1982) y Fast (1980) han contribuido en la formulación de medios de cultivos para muchos géneros y especies diferentes.

El medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), se ha probado para la germinación y crecimiento de muchas especies de orquídeas, obteniendo resultados óptimos debido a su contenido

de sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos la cual le brindan un alto grado de nitrógeno y potasio necesario para su nutrición. Es de destacar que en el cultivo *in vitro* de semillas de orquídeas se ve favorecido con la adición de suplementos orgánicos y *fitohormonas* al medio de cultivo (Malgren, 2006; Arditti, 2008; Pedrosa, 2009).

Para determinar la viabilidad de las semillas de orquídeas se ha aplicado la prueba de tetrazolio, las semillas viables se tiñen de rojo, mientras que las no viables quedan del color natural de la semilla (Ossenbach *et al.*, 2007).

Se han realizado diversos estudios a nivel internacional, que buscan determinar la viabilidad de propagación de la *Cattleya* en cultivos *in vitro*, generando resultados significativos y de gran incidencia para replicación de protocolos y establecimiento de los mismos de acuerdo a las variables ambientales y físicas que los investigadores establecen de acuerdo a los criterios del estudio. En Cuba, Rodríguez *et al.* (2007), en su estudio denominado germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres, estableció como objetivo principal para su estudio lograr la germinación de semillas de 15 especies de orquídeas silvestres cubanas, para realizar una contribución a su rescate y conservación, para ello emplearon distintos medios de cultivos entre los destacan principalmente, cultivo de sales inorgánicas de Knudson, cultivo MS, (agua de coco al 10%, sacarosa 2%, carbón activado 0.0% y al 0.15%). Los resultados permitieron conocer por primera vez las posibilidades para la germinación asimbiótica *in vitro* de las especies mencionadas y se comprobó la germinación de semilla que estuvo en un periodo comprendido entre 6 y 40 semanas.

Otro estudio que se realizó a nivel internacional fue el desarrollado por Barsanti y Lallana (2013). Denominado cultivo *in vitro* y aclimatación de plantas de un híbrido del género *Cattleya* (Orchidaceae), el cual presentó como principal objetivo evaluar el comportamiento “ex vitro” de plantas de un híbrido de *Cattleya* mediante el montaje directo en palos, para eso empleó medios de cultivo semisólido Murashige & Skoog (1962) a la mitad de la concentración suplementado con 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 5 g.L⁻¹ de Agar Agar Britania; pH 5,6 – 5,8, de igual forma se evaluó la viabilidad de las semillas, mediante la prueba de tetrazolio. Los resultados encontrados fueron que la germinación asimbiótica ocurrió normalmente sin contaminación, al igual que los subcultivos. La viabilidad de las semillas fue del 99%. Demostrando efectividad en la propagación y germinación de cultivos para esta especie.

Así mismo, recientemente en Chile Pereira *et al.* (2017), se desarrolló el estudio de germinación asimbiótica en tres especies de *Chloraea* (Orchidaceae). En el cual se pretendía realizar una germinación asimbiótica de semillas *Chloraea*, *crispa*, *C. gaviu* y *C. virescens* para evaluar el desarrollo embrionario de estas especies utilizando distintos medios de cultivos, entre los que se destacan agar agua, medio de cultivo banano, medio de cultivo de tomate, Knudson C, Malmgrem modified, medio de cultivo MS y MS modificado, para los cuales se obtuvieron como hallazgos más sobresalientes, que los medios de cultivos empleados alcanzaron altas tasas de germinación para estas especies, pero la reintroducción de individuos adultos en el campo probablemente podría necesitar inoculación con especies de hongos asociados para aumentar la supervivencia de la plántula.

En Colombia se ha utilizado las técnicas de micropropagación *in vitro* en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) de las especies *Masdevalia impostor*, *M. stenorrhynchos*, *M. macrura*, *M. xanthina* y *M. cucullata*, debido a la presión que han estado sometidas. Para la germinación se utilizó el medio de cultivo MS suplementado con agua de coco, obteniendo resultados óptimos en la germinación de semillas de orquídeas (Marin *et al.*, 2004).

Pedrosa *et al.* (2005) en Bogotá-Colombia evaluaron el efecto de tres reguladores de crecimiento en la germinación de semillas de *Comparettia falcata* bajo condiciones *in vitro*. encontraron que la combinación de las hormonas ácido giberélico (GA₃) y 6-furfurilaminopurina (kinetina) en concentraciones de 15 μ M en el medio de cultivo básico MS, produce un efecto sinérgico que causa una respuesta positiva en el porcentaje de germinación de semillas (100%) y desarrollo de las plántulas.

Pedrosa (2009) en Bogotá-Colombia analizó el 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*. El efecto sobre la tasa de crecimiento de la interacción del carbón activado en concentraciones de 0,5 y 1,0% con 0,5 mg. l⁻¹ de AIA fue positivo para el desarrollo de los protocormos de *E. elongatum* en condiciones *in vitro*.

En Norte de Santander se ha realizado en profundidad pocos estudios a nivel de germinación asimbiótica *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas del género *Cattleya*. Este género es uno de los más cultivados y populares de las orquídeas, tienen gran variabilidad y es

nativo de América tropical, en Colombia se encuentran alrededor de 11 especies de interés económico (Pérez, 2001).

Entre los estudios más recientes a nivel regional se destacan en primera medida, el estudio realizado por Salazar y Cancino (2012), denominado Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. Este estudio pretendió determinar la viabilidad de las semillas de las especies objeto de estudio y comparar con los datos evaluados de la germinación *in vitro* de las semillas, para evaluar la viabilidad de estas semillas se empleó pruebas de tetrazolio al 1% y para el medio de cultivo de basal MS como control y dos medios de cultivo diferentes, uno suplementado con agua de coco (MS+AC), otro suplementado con jugo de piña (MS+JP). Los hallazgos más significativos fueron, el medio MS suplementado con jugo de piña tiene una mayor respuesta a la germinación asimbiótica y formación de plántulas en las orquídeas *P. vespa* y *S. klotzscheana*, siendo un suplemento adecuado para propagar plantas *in vitro*, y facilitar su reintroducción en sus hábitats naturales en la provincia de Pamplona, así mismo se estableció que la prueba de tetrazolio es confiable para la determinación de la viabilidad de las semillas de *P. vespa* y *S. klotzscheana*, y los resultados se complementan de manera precisa con pruebas de germinación *in vitro*.

De igual manera, Salazar (2012), en su estudio Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae) realizado en Bochalema- Colombia, busco evaluar la germinación asimbiótica de semillas y el desarrollo *in vitro* de plántulas de *C. mendelii* y determinar la viabilidad de las semillas de especies, de las cuales se comparan con el porcentaje de germinación, para lo cual se tuvieron en cuenta medio de cultivo basal fue MS como control, MS suplementado con jugo de piña (MS+JP), MS con agua de coco

(MS+AC), MS más 0,5 mg/l de ácido indolacético (MS+AIA) Y MS con 0,5 mg/l de ácido giberélico (MS+ GA₃), esto para determinar la germinación asimbiótica para este tipo de especie. Los resultados demostraron que los medios de cultivos MS suplementados con componentes orgánicos como agua de coco y jugo de piña, favorecieron la germinación asimbiótica y el desarrollo *in vitro* de plántulas en la orquídea *C. mendelii*, siendo esta una combinación adecuada para producir múltiples plantas y reintroducir especies en peligro de extinción en sus hábitats naturales.

Las poblaciones silvestres de la especie *Cattleya* en Colombia se encuentran amenazadas, por recolecta ilegal con fines comerciales, y por la destrucción de los árboles portantes (Instituto Alexander von Humbolt, 2005). Además, dentro del género *Cattleya* encontramos la flor nacional de Colombia *Cattleya trianae* (Franco *et al.*, 2007), la cual se encuentra en peligro de extinción (CITES, 2003) justificando aún más el trabajo en mención.

En este contexto y teniendo en cuenta que los estudios en Norte de Santander sobre el cultivo *in vitro* de semillas de orquídeas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* han sido limitados, se hace necesario utilizar técnicas de cultivo *in vitro* que permitan la producción masiva de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* para su conservación. Por estas razones se propone evaluar la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas y formación de plántulas de orquídeas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* en diferentes medios de cultivos *in vitro*.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Street 1977, Calva & Ríos, 1999). Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl & Paul 2000).

La amplitud de la definición de cultivos de tejidos y sus numerosos objetivos que estos persiguen, constituyen serios problemas en cualquier intento de generalización sobre los factores que afectan el establecimiento de tales cultivos *in vitro* y obligan a consideraciones previas para delimitar los alcances de los mismos (Mroginski & Roca, 1991).

En primera medida, el cultivo de tejidos *in vitro* comprende en su generalidad un heterogéneo grupo de técnicas, mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo, cromoplasto, célula, tejido, órgano), se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

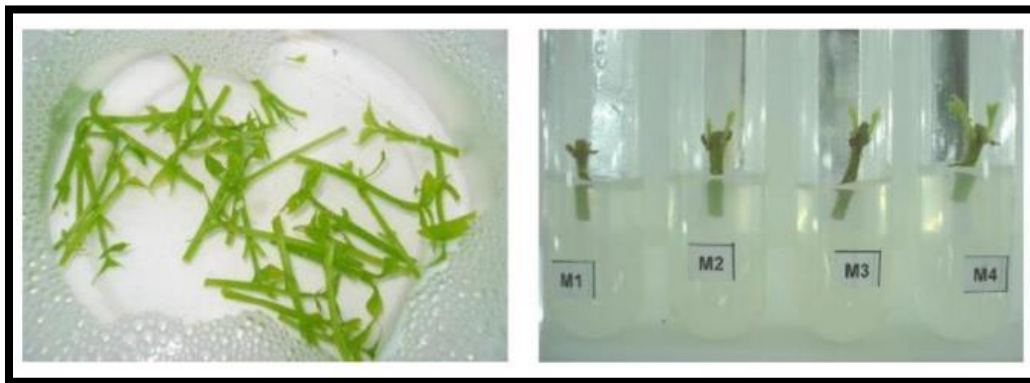


Figura 1. Preparación de explante y establecimiento in vitro. (Vitrocultivo 2018).

En segunda medida la utilización de cultivo de tejidos vegetales, tiene diversas aplicaciones, las facilita la investigación en biofísica, en bioquímica, fisiología, genética y ciencias afines, como también en la bioconversión y producción de compuestos útiles, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos, propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma de las diferentes especies de plantas en las que se desee trabajar por tener algunas características de interés agronómico o simplemente económico (Mroginski & Roca, 1991). También puede ser utilizado como un método fitosanitario o de fitomejoramiento (Sánchez & Jiménez, 2010).

Los principios del cultivo de tejidos vegetales son simples: primero, es necesario aislar una parte de la planta (explante); segundo, proveer al explante de un medio ambiental y nutricional adecuado para cada especie, tercero, el trabajo se realiza en condiciones asépticas, es decir, libre de bacterias, hongos, levaduras y de otros microorganismos contaminantes. Son muchos los factores que afectan la capacidad de supervivencia de los explantes, su establecimiento, su habilidad para reproducirse, la capacidad de regeneración. Aunque no pueden darse reglas

generales sobre estos factores, se puede hablarse de una tendencia en el comportamiento del cultivo *in vitro* (Pérez, 2010).

2.2.2 Micropropagación

La Micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, primero se inicia con el cultivo de tejidos *in vitro*, en el cual, el material vegetal que se utiliza es una célula, tejido u órgano de una planta. Estos materiales pueden provenir de tejidos como tallo, raíz, hojas, meristemas, embriones, etc. (Narváez, 2009).

El cultivo por Micropropagación, es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. (Levitus, *et al.*, 2010). Este proceso permite producir la mayor cantidad posible de propágulos en el menor espacio, el uso de cultivo de tejidos para la conservación de germoplasma parte del hecho de que el mantenimiento bajo éstas condiciones es altamente seguro, al quedar eliminados los riesgos de pérdidas por causa del medio ambiente; no hay detrimento por plagas o enfermedades (es un cultivo axénico); no existe peligro de infecciones por patógenos ni plagas y el costo de mantenimiento es menor a cualquier otro sistema *ex situ*. (Roca & Mroginski 1991).

De acuerdo a la variación y a las características particulares de las plantas la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas

adventicias preexistentes, producción de yemas de *novo* y embriogénesis somática. (Levitus, *et al.*, 2010). Este mismo autor ha propuesto una secuencia de etapas que permiten el desarrollo y ejecución del proceso cumplimentó con los distintos parámetros que se encuentran inmersos en el mismo. En primera medida tenemos la etapa 0 que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento del material vegetal, en esta la correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante. La planta donante debe elegirse en base a una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explante a establecer en condiciones *in vitro*. En cuanto a la segunda etapa se encuentra el establecimiento del cultivo, en el cual el objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas.

En este sentido, es importante señalar que el empleo de yemas adventicias (también llamadas yemas formadas de *novo*) está asociado con una mayor probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales respecto de los sistemas de propagación basados en la regeneración a partir

de yemas axilares o embriones somáticos. En cuanto a la tercera etapa se establece la multiplicación en la cual se busca mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica. Para la cuarta etapa se definen Enraizamiento y aclimatización, en esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resultan más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua.



Figura 2. Etapas del cultivo de tejidos vegetales. (Rojas, 2015).

2.2.3 Morfogénesis *in vitro*

En condiciones de cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden regenerar embriones o brotes, raíces y/o flores como respuesta a un determinado estímulo. La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar para los tres tipos de morfogénesis. De Klerk *et al.* (1997) denominaron a estas diferentes fases como fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización. En la primera fase las células no responden al estímulo organogénico, pero adquieren esa competencia durante una fase de desdiferenciación. En la segunda fase o fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar. En la fase de realización, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado. A partir de la siembra *in vitro* de diferentes explantes relativamente grandes y en condiciones adecuadas, puede inducirse la formación de nuevos órganos de manera directa sin la formación de callo.

En el desarrollo de estas fases, descritas anteriormente se puede presentar ciertos factores que pueden afectar los procesos morfológicos, el primero de ellos es el relacionado con El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro*, así como también para la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos. Por esta causa, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada situación en particular; otro factor que puede

alterar el proceso son las condiciones químicas seleccionadas para realizar el cultivo, los compuestos químicos que influyen en los patrones morfogénicos in vitro dentro de los cuales podemos considerar: La composición salina del medio de cultivo, los Reguladores del crecimiento, antibióticos, carbón activado, Agar y atmosfera gaseosa; de igual forma en la ejecución del proceso se puede presentar factores que alteren las condiciones físicas del cultivo, en las cuales se destacan principalmente temperatura, humedad relativa y la luz. (Levitus *et al.*, 2004).

2.2.3.1 Organogénesis

La organogénesis es una técnica de la biotecnología vegetal, la cual permite la formación de tallo, yemas y raíces a partir de diferentes explantes como las hojas, tallos, flores, callos, meristemos o células en suspensión. Estos órganos son inducidos a partir de una o más células según sea las condiciones del cultivo, cuenta con la propiedad de mantenerse en activa división. (Campuzano, 2018). Según este mismo autor, esta técnica normalmente se da en dos etapas, la primera consta de la producción y crecimiento de tallos a partir de callos, hojas, cotiledones, hipocótilos, etc. En la segunda etapa se realiza el enraizamiento.

Existen dos tipos de organogénesis, directa e indirecta; la directa consiste en que a partir de una siembra de diferentes explantes y con sus condiciones respectivamente adecuadas, se puede inducir la regeneración de brotes, raíces o flores de una parte de la planta sin necesidad de tener la formación del callo. (Narváez, 2009) En cambio, la forma indirecta, se realiza a partir de la siembra de un explante en donde se observa el crecimiento de una aglomeración de células en forma

desordenada y sin ningún funcionamiento. Seguidamente se inicia con la producción de callos. La organogénesis indirecta ha tenido mucha importancia debido a la micropropagación clonal ya que es generador de nuevas investigaciones. (Levitus *et al.*, 2010).

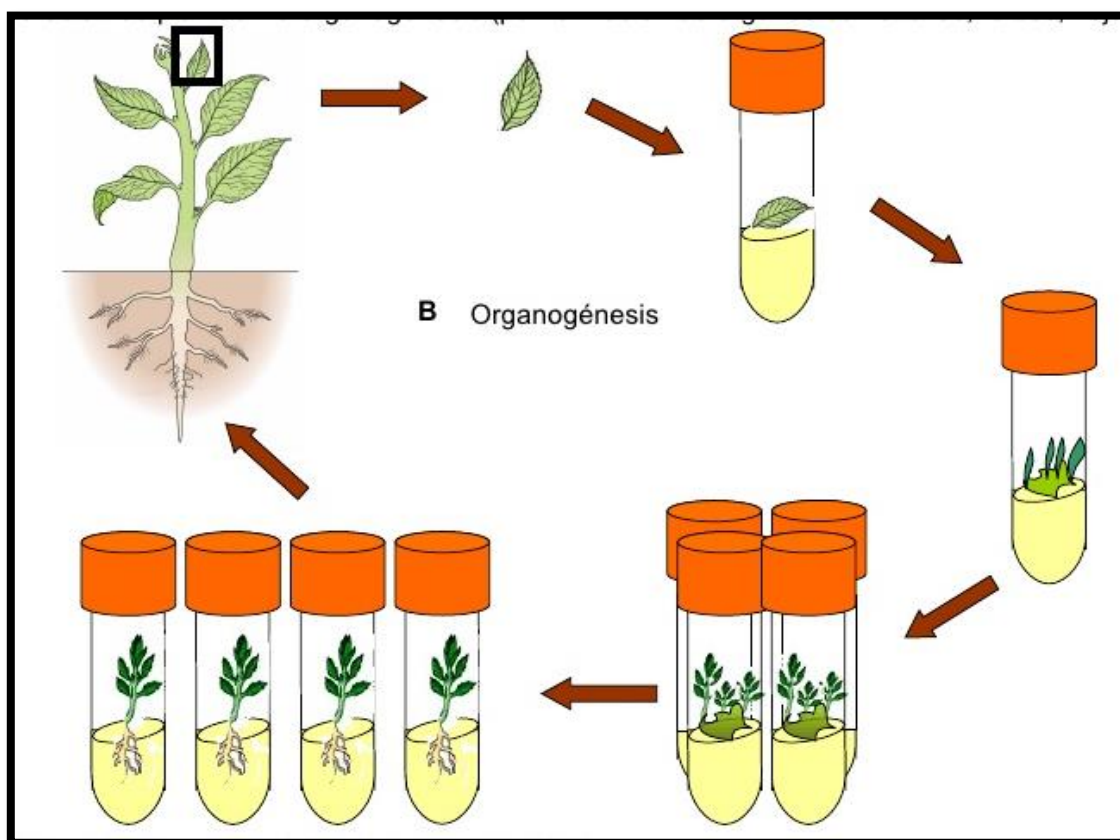


Figura 3. Esquema general de organogénesis (Rosales, 2006).

2.2.3.2 Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Es decir, es aquel el proceso por el cual las células somáticas forman estructuras bipolares y sin conexión vascular al tejido materno, pasando por una serie de etapas características a la embriogénesis cigótica, pero sin que ocurra

fusión de gametos (William & Maheswaran, 1996). Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia, descrita por primera vez por Strasburges en (1878) aunque fueron Reinert (1958) y Steward *et al.* (1958) quienes dieron crédito por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática en el año 1958.

La embriogénesis somática ha surgido como una nueva vía de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Griga, 2000) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2002). Esta técnica permite incrementar los coeficientes de multiplicación, disminuir los costos de producción y da la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores (De Fera, 2000).

El origen de la embriogénesis somática, no se encuentra con precisión hacia una única teoría, sino que de acuerdo a distintos autores deriva de distintas características y procesos, entre los que se destacan las teorías de origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos. Algunas referencias señalan el incuestionable origen unicelular de los embriones en varios cultivos (Street & Withers, 1974; Haccius, 1977), pero también ha quedado claro que el embrión puede tener un origen multicelular (Williams & Maheswaran, 1986). Los factores que determinan si un embrión somático ha tenido un origen uni o multicelular no han sido dilucidados aún.

Por otra parte, la embriogénesis somática posee unas características particulares en cuanto a la constitución de un nuevo individuo de estructura bipolar, capaz de originar una planta completa, entre las que se destacan, las propuestas por Sannasgala (1989) y Escalant & Teissant

(1989) en las cuales señalan que el embrión somático presenta las siguientes características, en primer lugar, presentan una estructura bipolar con un ápice radical, uno apical y cotiledones. De igual manera tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este. Así como presenta bandas procambiales entre los ápices.

Asimismo, el proceso de embriogénesis somática, se encuentra inmersa en un proceso sucesivo de etapas necesarias para el desarrollo y ejecución del proceso, entre las cuales las fases fundamentales de este proceso son la inducción, histodiferenciación, maduración, germinación y conversión del embrión. Cada una de estas fases es regulada por diversos factores (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

La primera etapa de este proceso como ya se señaló es la inducción, en el cual las células somáticas adquieren características embriogénicas mediante una completa reorganización del estado celular, incluyendo cambios fisiológicos, metabólicos y moleculares (Fehér *et al.*, 2003). Según Pérez-Molphe *et al.*, (1999) la inducción es el proceso de conversión de una célula somática a una célula proembriogénica y ellos consideran que los factores determinantes para que suceda el proceso de inducción son el genotipo, el grado de diferenciación de las células explante, las auxinas y el aislamiento celular.

En cuanto a la segunda etapa de este proceso se encuentra histodiferenciación, el cual se denomina cuando en la formación de órganos, los embriones globulares se desarrollan hasta alcanzar la etapa cotiledonar, (Thorpe, 1995). En esta etapa las masas de células proembriogénicas se diferencian formando embriones somáticos, mediante una división y diferenciación celular simultáneas. Para que estas células cesen su multiplicación y pasen a una fase de diferenciación se requiere la eliminación de las auxinas exógenas. Una de los fenómenos iniciales en esta etapa es el establecimiento de una polaridad en las masas de células proembriogénicas. Esta polaridad se mantendrá durante todo el desarrollo del embrión (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Durante la etapa de histodiferenciación, los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. En las dicotiledóneas estos estadios son: globular, de corazón y de torpedo, mientras que en las monocotiledóneas son: globular, coleoptilar y escutelar (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

La tercera etapa de este proceso, corresponde a la maduración, la cual es un complejo período de desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y se adquieren tolerancia a la desecación (Parrot, 1993). La maduración se caracteriza por la deposición de sustancias de almacenamiento, represión de la germinación y adquisición de tolerancia a la desecación (Thorpe, 1995). Sin embargo, hay especies en las que los embriones somáticos no se desarrollan normalmente. En algunos casos germinan, pero no se convierten en plántulas normales (López-Puc, 2008). El desarrollo del embrión y la

maduración pueden en ciertos casos interrumpirse por la germinación precoz, lo que provoca que las plántulas no se desarrollen normalmente (Jiménez, 2005).

En cuanto a la etapa de germinación y conservación de embriones en plantas pocos autores realizan la distinción en sus trabajos (Merkle *et al.*, 1995). La germinación es el proceso fisiológico que puede definirse como los cambios metabólicos que empiezan con la hidratación de la semilla y terminan cuando la radícula se alarga y emerge de la cubierta seminal (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997). Esta definición no se puede aplicar a embriones somáticos, ya que éstos no poseen cubierta seminal, por lo que quizás, la definición de germinación más apropiada en embriones somáticos sería, la emisión de radícula (López-Puc, 2008). Para que eso suceda se requiere estímulos como la luz, el ácido giberélico (GA3) o las citoquininas. Los embriones somáticos carecen de tejidos de reservas por lo que la germinación solo ocurre *in vitro* en donde el medio de cultivo aporta los nutrientes, o bien, cuando se les proporcionan depósitos artificiales de nutrientes (semillas artificiales) (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

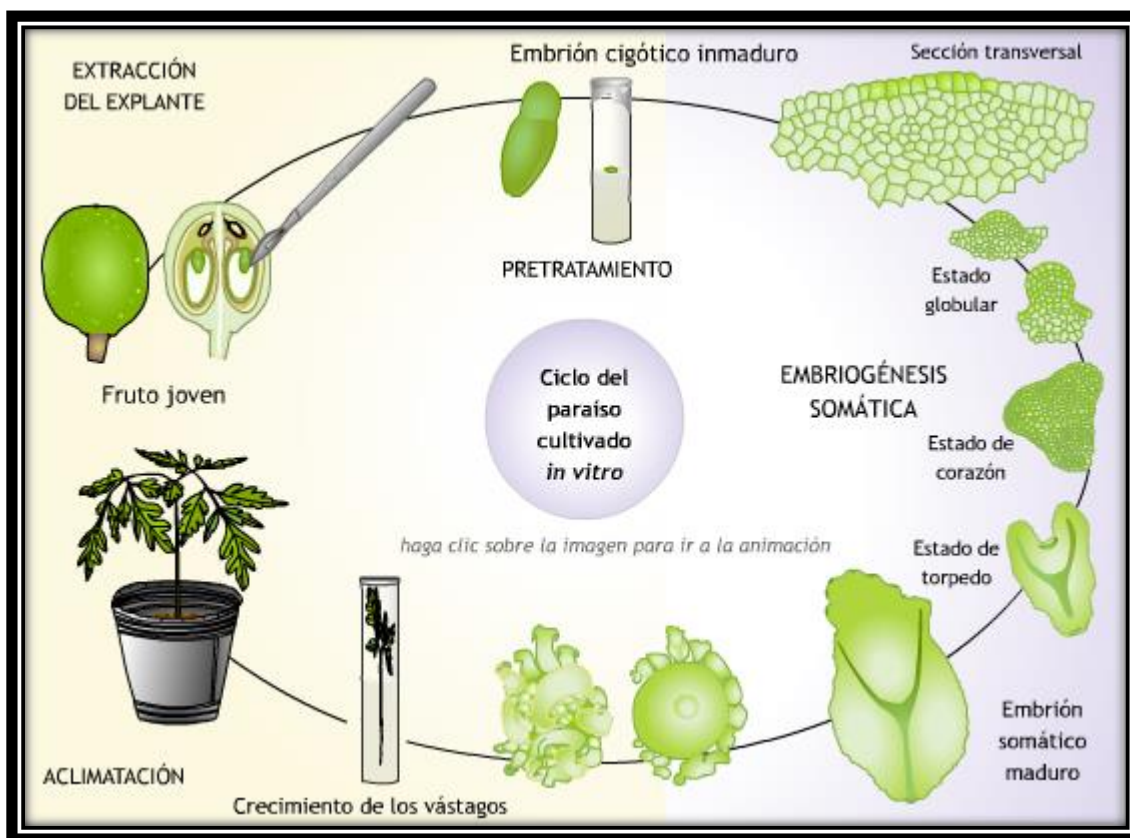


Figura 4. Esquema del Ciclo de vida del Paraíso cultivado in vitro. (Gonzales, 2005)

2.2.3.3. Embriogénesis cigótica

La embriogénesis cigótica que comprende los cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta el final del desarrollo y maduración del embrión. Así mediante esta se forma las semillas. Este podrá germinar cuando las condiciones endógenas y medioambientales sean las apropiadas. De la embriogénesis dependerá el éxito de la germinación y, por tanto, el desarrollo del nuevo individuo. Además de ser el periodo en el que se forma la semilla, la embriogénesis también constituye la fase de preparación para la germinación (Matila, 2008, P.1).

La embriogénesis cigótica representa una alternativa viable de propagación, ya que aumenta el número de brotes, y potencialmente, el número de plantas que se pueden obtener de un solo embrión (Campusano *et al.*, 2019). El hecho de que el cigoto genere un embrión organizado con una estructura predecible y específica para especies nos dice que el cigoto está genéticamente programado para desarrollarse de una manera particular y que la división celular (Rueda Chacón, 2019). Aunque según Escobar (2019) afirma que la embriogénesis cigótica en la que el embrión se encuentra dentro de la semilla dificulta su estudio.

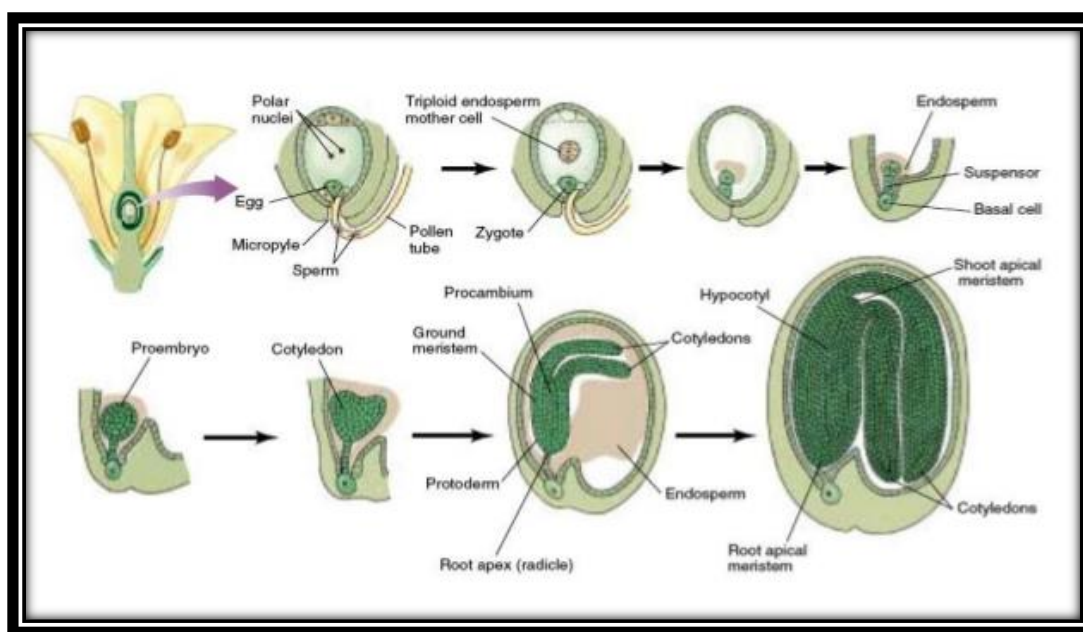


Figura 5. Embriogénesis cigótica. Sánchez et al (2003)

2.2.4 Generalidades de las orquídeas

Las orquídeas son conocidas desde hace muchos años, pero no se conoce con exactitud su aparición y la forma de la misma, no obstante, desde algunas épocas atrás han sobresalido por su apariencia, y anatomía, el filósofo griego Teofrasto, quien denominó a esta especie con el nombre de orchis (testículo), en alusión a la parte basal de la planta, el tuberoide, la cual tiene forma de un par de testículos (Bennet, 2000). Intento acercarse a los estudios preliminares de la anatomía y evolución de la orquídea sin tener resultados significativos, posterior, a este en épocas distinta, diversos investigadores se han dedicado al estudio de las orquídeas, intentando conocer y determinar su origen pero esto ha sido casi imposible, dado a poca información evolutiva que se tiene de la misma, dado que estas no poseen un registro fósil adecuado por lo que muchos aspectos de su historia evolutiva permanecen oscuros (Ramírez *et al.*, 2007). Es por tal razón que se desconoce de la procedencia de híbrido, y los estudios que se han hecho sobre esta han sido guiados a su morfología y taxonomía.

En cuanto a la morfología de la orquídea, los miembros de la familia *Orchidaceae* poseen una amplia gama de formas en todos los órganos constituyentes de la planta. En términos generales, las orquídeas están constituidas al igual que otras plantas por raíz, tallo, hojas, y frutos. Sin embargo, en cada uno de esas partes hay modificaciones evolutivas en cuanto a forma y función, esto reflejo de las formas adaptativas que los distintos hábitats presentan. (Rivera, 2002).

Las orquídeas están constituidas por vástagos organizados que pueden generar dos hábitos de crecimiento; en el primer tipo de crecimiento, el desarrollo se da mediante la extensión

vegetativa a partir de un meristemo apical que da lugar a un solo eje principal (monopodial). Y el segundo tipo de crecimiento corresponde al segundo el eje, que está formado por una serie de vástagos generados de manera consecutiva a partir de meristemos o yemas de renuevo situadas basal, lateral o apicalmente en el vástago anterior, el conjunto de vástagos forma un eje compuesto (simpodia) (Bell & Bryan, 1991).

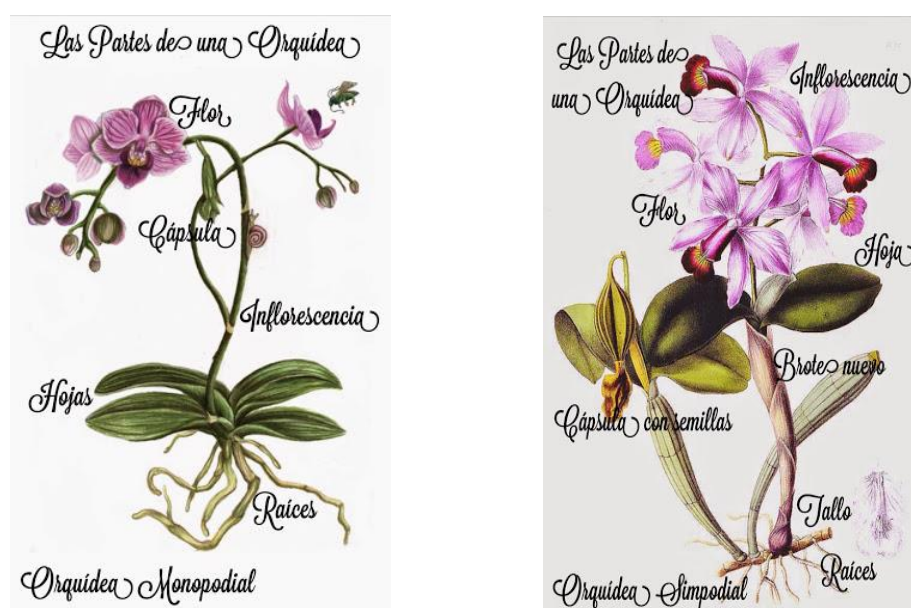


Figura 6. Partes de la orquídea según tipo de crecimiento. (Asociación Jalisciense de orquideología, 2015).

En cuanto a la raíz de las orquídeas estas son órganos que presentan diferentes adaptaciones. Tienen las funciones de absorber agua, sales minerales, nutrientes y fijar la planta al suelo o a materia orgánica acumulada en troncos. En las orquídeas terrestres esas funciones se cumplen a plenitud, pero a la vez, se complementan con otras necesarias para la sobrevivencia de especies adaptadas de vivir en sitios con condiciones inhóspitas. (Rivera, 2002). Las raíces son simples o ramificadas, carnosas y con un diámetro aproximado de entre 1 y 10 mm dependiendo de la especie.

Por lo general son circulares con corte transversal (Hágsater *et al.*, 2005). Generalmente las raíces son alargadas como cordones delgados. En las especies epífitas, comúnmente son gruesas y blancas, debido al desarrollo de un tejido esponjoso y blanquecino llamado velamen que cumple la función de captar agua y nutriente, si el tiempo está seco, sus células están llenas de aire; pero cuando llueve se llenan de agua. Su función principal parece ser la de protección mecánica, además de impedir la excesiva pérdida de agua de la raíz en períodos de deficiencia hídrica (Collantes, Soto & Koechlin, 2007).

Los tallos de las orquídeas son comparables a una caña o carrizo. Pueden ser caulescentes o acaules. Las orquídeas con tallo caulescentes por lo general presentan pseudobulbo, los cuales son tallos aéreos notablemente engrosados, presentes en muchas orquídeas epífitas y algunas terrestres o rupícolas, como en el género *Cyrtopodium* (Hágsater *et al.*, 2005). Están formados por segmentos o entrenudos delimitados por nudos o anillos cicatrízales donde originalmente se insertaban hojas, vainas o escamas foliares: son de distintas formas y grosores. Las orquídeas acaules tienen un tallo corto, como en muchas orquídeas terrestres que presentan tubérculos o cormos característicos en varios grupos de orquídeas epidendroides terrestres como *Bletia*, *Govenia*, *Liparis* y *Malaxis* (De la Cruz, 2006).

Asimismo, las hojas son como en la mayoría de las monocotiledóneas, es decir simples, con nervaduras paralelas, alargadas, generalmente persistentes, solitarias, en número de dos o más hojas, lanceoladas, trianguladas, forma ovalada y de color generalmente verde (De la Cruz, 2006). La forma del limbo la hoja puede ser: ovada, elíptica, oblonga, oblanceolada, lanceolada, linear,

cordada, terete y combinaciones de las anteriores. El ápice puede ser apiculado, agudo, oblongo, retuso, con 1 a 3 dientes, etc. (Collantes, Soto & Koechlin, 2007). Estos órganos pueden ser filiformes y hasta orbiculares, membranosas o coriáceas e incluso pueden almacenar agua (Dressler, 1981). Las hojas son, por excelencia, las estructuras fotosintéticas de la planta. Las únicas excepciones a esta generalización son las orquídeas saprófitas que crecen en el suelo de bosques densos o en forma subterránea, donde la ausencia de luz solar imposibilita la fotosíntesis. En los géneros de crecimiento simpodial hay hojas escamiformes que cubren temporalmente la yema, el pseudobulbo o el rizoma en desarrollo y luego al morir quedan, por algún tiempo, adheridas a la superficie. Las plantas con flores en el ápice del pseudobulbo forman una hoja modificada o espátula que sirve de cubierta a los botones florales. (Rivera, 2009).

En cuanto la flor está constituida por tres sépalos generalmente coloreados, al igual que los pétalos y pueden estar libres o más o menos unidos formando un tubo. El sépalo dorsal difiere generalmente en la forma de los laterales, los cuáles son más o menos oblicuos y pueden estar libres uno del otro o adheridos frecuentemente por la base, se componen de 3 pétalos, dos son semejantes morfológicamente y el tercero llamado labelo está modificado, su posición inferior corresponde al giro del pedicelo o de éste y el ovario (resupinación) (Hágsater *et al.*, 2005). Todas las flores de orquídeas están formadas por tres piezas externas llamadas sépalos, dos laterales y uno dorsal, y tres elementos internos llamados pétalos, (Orquideamundo, 2010). De todas las estructuras analizadas hasta el momento, la flor es la más interesante no solo por su función reproductiva, sino también por la exquisita diversidad de formas, colores y aromas que presentan. La morfología básica de la flor en una orquídea es la misma de cualquier planta: sépalos, pétalos y verticilos sexuales. Sin embargo, cada una de esas partes presenta rasgos distintivos, propios de

esta familia. Poseen simetría bilateral, esta es una característica predominante en la mayoría de las orquídeas, ya que en ellas existe un solo plano o eje que corte a la flor en dos partes iguales. En la parte más externa de la flor se encuentran los sépalos que constituyen la cubierta del capullo floral antes de abrirse (Rivera, 2009).

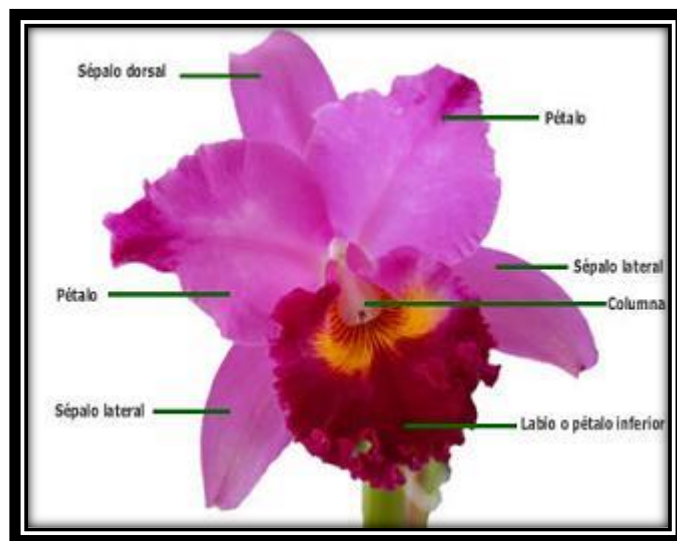


Figura 7. Partes de la flor de la orquídea. (Asociación Jalisciense de orquideología,2015)

Por otra parte, encontramos la taxonomía de las orquídeas la cual es complicada por su tendencia a la hibridación, no sólo entre especies, sino también entre géneros distintos. A pesar de la complejidad, el gran número de formas que constituyen esta familia, evidencia una extremada uniformidad en cuanto a la organización floral, constituyendo un formidable ejemplo de homogeneidad en el ámbito de las Angiospermae. Por su reproducción y complicada estrategia adaptativa y especializaciones, las Orchidaceae están consideradas como la familia más evolucionada entre las Spermatophyta. Se trata de plantas herbáceas perennes que en su mayoría desarrollan micorrizas endótrofas, esenciales para la germinación de las semillas, que sólo se puede dar en estas condiciones. (Dressler, 1993)

El primer sistema de clasificación de la familia orquídeas fue hecho por John Lindley en 1825, sucesivo a ello el sistema Dressler, publicado en 1981, lista seis sub-familias, más de 725 géneros y alrededor de 25,000 especies. Las plantas muy relacionadas, con características similares, se agrupan en consecuencia, empleando para ello los conceptos de Tribu y 16 Sub-tribu, es así que actualmente la mayoría de los taxónomos aceptan como válido el trabajo realizado por Robert Dressler, en 1993. Pero la clasificación final de la familia *Orchidaceae* aún no ha terminado, sino que a menudo se producen cambios en la clasificación de esta gran familia. Algunas familias muy grandes, como es el caso de las orquídeas, están divididas en subfamilias, compuestas por géneros que tienen un origen común. Hay cinco sub-familias reconocidas. Los nombres terminan en -oideae. (Dressler, 1993).

2.2.5. Germinación in vitro de las Semillas de Orquídeas

Según estudios realizados por diversos autores señalan que las orquídeas fueron las primeras plantas propagadas *in vitro* a partir de la siembra de semillas, de manera simbiótica y asimbiótica o clonalmente al introducirse la técnica de cultivo de meristemas para la propagación vegetativa. Dada la importancia hortícola y comercial de las orquídeas, se han desarrollado diversos métodos de propagación, tanto sexual, a través de semillas como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos (explantes) (Ávila & Salgado, 2006).

Existen dos formas generales como se ha logrado la propagación de estas plantas: la primera de forma Asexual mediante la resiembra de rizomas (Echeverri *et al.*, 2001) o a través del cultivo *in vitro* de meristemas con la cual se ha logrado obtener gran número de plantas y variedades mejoradas (Morel 1960); y la segunda de forma sexual, utilizando las semillas (Knudson, 1946; Pérez *et al.*, 2001), esta última técnica permite la obtención de mayor número de plántulas, y la más empleada.

La propagación por semilla puede ser lograda en condiciones *in vitro* mediante el cultivo asimbiótico (sin cocultivo con el hongo asociado) o simbiótico (cocultivando las semillas o plántulas con el hongo asociado). Knudson demostró que era posible la germinación sobre un medio simple que contuviera minerales y azúcares, sin la presencia de hongos. La investigación desarrollada por Knudson (1922) supuso una conmoción en el mundo de las orquídeas, al demostrar que las semillas de *Cattleya*, *Epidendrum* y otras orquídeas eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro*. A pesar del descubrimiento de Knudson, se comprobó que no siempre es posible hacer un medio en el que una determinada especie de orquídea pueda germinar y desarrollarse. Se han descrito muchos medios nutritivos, para muchos géneros y especies diferentes (Arditti 1967, 1982, Arditti & Ernst, 1982; Fast, 1980).

En todos los casos las semillas se esterilizan y cultivan en recipientes de vidrio o plástico sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan, y en muchos casos se recomienda el uso de hormonas vegetales tipo auxina tales como ANA (ácido naftalenacético) y el AIA (ácido indolacético) en combinación con hormonas tipo citoquinina, de las cuales la más recomendada es la BAP (Bencil amino purina) (Echeverri *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2001; Jardinería, 2002).

2.2.5.1 Germinación *in vitro* simbiótica

En la germinación *in vitro* simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo micorriza apropiado, O se inoculan en las primeras etapas de germinación cuando estas alcanzan una coloración verde (Pérez *et al.*, 2001). El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo hasta que éste produzca hojas y se vuelva autotrófico. Esta técnica es ampliamente usada para la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas. Tiene la ventaja de usar un medio simple, y como resultado las plantas micorrizales suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas asimbióticamente. Sin embargo, la desventaja es que se necesita seleccionar el tipo de hongo micorriza adecuada para que se origine la simbiosis y prevenir parasitismo y la consecuente muerte de las semillas. Se ha realizado poca investigación sobre la relación del hongo micorriza con las orquídeas tropicales, y por lo tanto no se dispone del hongo micorriza apropiado (Mckendrick, 2000).

2.2.5.2 Germinación *in vitro* asimbiótica

La germinación asimbiótica es comúnmente usada en la propagación de orquídeas tropicales debido al poco conocimiento que se tiene de los hongos micorrizantes asociados; en términos generales, el medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben

estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada, puesto que ya no existe la intermediación del hongo que facilite su nutrición. (Mckendrick, 2000).

2.3 Marco legal

El sustento teórico de este estudio, se encuentra sustentado por una serie de leyes, decretos y resoluciones que protegen, conservan y exaltan al género *Cattleya* por ser una de estas especies la flor nacional de Colombia, motivo por el cual se hace necesario, realizar una revisión minuciosa de la legislación disponible y actual sobre la misma, la cual permitirá conocer el estado actual de su normatividad y su estado general a nivel nacional.

Constitución Política de 1991

Dentro de la presente constitución la cual se encuentra vigente a la fecha y por la cual se rige la legislación colombiana, se encuentra establecida la protección, preservación y conservación de fauna y flora presente en el territorio nacional, para ello se ha especificado tres artículos dentro de la constitución. En primera medida encontramos el artículo 8, en cual se señala que es obligación del Estado y de las personas proteger las riquezas culturales y naturales de la Nación. Asimismo, se encuentra el artículo 79 de la misma constitución, en la cual se manifiesta que todas las personas tienen derecho a gozar de un ambiente sano. La ley garantizará la participación de la comunidad en las decisiones que puedan afectarlo. Es deber del Estado proteger la diversidad e integridad del ambiente, conservar las áreas de especial importancia ecológica y fomentar la educación para el

logro de estos fines. De igual forma el artículo 80, menciona que. El Estado planificará el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución. Además, deberá prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, imponer las sanciones legales y exigir la reparación de los daños causados. Así mismo, cooperará con otras naciones en la protección de los ecosistemas situados en las zonas fronterizas.

Ley 99 de 1993, ley del medio Ambiente

En la presenta ley busca establecer las funciones y alcances que tiene el ministerio de ambiente con la conservación y protección de la fauna y de la flora dentro del territorio nacional, es por ello que en el artículo 5 del numeral 20, manifiestan que le. Corresponde al Ministerio del Medio Ambiente coordinar, promover y orientar las acciones de investigación sobre el medio ambiente y los recursos naturales renovables, establecer el Sistema de Información Ambiental y organizar el inventario de biodiversidad y de los recursos nacionales.

Ley 299 de 1996, protege la flora colombiana

Con esta ley, se busca preservar, defender y crear espacios para la conservación de la flora a nivel nacional, es por ello, que en el artículo 1 señala, que la conservación, la protección, la propagación, la investigación, el conocimiento y el uso sostenible de los recursos de la flora colombiana son estratégicos para el país y constituyen prioridad dentro de la política ambiental. Son de interés público y beneficio social tendrán relación en la asignación de los recursos en los

planes y programas de desarrollo y en el presupuesto general de la Nación y en los presupuestos de las entidades territoriales y de las corporaciones autónomas regionales”

Resolución 956 de 2010, declara como año nacional de la orquídea

Esta ley busca promover los medios necesarios para la preservación de la orquídea a nivel nacional, ya que esta es símbolo emblemático para la Nación y una de las especies florales más importantes a nivel nacional, no solo por sus características físicas sino por su incidencia comercial, es por ello que esta resolución señala se debe promover y adelantar, encuentros nacionales en pro de la conservación de las orquídeas silvestres y a su vez formular un programa nacional para la conservación de las orquídeas silvestres del territorio colombiano.

Ley 115 de 1994, ley general de educación.

Esta ley en su artículo 14, señala que la educación es obligatoria en todos sus niveles de desarrollo y esta debe cumplir con una serie de estamentos jurídicos en su ejercicio, de igual manera este mismo artículo en su inciso 6, señala que la enseñanza es obligatoria cuando se tocan aspectos de protección al medio ambiente, la ecología y la preservación de los recursos naturales, por establecido por la constitución política.

3. Diseño metodológico

3.1 Tipo de investigación

La investigación se realizó mediante un estudio de tipo experimental, el cual busco, estudiar las relaciones de causa-efecto, pero en condiciones de control rigurosas de todos los factores que puedan afectar el experimento (Sarmiento, 2002, P.15). Esta se realizó a través de la observación e indagación, para evaluar las condiciones óptimas de germinación y desarrollo de plántulas en diferentes medios de cultivos para una futura conservación de especie en vía de extinción desde un ámbito regional y posible comercialización por el interés que representan las especies *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*. Así mismo, esta investigación estuvo orientada al enfoque cuantitativo, el cual, según Hernández *et al.*, (2010) afirma que.

El enfoque cuantitativo utiliza la recolección y el análisis de datos para contestar preguntas de investigación y probar hipótesis establecidas previamente, y confía en la medición numérica, el conteo y frecuentemente en el uso de la estadística para establecer con exactitud patrones de comportamiento en una población. (P.10)

3.2 Población y muestra

Población

En la presente investigación, la población objeto de estudio, correspondió a una colección viva de la especie *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* del restaurante y vivero “la

orquídea”, la cual tiene 10 individuos de cada especie y estas obtener una cápsula por individuo y están se podrán disponer de una gran cantidad de semillas maduras.

Muestra

Para el establecimiento *in vitro* de semillas de Orquídea de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, la muestra o unidad experimental (repetición) está representada por la caja Petri donde se realizaron los cultivos, una muestra de 60 cajas, en la cuales se dispuso un número aproximadamente de 100 semillas.

3.3 Hipótesis

La construcción de las hipótesis de esta investigación gira en torno a la los objetivos y la formulación de dicha investigación y es evaluar los medios de cultivos más óptimos para la germinación de semillas en condiciones controladas, a partir de la utilización de distintas variables, las cuales mediante la ejecución de los procesos experimentales y la observación que se derive de están se afirmaran o se descartaran según los resultados obtenidos en dicho estudio.

Hipótesis investigativa (HI)

Al evaluar las concentraciones de las hormonas GA₃ (0,5 ml/L) y AIA (0,5 ml/L) y el componente orgánicos JP Y AC (200 ml/L), se podrá determinar el medio de cultivo ideal, para la germinación de las semillas con respecto a los demás medios.

Hipótesis nula (HO)

Las concentraciones hormonales y el componente orgánico no afectarán en la decisión del medio cultivo ideal, para la germinación de las semillas con respecto a los demás tratamientos.

3.4 Variables

Variables Dependientes

Viabilidad de semillas, germinación de semillas asimbióticamente, desarrollo de plántulas.

Variables independientes

Semillas, pretratamientos, prueba de tetrazolio, tiempo de exposición, medios de cultivo y fases de germinación.

VARIABLES INTERVINIENTES

Condiciones de Asepsia, controles de temperatura, fotoperiodo y humedad.

Interrupción inesperada del suministro eléctrico en el laboratorio, obstaculizando la automatización para los tiempos establecidos en el fotoperiodo y el control de temperatura.

Contaminación por vectores inesperados en el laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Tabla 1 Operacionalización de variables de investigación

Viabilidad de semillas			
VARIABLES	DESCRIPCION	INDICADORES	INDICES
Independientes	Semillas	Cantidad de semillas de <i>Cattleya gaskelliana</i>	100 semillas de cada especie
		Cantidad de semillas de <i>Cattleya warscewiczii</i>	
	Pretratamientos	Preacondicionamientos a las semillas antes de realizar la prueba de viabilidad	Control
			0,5% Cloro
			1% Cloro
			Sacarosa 10%
	Prueba de tetrazolio	Exposición a concentraciones de tetrazolio	Agua destilada
			0,25%
Tiempo de exposición	Tiempo de las semillas en la solución de tetrazolio	0,5%	
		24 horas	
48 horas			
Dependiente	Viabilidad de las semillas	Coloración roja (Semillas viables)	Porcentaje de semillas viables de <i>Cattleya gaskelliana</i> y <i>Cattleya warscewiczii</i>
		Coloración natural (Semillas no viables)	
Germinación de semillas			
Independientes	Semillas	Cantidad de semillas de <i>Cattleya gaskelliana</i>	100 semillas de cada especie
		Cantidad de semillas de <i>Cattleya warscewiczii</i>	
	Medios de cultivos	Siembra de las semillas de las dos especies en cada medio de cultivo	MS
			MS+AIA
		MS+GA ₃	

	Fases de germinación	Semillas de cada especie en cada fase analizada cada semana	MS+JP
			MS+AC
			OSSM
			F0= Semillas no germinadas
			F1= Imbibición
			F2= Ruptura de testa
			F3= Formación de protocormos
Dependiente	Germinación <i>in vitro</i>	Cantidad de semillas germinadas en cada medio de cultivo	F4= Desarrollo de rizoides
			F5= Formación de hojas
			Porcentaje de germinación asimbiótica de semillas de <i>Cattleya gaskelliana</i> y <i>Cattleya warscewiczii</i>

3.5 Diseño instrumental

3.5.1 Instrumentos

Para la ejecución de la fase de investigación, se hizo necesario la realización y formulación de formatos de registro, que permitieron registrar las distintas etapas de ejecución del proceso de germinación de las orquídeas del género *Cattleya*, en sus dos especies *Cattleya gaskelliana* (n.e.br.) B.S.Williams y *Cattleya warscewiczii*. Así como la viabilidad de las semillas en estudio.

El primer formato de registro, corresponde a la evaluación, seguimiento y desarrollo de las fases de germinación (inhibición, germinación, formación de protocormo, desarrollo de rizoide, formación de hojas), en cada uno de los medios de cultivo establecidos (OSSM, MS, MS+GA3,

MS+AC, MS+JP, MS+AIA), durante seis repeticiones, en cada una de las especies por distintos periodos de tiempo, desde la semana 1 hasta la semana 18, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2 Formato de registro y seguimiento para germinación de la *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*

FASES DE GERMINACIÓN	MEDIOS DE CULTIVOS	# DE REPETICIONES							
		I	II	III	IV	V	VI	TOT	PROM
F0	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F1	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F2	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F3	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F4	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F5	MS								

	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA₃								

ESPECIE: _____ SEMANA: _____

El segundo formato, corresponde al registro y seguimiento de viabilidad de las semillas de las especies *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, a partir de la utilización de la prueba de tetrazolio en distintos tiempos de exposición (24 y 48 Hrs) y con distintas concentraciones de tetrazolio. (0.25 y al 0.5%), así como se describe en la tabla 3. Para 100 semillas de cada especie a evaluar.

Tabla 3 Formato de evaluación y seguimiento para viabilidad de semillas

ESPECIE:					
TIEMPO DE EXPOSICION:					
CONCENTRACION:					
Viables	No Viables	Viables	No Viables	Viables	No Viables
SUBTOTAL		SUBTOTAL		SUBTOTAL	
TOTAL		TOTAL		TOTAL	

3.5.2 Técnicas de recolección de datos.

Para lograr recolectar una información amplia y precisa sobre la viabilidad de germinación de las semillas de las *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warszewiczii* del presente estudio, se hace necesaria la utilización de técnicas coherentes tanto para el objeto de estudio, el tipo de investigación, con sus respectivas hipótesis y variables. En este sentido se utilizaron tres técnicas de recolección de la información de acuerdo a los objetivos planteados:

Lista de cotejo

Como se mencionó al inicio del escrito, el primer objetivo específico que se propone en este estudio es *Determinar el pretratamiento más adecuado para optimizar la viabilidad de semillas de Cattleya gaskelliana y Cattleya warszewiczii utilizando la prueba de tetrazolio.* se empleó la técnica de recolección denominada lista de cotejo, en la cual es un instrumento estructurado que registra la ausencia o presencia de un determinado rasgo, conducta o variable, la cual consiste en un listado de rasgos, que señalan con especificidad aspectos o categorías establecidas de antemano a evaluar, al lado de los cuales se puede calificar por medio de un puntaje (viable o no viable). La presencia o ausencia de las características o comportamiento (especie, tiempo de exposición, concentración) se registró mediante una marca de cotejo, o un valor cuantitativo que determino el investigador de acuerdo a su hallazgo.

Experimento

Para el desarrollo del segundo objetivo específico propuesto para el estudio, el cual corresponde a *Evaluar los porcentajes de germinación de las semillas de Cattleya gaskelliana y Cattleya warscewiczii*, Esto requiere en primera instancia hacer una selección de distintos elementos aportantes al estudio realizado, para ello se hizo necesario definir con claridad la técnica de recolección de datos más idónea, para el cumplimiento de este objetivo, la cual se ha establecido que es la correspondiente al experimento, ya que esta se constituye como un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas-antecedentes), y se analizan las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos-consecuentes).

De igual forma teniendo en cuenta la hipótesis y las variables de estudio, anteriormente propuestas, se determinó que el tipo de experimento empleado corresponde a un cuasi experimento, dado que este manipula deliberadamente una variable independiente para ver su efecto y la relacionan con una o más variables dependientes. En el caso específico de este estudio la variable independiente son los distintos medios de cultivo a los cuales se expondrán las variables de dependientes las cuales corresponden a las semillas de *Cattleya* en cada una de las dos especies propuestas.

Asimismo, el tipo de experimento a emplear corresponde al de Diseño de Muestras Cronológicas, ya que este diseño puede considerarse una variación del experimento de series cronológicas con la diferencia de que la variable independiente (tratamiento experimental) se introduce en reiteradas ocasiones.

Observación cuantitativa

Para el desarrollo del tercer objetivo específico, el cual hace referencia a *Determinar el medio de cultivo in vitro más adecuado para la germinación asimbiótica de Cattleya gaskelliana y Cattleya warszewiczii*. Se estableció que la técnica de recolección de datos empleada es la observación cuantitativa, la cual consiste en el registro sistemático, válido y confiable de comportamientos por parte del investigador, la cual de acuerdo a los hallazgos encontrados en el desarrollo de todos los pretratamientos a los cuales las semillas de las dos especies fueron expuestas, se seleccionaron a criterio del investigador cual es la más adecuada para realizar la germinación asimbiótica *in vitro* de la *Cattleya*, de acuerdo a los resultados obtenidos en el desarrollo de cada una de las fases de germinación.

3.6 Fases de la investigación

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos en esta investigación se llevó a cabo el desarrollo de las siguientes fases.

Fase I: Preparación del material experimental

Material vegetal

Las cápsulas maduras de la especie *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, resultado de la polinización natural se colectaron en el primer mes del proyecto, en el restaurante y vivero “La Orquídea” que está situado en el municipio de Bochalema, Norte de Santander. Para detectar la madurez de las cápsulas se analizaron la transición de color verde (inmadura) a color amarillo (madura) (Kitsaki *et al.*, 2004). De igual forma se introdujeron las cápsulas en papel kraft para su almacenamiento a 4 °C, en frascos de vidrio, al cual se les aplico 10 g de silica gel para prevenir el deterioro de las cápsulas por humedad y posibles brotes de microorganismos patógenos (Dutra *et al.*, 2008; Vogel & Macedo, 2011; Salazar & Cancino, 2012).

Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivos empleados son el medio basal MS, preparado bajo las concentraciones de macro y micronutrientes al 100% (Murashige & skoog, 1962), con 3000 mg*L⁻¹ de sacarosa, 700 mg*L⁻¹ de agar, 100 mg*L⁻¹ de myo-inositol y 1000 mg*L⁻¹ de carbón activado. Se usaron seis medios de cultivo para esta investigación, el cual el primero es el medio basal de MS como control, seguido del medio para siembra de semillas de orquídea (OSSM) con agar, sin carbón, medio II. Ref P727 – 1Lt., MS suplementado con agua de coco (MS+AC), MS suplementado con jugo de piña (MS+JP); MS más 0,5 mg*L⁻¹ de ácido indolacético (MS+AIA) y MS más 0,5 mg*L⁻¹ de ácido giberélico (MS+ GA₃). Los medios con suplemento orgánico, se prepararon adicionando 200 ml*L⁻¹ de agua de coco y jugo de piña (Tabla 4).

Posteriormente se ajustó el pH a 6,2, una vez obtenidas todas las mezclas se calentó a ebullición hasta completar la dilución del agente gelificante y el medio se repartió de a 25 ml en cada uno de las cajas Petri.

Tabla 4 Medios de cultivo utilizados en el desarrollo de las semillas de *Cattleya gaskelliana* y *C. warscewiczii*.

Components (mg/L)	MS	MS	MS	MS	MS	OSSM
		+	+	+	+	
		AC	JP	AIA	GA3	
Ammonium Nitrate	1650	1650	1650	1650	1650	412.5
Boric Acid	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	1.65
Calcium Chloride, Anhydrous	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	83
Cobalt Chloride•6H ₂ O (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.00625
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.00625
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.26	37.26	37.26	37.26	37.26	18.65
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	13.93
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7	180.7	180.7	180.7	180.7	75.18
Manganese Sulfate•H ₂ O	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	4.23
Molybdic Acid, Disodium Salt•2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.0625
Potassium Iodide	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.2075
Potassium Nitrate	1900	1900	1900	1900	1900	475
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous	170	170	170	170	170	42.5
Zinc Sulfate•7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	2.65
Activated Charcoal						1000
Agar	8000	8000	8000	8000	8000	8000
<i>myo</i> -Inositol	100	100	100	100	100	100
MES•H ₂ O						500
Nicotinic Acid						1.0
Peptone from Meat						2000
Pyridoxine•HCl						1.0
Sucrose	30,000	30,000	30,000	30,000	30,000	20,000
Thiamine•HCl	0.1	0.1	0.1	0.1		10
Gibberellic acid					0.5	
indoleacetic acid				0.5		
Coconut wáter	200 ml					
Pineapple juice	200 ml					

MS: medio Murashige y Skoog (1962); MS con agua de coco (MS+AC); MS con jugo de piña (MS+JP); MS con ácido indolacético (MS+AIA); MS con ácido giberélico (MS+GA3); Medio de siembra de semillas de orquídeas (OSSM).

Fase II. Análisis experimental de las semillas

Pre acondicionamiento y viabilidad de las semillas

Para determinar la viabilidad de las semillas, se utilizó la prueba de tetrazolio y para incrementar la eficacia de esta, se evaluaron cuatro pretratamientos. En primer orden se utilizó agua destilada (Lallana & García, 2013; Hosomi *et al.*, 2012). En segundo orden se empleó una solución de sacarosa en concentración del 10% (Márquez *et al.*, 2013; Hosomi *et al.*, 2011). Como tercer y cuatro pretratamientos se aplicaron concentraciones de hipoclorito de sodio al 0,5% y al 1%. (Salazar, 2012; Billard, Dalzotto & Lallana, 2014). La exposición de las semillas en estos pretratamientos, se hará bajo inmersión de 10 min.

Mediante el uso de una jeringuilla de 5 ml con un filtro de tela (Salazar, 2012). Se tomaron las semillas sin previo acondicionamiento como control. Pasado el tiempo de inmersión las soluciones fueron extraídos y se eliminaron los excedentes con tres enjuagues, usando agua destilada. Para determinar la viabilidad, se succionaron 5 ml de la solución de tetrazolio (2, 3, 5 trifenil tetrazolio), exponiendo las semillas a diferentes concentraciones (0.25 % y 0.5 %) y tiempos de exposición (24h y 48h), en total oscuridad a una temperatura de 25 °C. La viabilidad de las semillas se clasificó según la coloración del embrión con ayuda de un estereoscopio microscopio LEICA EZ4. Las semillas viables son las que presenten tinción roja en el embrión, por la reducción del tetrazolio debido a la respiración celular, por el contrario, las semillas no viables mantuvieron su color original, lo cual manifiesta una viabilidad menor o muerte del embrión (Custodio *et al.*, 2016, Soares *et al.*, 2014)

Fase III: Evaluación de medios de cultivo

Desinfección del material, Siembra de cultivo

Para esta investigación se requirió realizar una adecuada preparación de materiales (esterilización), de forma anticipada, esto con el fin de tener la total disponibilidad de los materiales, para su correspondiente manejo y adecuado uso. Los materiales empleados para los distintos procedimientos o protocolos implementados son frascos de vidrio, frascos con agua destilada, servilletas, pinzas, bisturí, gasa, papel aluminio, papel kraft, como a su vez se utilizará hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% y alcohol al 70%. Una vez dispuestos los medios en cada recipiente del cultivo, se realizó el cerrado de estos con papel aluminio y se llevaron a la autoclave, donde se esterilizaron bajo una presión de 15 libras por 20 minutos (Botero *et al.*, 2008).

Para la desinfección y siembra de semillas se utilizó el método de la jeringuilla (Vendrame *et al.*, 2007), el cual consistió en colocar una porción pequeña de semillas en una jeringa estéril de 5 ml con un filtro de tela, las semillas se sumergieron en la solución de etanol al 70% durante 30 segundos, luego fueron sometidas a la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0 % con 2 gotas de Tween 20 (agente tensioactivo), durante 5 minutos en agitación constante, seguidamente se realizaron 5 lavados con agua deionizada estéril, se retiró el filtro de la jeringa para realizar la siembra, la cual se realizó en condiciones asépticas, en una cámara de flujo laminar. Se cultivaron 100 semillas en cajas Petri, que contenía 25 mL del medio de cultivo (Salazar, 2012). Luego se depositaron las semillas en las cajas Petri, y fueron cerradas usando papel parafilm (Ruiz *et al.*, 2008) y se llevaron a el área de incubación, en el cuarto de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad, con una intensidad

de luz $25\mu\text{mol/m}$ por segundo. Provista por luz fluorescente y 60 % de humedad relativa, como se evidencia en la Figura 8.

Desarrollo fenológico

El desarrollo fenológico de las semillas se evaluó mediante observaciones al microscopio estereoscopio (LEICA EZ4), tomando fotografías y descripciones de cada una de las etapas de desarrollo descritas según (Vasudevan & Staden, 2010). Las variables que se evaluaron son las descritas en la (Tabla 5). Donde se realizaron evaluaciones cada 8 días durante la fase experimental, registrando las observaciones en formatos y matrices.

Tabla 5 Descripción de las etapas de desarrollo fenológico

ETAPAS	DESCRIPCIÓN	ABREV
0	Semillas no germinadas	SNG
1	Imbibición	IB
2	Germinación	GER
3	Formación de protocormo	FP
4	Desarrollo de rizoides	DR
5	Formación hojas	FH

Fuente:(Vasudevan y Staden, 2010)



Figura 8. Proceso de siembra de *C. gaskelliana* y *C. warszewiczii*. (A). Lavado de material de vidrio. (B). Material de uso (servilletas, papel aluminio, papel Kraft, gasa) en la siembra in vitro. (C). Esterilización de material de vidrio y de uso en la siembra. (D y E). Desinfección de las capsulas. (F). Corte longitudinal de las capsulas (G y H). Siembra en los medios de cultivos de estudio con método de la jeringuilla. (I) . Visualización de la germinación en estereoscopio.

3.7 Técnicas de análisis

Viabilidad de semillas

Una vez que la información ha sido recolectada, transcrita y ordenada la primera tarea consistió en intentar darle sentido (Álvarez, 2005). Para determinar la viabilidad de las semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warszewiczii*, se realizó un diseño experimental tipo factorial en el cual se tiene dos concentraciones de tetrazolio (0,25% y 0,5%), en dos tiempos de exposición (24h y 48 h) y cinco pretratamientos (Control, Cloro 0,5%, Cloro 1%, H₂O_d, Sacarosa) (Tabla 6), se hicieron seis repeticiones en la cual cada repetición tendrá 100 semillas, para un total de 120 unidades experimentales, por cada especie.

Tabla 6 *Diseño experimental de viabilidad de semillas*

CONCENTRACION DE TETRAZOLIO	TIEMPO DE EXPOSICION	PRETRATAMIENTO	# DE REPETICIONES	TOTAL	
0,25%	24 HORAS	Control	6	120 UE	
		Cl 0,5%	6		
	48 HORAS	Cl 1%	6		
		H ₂ O d	6		
	0,5%	24 HORAS	Sacarosa		6
			Control		6
48 HORAS		Cl 0,5%	6		
		Cl 1%	6		
		H ₂ O d	6		
		Sacarosa	6		

Cl: Cloro, H₂Od: Agua destilada. UE: Unidad Experimental

Germinación en medios de cultivos

Para hallar que medio de cultivo es el más adecuado para la germinación de las semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, se hizo un diseño experimental tipo factorial el cual consto de seis etapas de desarrollo de germinación y seis medios de cultivo (MS, MS+GA₃, MS+AIA, MS+AC, MS+JP Y OSSM), con seis repeticiones y en cada repetición habrán 100 semillas, para un total de 216 unidades experimentales por cada especie como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7 Diseño experimental para medios de cultivo

FASES DE GERMINACIÓN	MEDIOS DE CULTIVOS	# DE REPETICIONES	TOTAL
F0	MS	6	216 UE
	OSSM	6	
	MS + AC	6	
	MS + JP	6	
	MS+AIA	6	
	MS + GA₃	6	
F1	MS	6	
	OSSM	6	
	MS + AC	6	
	MS + JP	6	
	MS+AIA	6	
	MS + GA₃	6	
F2	MS	6	
	OSSM	6	
	MS + AC	6	
	MS + JP	6	
	MS+AIA	6	
	MS + GA₃	6	
F3	MS	6	
	OSSM	6	
	MS + AC	6	
	MS + JP	6	
	MS+AIA	6	
	MS + GA₃	6	
F4	MS	6	
	OSSM	6	
	MS + AC	6	
	MS + JP	6	
	MS+AIA	6	
	MS + GA₃	6	
F5	MS	6	
	OSSM	6	
	MS + AC	6	
	MS + JP	6	
	MS+AIA	6	
	MS + GA₃	6	

MS: medio Murashige y Skoog (1962); MS con agua de coco (**MS+AC**); MS con jugo de piña (**MS+JP**); MS con ácido indolacético (**MS+AIA**); MS con ácido giberélico (**MS+GA3**); Medio de siembra de semillas de orquídeas (**OSSM**); UE: Unidad Experimental

Continuando con el análisis de la información, se realizó un análisis estadístico, en el cual los datos fueron sometidos a análisis de varianza (Anova) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples de HSD (*honesto diferencia significativa*) de *Tukey* para determinar las diferencias significativas a un nivel de $P < 0.05$ (*Tukey, 1994*).

Para el desarrollo fenológico se evaluaron cada semana, durante 18 semanas después de la siembra, mediante las fases de desarrollo de orquídeas adaptadas por Vasudevan y Staden (2010)

4. Resultados y análisis

4.1. Efecto de los pretratamientos en el porcentaje de viabilidad de las semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*

Para el desarrollo y ejecución del primer objetivo el cual estaba orientado a determinar el pretratamiento más adecuado para optimizar la viabilidad de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* utilizando la prueba de tetrazolio. Se utilizaron y se evaluaron cuatro pretratamientos basados en agua destilada, solución de sacarosa en concentración del 10%, y se aplicaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio al 0,5% y al 1%, cada uno de estos pretratamientos se realizaron por inmersión de semillas por un tiempo de diez minutos para cada pretratamiento, esto se realizó como fase de preacondicionamientos de las semillas, una vez culminado el preacondicionamientos de las semillas, se enjuagaron con agua destilada para retirar todas las soluciones aplicadas y se procedió a realizar la prueba de tetrazolio en solución de 5 ml, en los cuales se tomaron distintos grupos de semilla, de acuerdo a los pretratamientos aplicados en donde se les realizó variación en la aplicación del tetrazolio de acuerdo a diferentes cantidades de concentración (0.25 % y 0.5 %) y de exposición del mismo en la semilla (24h y 48h), en una temperatura controlada de 25 °C y en total oscuridad, en las cuales transcurrió el tiempo de exposición estas empezaron a presentar una tinción roja en el embrión de cada semilla identificando de esta manera las semillas viables, dado que de la prueba de tetrazolio se deriva una coloración roja particular ya que esta se obtiene debido a la reducción de la sal de tetrazolio a formazan (Salazar y Gélves, 2015), en respuesta a la liberación de hidrogeno por la acción de la enzima deshidrogenasa, cuando ocurre el proceso de respiración celular (Carvalho *et al.*, 2017). Por el contrario, cuando el embrión no reacciona con la solución este continua con el color natural,

lo cual indica que no se detectan células viables con metabolismo activo (Takao *et al.*,2017; Stefanowicz-Hajduk & Ochocka, 2020) (Figura 9).

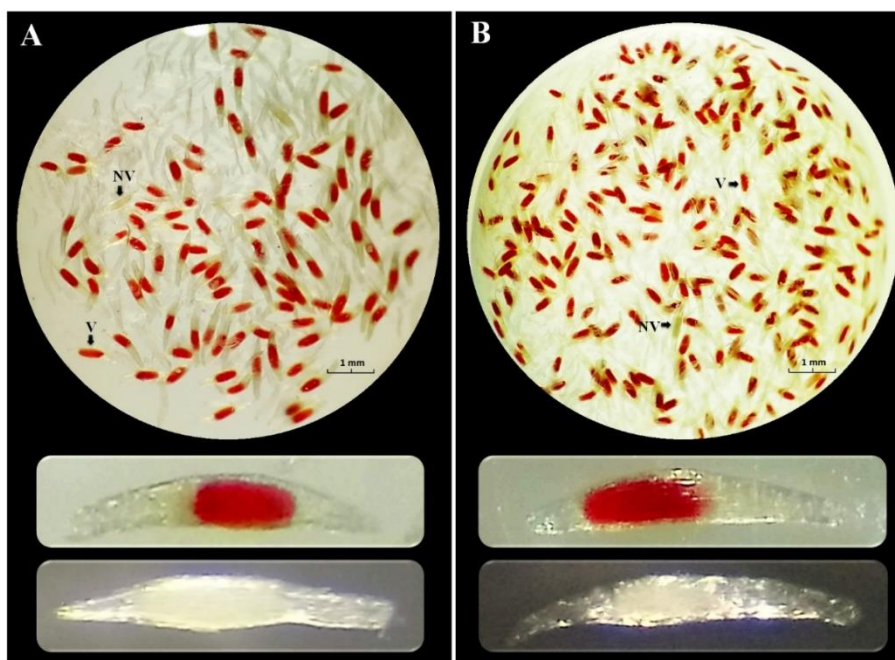


Figura 9. Viabilidad de semillas usando la prueba de tetrazolio. (A) Semillas viables (coloración roja) y no viables (color normal) de *C. gaskelliana* (B) Semillas viables y no viables de *C. warszewiczii*. V: Viable. NV: No viable.

Se constataron diferencias estadísticamente significativas, al hallar el efecto que tienen los preacondicionamientos, las concentraciones de tetrazolio y los tiempos de exposición en la coloración de las semillas, y en las especies de *Cattleya* utilizada. En la especie de *Cattleya gaskelliana*, en primer lugar, el porcentaje con mayor viabilidad se obtuvo al someter las semillas al pretratamiento de Cloro al 1% con un 86,4 % de viabilidad, en el cual al estar en concentración al 0,5% y 48h de exposición, se logró alcanzar un 90,6 % de semillas viables (Tabla 8). En segundo lugar, el pretratamiento con cloro al 0,5%, arrojó resultados similares al pretratamiento con Cloro al 1%, siendo estos estadísticamente homogéneos entre sí, según sea, el tiempo de exposición y las concentraciones utilizadas, dando el segundo mejor resultado para la prueba de viabilidad con

tetrazolio. Esto permite determinar que el cloro al 1% y al 0,5% tienen una mayor influencia en la viabilidad de las semillas. Por el contrario, el pretratamiento donde se realizó la inmersión con agua destilada, fue donde se halló el menor porcentaje viabilidad con un 46,8%, siendo más bajo en comparación del control, cuando se sometió a una inmersión de 0,25% y 24h de exposición.

Tabla 8 Prueba de tetrazolio en semillas de *C. gaskelliana* utilizando diferentes pretratamientos

Pretratamientos	Viabilidad de semillas			
	0.25%-24h	0.25%-48h	0.5%-24h	0.5%-48h
Control	69,6±1.5 ^b	43±3.0 ^c	58.6±8.3 ^{b,c}	72.1±5 ^{b,c}
Cloro 0.5%	84,6±5 ^a	84±10.5 ^a	70.7±4.1 ^{a,b}	82±4.87 ^{a,b}
Cloro 1%	81,3±4.1 ^a	89.3±5 ^a	84.5±7 ^a	90.6±5 ^a
H2Od	27,3±5 ^c	66±4 ^b	47.3±6.4 ^c	46.6±2.8 ^c
Sacarosa	28±2 ^c	47.1±7 ^c	61.8±5 ^{b,c}	72.6±8.8 ^{b,c}

Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de *Tukey HSD* ($P \leq 0.05$).

De acuerdo con la coloración de las semillas viables de la especie de *Cattleya warscewiczii* los pretratamientos con Cloro al 1% y 0,5% en cada una de las concentraciones y tiempos de exposición, tuvo un mejor comportamiento en los porcentajes de viabilidad del 85,4% y 84,8%, siendo estadísticamente homogéneos entre sí. El mayor porcentaje de viabilidad fue del 90% en una concentración al 0,25% y 48h de exposición, siendo la cifra más significativa en el pretratamiento de Cloro al 1%. De igual manera, en el pretratamiento con Cloro al 0,5% y 24h de exposición se pudo observar una viabilidad del 88,92% (Tabla 9). Mientras, que los pretratamientos con agua destilada y sacarosa no tuvieron diferencias significativas entre sí, pero si entre los pretratamientos con cloro (0,5% y 1%), debido a que los porcentajes de semillas viables fueron de 53, 2 % con agua destilada y 50,1% con sacarosa. Esto concuerda con Lallana & Garcia (2013), debido a que el pretratamiento con sacarosa al 10%, no permite tener excelentes lecturas de

viabilidad utilizando la prueba de tetrazolio. Aunque Hosomi *et al.*, (2017); Salazar *et al.*, (2019), en *Cattleya sp.* y *Epidendrum barbaricum*, encontraron que la sacarosa al 10% mejoró la tinción para la identificación de semillas viables. Por último, el control en las distintas concentraciones y tiempos de exposición fue el que obtuvo resultados inferiores.

Tabla 9 Prueba de tetrazolio en semillas de *C. warscewiczii* utilizando diferentes pretratamientos.

Viabilidad de semillas a diferentes concentraciones y tiempo de exposición con tetrazolio				
Pretratamientos	0.25%-24h	0.25%-48h	0.5%-24h	0.5%-48h
Control	22.4±1.9 ^c	59.2±0.5 ^c	38±4 ^c	46±5.7 ^c
Cloro 0.5%	83.2±1.5 ^a	87.26±2.5 ^a	88.92±10.2 ^a	80.05±5.2 ^{a,b}
Cloro 1%	89.6±4 ^a	90±4 ^a	80.18±12.1 ^a	81.9±5 ^a
H2Od	53.2±3.1 ^b	82.04±4.16 ^{a,b}	77.32±8.08 ^b	67.3±3 ^{b,c}
Sacarosa	50.1±6.1 ^b	65.32±9.0 ^{b,c}	61.8±8.3 ^{b,c}	62.79±3.05 ^{b,c}

Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de *Tukey HSD* ($P \leq 0.05$).

Al realizar una comparación entre las dos especies de *Cattleya* evaluadas en este estudio, se observó que el pretratamiento que arrojó mejores resultados fue el pretratamiento de cloro al 1%, en el mismo tiempo de exposición, pero en diferentes concentraciones. Ya que en *C. gaskelliana* la concentración de 0,5% de tetrazolio, el resultado fue de un 90,6% de semillas viables, mientras que en la *C. warscewiczii* la concentración del 0,25% de tetrazolio el porcentaje de viabilidad fue del 90%, lo que indica que al aplicar el pretratamiento de cloro al 1% y exponer las semillas a concentraciones de tetrazolio por 48 horas (Tabla 8 y 9), permiten que el tetrazolio penetre fácilmente la cubierta que envuelve el embrión y ayuda a que se pueda apreciar fácilmente la viabilidad. Esto concuerda según lo expuesto por Álvarez *et al.*, (2006), en donde el hipoclorito de sodio generó una mayor viabilidad en *Cattleya bicolor*. Sin embargo, en un estudio realizado por Salazar *et al.*, (2020), el cloro a concentraciones de 0.5 y 1% arrojó una mínima viabilidad en

Epidendrum elongatum y *Epidendrum fimbriatum*. Estudios recientes, indican que el hipoclorito de sodio en dosis altas, tiene efectos citotóxicos al inhibir el ciclo celular e inducir anomalías cromosómicas en células de *Pisum sativum* y *Lens culinaris* (Salazar *et al.*, 2019; Salazar y Maldonado, 2020). Además, según Kaneko y Morohashi (2003), el cloro causa un efecto negativo en la actividad metabólica de la célula vegetal. Según lo anterior, algunas especies de orquídeas tienen una mayor sensibilidad al cloro afectando su fisiología, dicha situación no ocurrió en *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii* ya que estas en la exposición de cloro tuvieron un efecto positivo en la viabilidad y germinación de semillas, en donde la prueba de tetrazolio fue efectiva para determinar la viabilidad de estas dos especies en los medios de cultivos anteriormente expuestos.

Ya que la viabilidad obtenida en el estudio de las especies es significativamente alta, para la especie *C. gaskelliana* se extrajeron resultados del 90,6%, en relación a la *C. warscewiczii*, en donde los efectos alcanzados son del 90%. En contraste con lo anterior, la prueba de viabilidad ha demostrado no ser un buen indicador de germinación dado a que no se examina el desarrollo y la capacidad de división celular (Valdivia *et al.*, 2018; Padilla, 2011). Por tanto, la prueba debe ser validada con la prueba de germinación (Vudala & Ribas, 2017; Valdivia, 2015; Muñoz y Jimenez, 2008; Johnson *et al.*, 2007; Johnson y Kane, 2007).

Los seis medios de cultivos analizados para la germinación asimbiótica in vitro de semillas de *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*, arrojan los siguientes datos, en primer lugar, los resultados totales de germinación derivados de la sumatoria de los datos parciales de cada medio de cultivo empleado corresponden a la primera especie de un 89,18% y para la segunda especie 91,35% (Tabla 10). Presentando una escasa disimilitud entre la prueba de viabilidad y la prueba de

germinación, para la especie de *C. gaskelliana* los resultados obtenidos son del 1,41% mientras que para la *C. warscewiczii* es de 1,35%, demostrando de esta manera que no se presentan diferencias significativas en las dos especies estudiadas dado que la probabilidad de semejanza es inferior al 0,05. Lo que demuestra que al emplear la prueba de tetrazolio se manifiesta una capacidad optima de germinación para las especies *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*, siendo a su vez, esencial para la conservación y propagación in vitro de las especies de orquídeas, así como Thompson *et al.*, (2006) lo precisa. Asimismo, es de señalar que en el género *Cattleya sp*, se ha utilizado la prueba de tetrazolio para determinar la viabilidad de las semillas. Hosomi *et al.*, (2011), así como en hallar la capacidad de germinación y desarrollo de plántulas en las diferentes especies de orquídeas (Salazar & Cancino, 2012; Mweetwa *et al.*, 2008; Yamazaki y Miyoshi, 2006). Cabe señalar que durante el almacenamiento de diversas especies de orquídeas disminuye la viabilidad de las semillas (Hirano *et al.*, 2011).

Tabla 10 Porcentaje de germinación en las semillas de orquídeas de *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*

Porcentaje de Germinación		
Medio de Cultivo	<i>C. gaskelliana</i>	<i>C. warscewiczii</i>
MS	88.4±1.5 ^{a,b}	90.4±0.5 ^{a,b}
OSSM	89±0.7 ^{a,b}	91±1.4 ^{a,b}
MS + AC	90.2±0.8 ^b	91.8±8.2 ^b
MS + JP	90,7 ± 0,9 ^b	92,1 ±3,8 ^b
MS + AIA	87.8±1.3 ^a	91±0.8 ^{a,b}
MS + GA ₃	89 ±1.58 ^{a,b}	91.8±0.83 ^{a,b}

4.2. Germinación de las semillas en medios de cultivo *in vitro* para la germinación asimbiótica de semillas de las especies *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*.

Para el desarrollo y ejecución del segundo objetivo el cual estaba orientado a evaluar los porcentajes de germinación de las semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*. Y del tercer objetivo planteado al inicio de este estudio guiado a determinar el medio de cultivo *in vitro* más adecuado para la germinación asimbiótica de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*.

Se realizó la preparación y desinfección del material, para la posterior siembra de las semillas con implementación del método de Jeringuilla el cual consistió en colocar una porción pequeña de semillas en una jeringa estéril de 5 ml con un filtro de tela, las semillas se sumergieron en la solución de etanol al 70% durante 30 segundos, luego fueron sometidas a la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0 % con 2 gotas de Tween 20 (agente tensioactivo), durante 5 minutos en agitación constante, seguidamente se realizaron 5 lavados con agua deionizada estéril, se retiró el filtro de la jeringa para realizar la siembra, la cual se realizó en condiciones asépticas, en una cámara de flujo laminar. Se cultivaron 100 semillas en cajas Petri, que contenía 25 mL del medio de cultivo establecido. Luego se depositaron las semillas en las cajas Petri, y fueron cerradas usando papel Parafilm y se llevaron a el área de incubación, en el cuarto de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad, con una intensidad de luz $25\mu\text{mol/m por segundo}$. Provista por luz fluorescente y 60 % de humedad relativa.

En el desarrollo del estudio de germinación en las especies de *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*, se evidenció que los embriones aumentaron su periferia y longitud, a los 14 días después de la siembra, lo que demuestra disparidad en los hallazgos presentados por Salazar-

Mercado y Vega-Contreras (2017) en los cuales dichos resultados se evidenciaron en el día 15 en la especie *C. trianae*, al absorber agua y nutrientes se quiebra la testa “Fase 2” (Figura 10), de igual forma y según la bibliografía revisada, señalan que en esta fase se inicia la formación de protocormos y después la formación de rizoides como lo evidencio Sulong *et al.* (2016).

Del mismo modo en la ejecución del presente estudio se evidencio que en los seis medios de cultivos empleados se obtuvo una germinación promedio del 89,18% en la especie *C. gaskelliana* y 91,35% en *C. warszewiczii*, alcanzando su germinación máxima a las 18 semanas de desarrollo, dando inicio en la semana 3. En donde en la especie *C. gaskelliana* obtuvo un porcentaje de germinación total del 90,7% en donde corresponde al medio MS con jugo de piña (MS+JP) y del 90,2% en MS con agua de coco (MS+AC), siendo estadísticamente homogéneas. En cuanto a la especie en *C. warszewiczii* los medios de cultivos idóneos, según el porcentaje de germinación son medio MS con jugo de piña (MS+JP) y MS con agua de coco (MS+AC) con un 92,1% y 91,8% sin diferencias significativas.

Tabla 11 Efecto del medio de cultivo en la germinación y formación de plántulas de *C. gaskelliana* a las 18 semanas de desarrollo.

Medios	Fases de Desarrollo					
	F0	F1	F2	F3	F4	F5
MS	12±1.5 ^{a,b}	11.8±2.1 ^a	40±0.7 ^a	30.2±1.9 ^a	6.4±2.1 ^a	0 ^a
OSSM	11±0.7 ^{a,b}	4.8±4.8 ^b	18±1.8 ^b	14.2±0.83 ^b	30±0.7 ^b	22±2 ^b
MS + AC	9.8±0.8 ^b	3.2±3.2 ^b	8.4±1.9 ^c	15.2±1.6 ^b	31.8±1.4 ^b	31.6±0.8 ^c
MS + JP	8.3± 0.8 ^b	2.4±2.9 ^b	8.2±1.5 ^c	16.8±1.2 ^b	32±1.8 ^b	32.3±0.9 ^c
MS + AIA	12.2±1.3 ^a	27.6±1.8 ^b	31.2±2.2 ^a	17±2.8 ^b	12±1.2 ^c	0 ^a
MS + GA ₃	11±1.58 ^{a,b}	15.8±1.3 ^d	16.4±3.1 ^b	30±0.7 ^a	26.8±1.4 ^c	0 ^a

Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de *Tukey HSD* ($P \leq 0.05$).

En contraste con lo anterior, las fases de desarrollo de las especies de *C. gaskelliana* y *C. warszewiczii*, han sido cambiantes en los seis medios de cultivos, durante las 18 semanas valoradas, sucediendo distinto en la *Fase 0* (F0: SNG), en la cual fue similar en todos los medios cultivos (Tabla 11 y 12; Figura 10C). en cuanto a la *Fase 1* (F1: IB) se observa un mayor porcentaje de imbibición en el medio MS+AIA, en los cuales para la especie *C. warszewiczii*, corresponde a un 34%, en comparación de la especie *C. gaskelliana* en donde se obtuvo un 27,6% evidenciando notorias diferencias frente a los otros medios empleados (Tabla 11 y 12; Figura 10D). Con respecto a la fase 2, la cual se da inicio en 2 segunda semana después de la siembra en donde el embrión incrementa su forma y tamaño, obteniendo una coloración verde marcada, originándose una ruptura de la testa. (F2: GER; Figura 10E), se observó que sobre la semana 4 se presenta un desequilibrio en el desarrollo del embrión, en donde se evidencia un mayor porcentaje en los medios MS y MS+AIA, para la especie en *C. gaskelliana*, la germinación obtenida para estos medios de cultivo corresponde a un 40% y 31,2% mientras que en la especie *C. warszewiczii*, en los mismos medios de cultivo los resultados son de 39,4% y 35,6% (Tabla 11 y 12). En relación, a la *Fase 3* (F3: FP; Figura 10F y 10G) se evidencia la formación de protocormos, en donde los datos arrojan que los medios de cultivo con mayores resultados corresponden a MS y MS+GA₃, en donde los resultados para la especie *C. gaskelliana* son de 30,2% y 30%, en contraste con la especie *C. warszewiczii* en donde con los mismos medios de cultivo se obtienen resultados del 32,2%. Lo que se traduce en que no existen diferencias significativas en esta fase en las especies de estudio referenciadas. A su vez en la fase 4 (F4: DR; Figura 10H e 10I), en el cual se da el desarrollo de rizoides se evidenciaron distintos resultados, en un primer momento el medio de cultivo que genero mejores comportamientos en cuanto a la germinación el MS+GA₃, a diferencia del MS que presento un menor desarrollo de rizoides con datos del 6,4% en *C. gaskelliana* y para *C. warszewiczii*, en cuanto al medio MS+AIA en ambas especies se observaron resultados de 7,2% (Tabla 11 y 12),

esto con relación a los otros medios de cultivo. Finalmente, en la fase 5 (F5: FH; Figura 10J) en donde, se produce la elongación de la primera hoja, para las dos especies evaluadas se encontraron datos similares en empleo de medio de cultivos MS+JP y MS+AC, con un 32% y 30,4%, sin diferencias significativas.

Tabla 12 Efecto del medio de cultivo en la germinación y formación de plántulas de *C. warszewiczii* a las 18 semanas de desarrollo.

Medios	Fases de Desarrollo					
	F0	F1	F2	F3	F4	F5
MS	9.6±0.5 ^{a,b}	21.6±0.89 ^a	39.4±1.3 ^a	20.4±1.8 ^a	9±0.7 ^a	0 ^a
OSSM	9±1.4 ^{a,b}	9±1.4 ^b	6.8±2.1 ^b	19.6±1.1 ^a	36.8±1.6 ^b	18.8±2.1 ^b
MS + AC	8.2±1.2 ^a	2.8±1 ^c	6.8±2.5 ^b	21.8±0.8 ^a	31.2±1.7 ^c	29.2±0.8 ^c
MS + JP	7.5±1.8 ^a	2.4±0.8 ^c	6.9±1.9 ^b	21±1.5 ^a	31.8±2 ^c	30.4c±2.5 ^c
MS + AIA	10.6±0.8 ^b	34±1 ^d	35.6±0.8 ^a	14.2±2.8 ^b	7.2±0.8 ^a	0 ^a
MS + GA ₃	8.2±0.83 ^a	12.6±1.5 ^b	19.4±2.5 ^c	32.2±1.7 ^c	23.4±2 ^d	4.2±0.83 ^d

Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de *Tukey HSD* ($P \leq 0.05$).

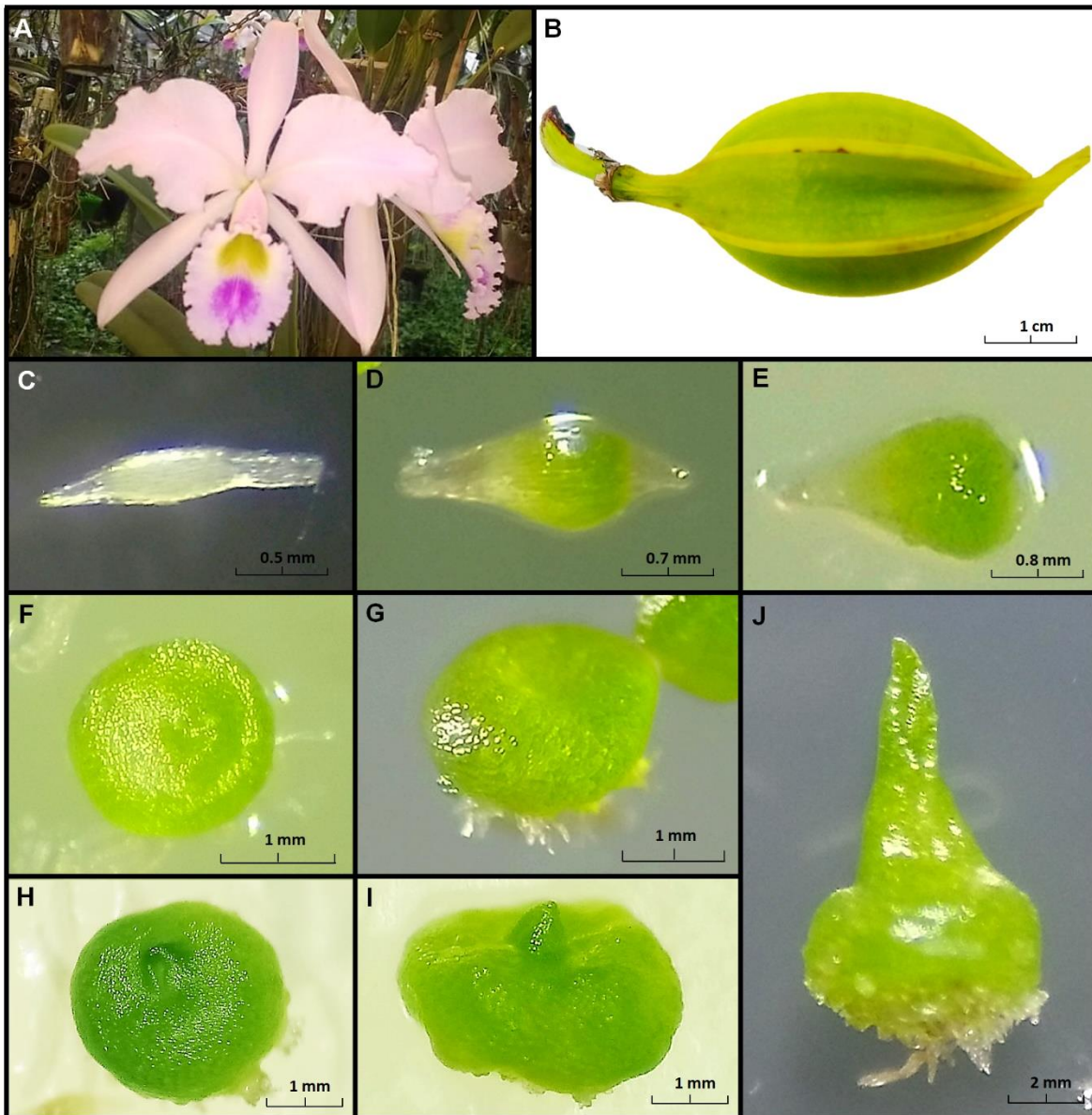


Figura 10. Etapas del desarrollo de *C. gaskelliana*. (A) Flor (B) Capsula (C). Fase 0. (D). Fase 1. (E) Fase 2. (F) Fase 3: Protocormo (G) Fase 3: Protocormo con rizoides. (H y I). Fase 4: Aparición de la primera hoja. (J) Fase 5: Elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior.

En cuanto a las necesidades nutricionales y minerales de las especies de orquídeas en muchos casos son diferenciadas tanto en la germinación y el desarrollo de plántulas. Por ende, es

indispensable explorar cual es el medio de cultivo *in vitro* adecuado para cada uno de ellos (Ruiz *et al.*, 2008). Ya sea en la conservación o la preservación de orquídeas (Zeng *et al.*, 2012; Kauth *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2010). Así como lo señala Abbaszadeh *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2015; Asghar *et al.*, 2011, en donde sostiene que el medio de cultivo más utilizado en orquídeas y con mayor éxito es el MS.

En desarrollo de esta investigación, se logró evidenciar que al añadir componentes orgánicos al medio basal (MS), este favorece y permite la germinación del embrión y el desarrollo de las plántulas, debido a que estas tienen aportes nutricionales (Orjuela & Deaza, 2017; Clavijo *et al.*, 2016). Seon *et al.*, 2018.

Se han probado una variedad de extractos naturales en medios de cultivo para semillas de orquídeas, en las cuales se encuentran pulpa de banano, agua de coco, jugo de tomate, jugo de piña y extracto de papa. Debido a que tienen mezclas de aminoácidos y vitaminas, actuando algunos como reguladores de crecimiento (Dulić *et al.*, 2019; Wida *et al.*, 2017 Yong *et al.*, 2009). De igual forma, Kitsaki *et al.* (2004) evidenciaron que los medios de cultivos suplementados con jugo de piña y agua de coco fueron eficaces en *Ophrys*, el primer suplemento su eficacia estuvo en las fases 4 y 5 mientras que el segundo fue efectivo en las primeras tres fases de desarrollo. No obstante, lo encontrado en este estudio se comprobó que los medios MS+JP y MS+AC muestran resultados favorables en cada fase de desarrollo de las especies *C. gaskelliana* y *C. warszewiczii*.

En cuanto, a los otros medios de cultivo estudiados alcanzaron su eficiencia hasta la fase 4 del desarrollo fenológico. Lo cual indica que el uso de extractos naturales en medios de cultivos

produce beneficios en el desarrollo fenológico de las especies *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*. Esto concuerda en lo referenciado por diversos autores, en donde manifiestan que los componentes orgánicos (jugo de piña y coco agua) han tenido una efectividad y en cultivos *in vitro* y han permitido una gran utilización en gran variedad de especies de orquídeas. (Gallo *et al.*, 2016; Salazar *et al.*, 2013; Gnasekaran *et al.*, 2010).

De igual forma, en otros estudios, se encontró que al agregar AIA ($0,5 \text{ mg. L}^{-1}$) en el medio basal (MS), fomento las fases de desarrollo y en especial las raíces de *Vanda tessellata* (Roxb.); *Dendrobium primulinum* Lindl; *Cymbidium aloifolium* (L.); *Acampe premorsa* (Roxb.), *Agrostophyllum khasianum* L. y *Phalaenopsis cornoverris* (Bhattacharjee & Islam, 2014; Pant & Thapa, 2012; Hossain *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2009). A su vez, distintas investigaciones señalan una relación positiva entre niveles endógenos de AIA y la cantidad adventicias producidas por plántula (García *et al.*, 2015; Amador-Alfárez *et al.*, 2013; Chamorro *et al.*, 2007). Asimismo, al añadir GA₃ al medio basal (MS) se destaca la importancia que tiene esta hormona GA₃ debido a que tiene un papel fundamental en el desarrollo vegetal y en la estimulación de otros procesos (El-Abagy *et al.*, 2010; Coello *et al.*, 2010; Naghashzadeh *et al.*, 2009). Aunque según lo manifiesta Dohling *et al.*, 2008, revelo una inhibición en la germinación de semillas de la especie de *Dendrobium longicornu* Lindl y *Dendrobium formosum* Roxb. y en el desarrollo de plántulas cuando se añadió al medio de cultivo la fitohormona GA₃. En definitiva, los medios de cultivos más eficientes en esta investigación fueron los que fueron suplementados con jugo de piña y agua de coco para las dos especies *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*.

5. Conclusiones

Una vez desarrollada y ejecutada el proceso de investigación y analizado los resultados obtenidos se logró determinar que el pretratamiento más adecuado para optimizar la viabilidad de las semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii* fue el pretratamiento con cloro al 1 % ya que este al utilizarlo de forma conjunta con la prueba de tetrazolio, en las dos especies evaluadas mostraron resultados favorables y destacantes, esto debido a que las semillas al estar en contacto directo con el cloro, produce una escarificación en la en la cubierta de las semillas, permitiendo un rápido ingreso del tetrazolio en la tinción del embrión, siendo positivo para optimizar la viabilidad de las semillas, cuando se está utilizando la prueba de tetrazolio. Esto a su vez, indica que la prueba de tetrazolio es idónea y brinda una opción de estudio ágil, en el cual se puede revelar la tasa de germinación de las semillas.

De igual forma la concentración de tetrazolio y el tiempo de exposición tienen una relevancia en la prueba. Ya que la composición de los parámetros, el periodo de exposición de 48 horas y concentraciones de 0,25% y 0,5% evidenciaron un elevado grado de eficiencia para definir la viabilidad de las semillas de estas dos especies. Siendo la prueba de tetrazolio confiable en la determinación de la viabilidad de semillas de *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*, complementándose de manera concreta con las pruebas de germinación *in vitro*.

En este estudio se evaluó los porcentajes de germinación de las semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, en los cuales para las dos especies fue positivo, debido a que se confirma el potencial de propagación por semillas y producción de nuevos individuos, al igual, que se pasó por las seis fases de desarrollo fenológico desde las semillas no germinadas hasta la formación de la hoja, este proceso tuvo una duración de diez y ocho semanas. Al mismo tiempo, al comparar la prueba de viabilidad con la prueba de germinación, se pudo revelar la capacidad germinativa de las especies de *C. gaskelliana* y *C. warscewiczii*, utilizando la prueba de tetrazolio siendo un método seguro

En la investigación se determinó que los medios de cultivos *in vitro* más adecuados para la germinación asimbiótica de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, para lo cual, el medio de cultivo MS suplementado con jugo de piña y agua de coco, fueron los adecuados para la germinación asimbiótica de semillas de *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, ya que logro diversos beneficios en la proliferación de nuevas especies de orquídeas, donde mejoro desde la germinación, el crecimiento de protocormos y desarrollo de las plántulas en ambas especies de estudio, así mismo, contribuyo en la disminución de los costos en su propagación y conservación de estas especies. Dado a que se obtienen volúmenes grandes de material vegetal y por ende se puede sustituir las fitohormonas por componentes orgánicos de adquisición rápida.

Los resultados obtenidos sirven de base para orientar futuras investigaciones acerca posibles composiciones de medios de cultivo con suplementos orgánicos para la germinación *in vitro* de otras especies. Por lo anterior la hipótesis planteada en este estudio fue comprobada.

6. Recomendaciones

Según lo evidenciado en este estudio, se hace necesario investigar que otros suplementos orgánicos se pueden implementar como medios de cultivo para la germinación de semillas de estas u otras especies de orquídeas, tales como pulpa de banano, jugo de tomate, extracto de papa, entre otros. A fin de conocer desde distintos puntos de referencia los alcances y porcentajes de germinación, es decir si tiene una incidencia significativa el suministrar al medio de cultivo MS diversos componentes orgánicos favorecerá la obtención de óptimos resultados iguales o superiores a los aquí recolectados y evidenciados para los casos particulares de la *Cattleya gaskelliana* y *Cattleya warscewiczii*, de igual manera observar los impactos de estos nuevos suplementos orgánicos tiene en la reducción de costos en cuanto a la propagación en masa de estos materiales vegetales.

Referentes bibliográficos

- Abbas, B., Heningtyas, F., Amriati, B. (2011). *In vitro seeds germination and plantlets development of Grammatophyllum scriptum Lindl. (Orchidaceae)*. International Research Journal of Plant Science. 2 (5): 154-159.
- Abbaszadeh, S. M., Miri, S. M., & Naderi, R. (2018). *An Effective Nutrient Media for Asymbiotic Seed Germination and In Vitro Seedling Development of Phalaenopsis 'Bahia Blanca'*. Journal of Ornamental Plants, 8(3), 183-192.
- Abdelnour, A. y Vicent, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Centro Agronomico Tropical de Investigacion. Costa Rica.
- Álvarez J. (2005). *Cómo hacer investigación cuantitativa. Fundamentos y metodología*. México: Paidós.
- Alvarez-Pardo, V. M., Ferreira, A. G., & Nunes, V. F. (2006). *Seed disinfestation methods for in vitro cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil*. Horticultura Brasileira, 24(2), 217-220.
- Amador-Alfárez KA, Díaz-González J, Loza-Cornejo S, Bivián-Castro EY. (2013). *Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de Ferocactus (Cactaceae)*. Polibotánica. 2013;(35):109–31.
- Araméndiz, H., Cardona, C. & Jarma, A. (2013). *Eficiencia de dos métodos para evaluar la viabilidad del polen de berenjena (Solanum melongena L. cv. Lila criolla)*. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient, 16(2), 351-358.

Arditti, J. (1984) *An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture*. Bot J Linn Soc 89:359–381.

Arditti, J. (2008). *Micropagation of orchids, 2nd end*. Blackwell, Cambridge.

Arditti, J., (1982). *Introduction, North American Terrestrial Orchids, etc., In: Orchid biology. II. Reviews and perspectives. Orchid seed germination and seedling culture – a manual, ed. Arditti, J., p. 245-73, 278-93, Ithaca, New York: Cornell University Press.*

Arditti, J., Ghani, A., (2000). *Tansley review, 110 – numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications*. New Phytol. 145, 367–421.

Arditti, J., R. Ernst, T. W. Yam y C. Glabe. (1990). *The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review*. Lindleyana, 5(4): 249-255.

Arias, O., Y Valverde, M. (1988). *Producción y variación somaclonal de plantas de banano variedad Grande Naine producidas por cultivos de tejidos*. Revista de la Asociación Bananera nacional (ASBANA). Costa Rica. 11(28): 6-11.

Asghar, S., Ahmad, T., Ahmad, I., Yaseen, M. (2011). *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. African Journal of Biotechnology. 10(16): 3097-3103.

Asociación Jalisciense de orquideología, (2015). *Partes de la orquídea según tipo de crecimiento*. México.

Asociación Jalisciense de orquideología, (2015). *Partes de la flor de la orquídea*. México.

Ávila, I. y Salgado, R. (2006). *Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación*. Biológicas. Vol 8. p.p 138-149.

- Azcon, J. y Talon, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal*. (N. 581.1) McGraw-Hill Interamericana.
- Barsanti, M. & Lallana, V. (2013). *Cultivo in-vitro y aclimatación de plantas de un híbrido del género Cattleya (Orchidaceae)*. XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores. AUGM. Corrientes, Argentina, 14, 1053-1054.
- Bell, A. D., y A. Bryan. (1991). *Plant from- An illustrated Guide to Flowering Plant Morphology*. Oxford University Press, Orford.
- Benson, E. (2000). *Special symposium: In vitro plant recalcitrance: An introduction*. In vitro Ce// Dev.Bioi-Piant. 36:141-148
- Bhattacharjee, B. and Islam, S.M.S. (2014) *Effects of Plant Growth Regulators on Multiple Shoot Induction in Vanda tessellate (Roxb.) Hook. Ex G.Don An Endangered Medicinal Plant*. International Journal of Science and Nature , 5, 707-712.
- Bhattacharjee, B. and Islam, S.M.S. (2014). *Development of an Efficient Protocol for in Vitro Germination and Enhancing Protocorm-Like Body Development in Three Indigenous Orchid Species in Bangladesh*. Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 22, 209-218.
- Bhattacharyya, P., Kumar, V. & Staden, J. (2017). *Assessment of genetic stability amongst micropropagated Ansellia africana, a vulnerable medicinal orchid species of Africa using SCoT markers*. S Afr J Bot, 108, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.11.007>
- Billard, C., Dalzotto, C. & Lallana, V. (2014). *Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género Oncidium*. Polibotánica, (38), 145-157.

- Botero, L., Jaramillo, M., Ramirez, Ó., Fernández, T., & Restrepo, E. (2008). *Avances en la propagación asimbiótica in vitro de orquídeas con especial énfasis en el género Cattleya*. *Tendencias de la investigación en Ingeniería Ambiental*, 1, 227-25.
- Calva C. Ríos L. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) *Aspectos aplicados de la biotecnología*. pp 267- 301.
- Campos, P. (2002). *Biología/Biology (Vol.2)*. Editorial Limusa.
- Campusano, F. T. A. G., González, G. M., Flores, G. G., Mendoza, A. P., Ávila, V. M. C., & Guzmán, J. M. (2019). Morfogénesis in vitro de brotes adventicios del pinabete mexicano *Pseudotsuga menziesii*. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(56).
- Campuzano K. (2018). Inducción de morfogénesis a partir de tejido caloso de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris*) tolerante a estrés hídrico.
- Canuto, R. (2012). *Dehydrogenases in tech desing team*. Croatia. ISBN 978-953-307-019-3. 2012. p 366.
- Carvalho, I.L; Meneghello, G.E; Madruga, L.T; Costa, C.J; Nogueira, V.S. (2017). Methodological adjustments to the tetrazolium test in rice seeds. *Journal of Seed Science* 39:41-49. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n1169643>
- Chamorro AH, Martínez SL, Fernández JC, Mosquera T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium* var. *Misty blue*. *Agronomía Colombiana*. 2007;25(1):47–53. 1
- Chen, W., Chen, H. (2007) *Orchid Biotechnology*. World Scientific. Editorial: World Scientific Pub Co Inc.

- Chen, Y., Goodale, U., Fan, X. & Gao, J. (2015). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecol Conserv*, 3, 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.01.002>
- Cites. (2003). *Decimotercera reunión del Comité de Flora*. Ginebra, Suiza. [en línea]. Citado el 12.10.2020 Disponible en internet <URL: <http://www.cites.org/esp/append/index.shtml> >
- Clavijo, A. I. G., Pico, D. F. C., & Rojas, L. C. G. (2016). *Establecimiento in vitro de protocormos de Prosthechea sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético*. *Revista Mutis*, 6(1), 6-15.
- Coello, C., Miceli, C., Orantes, C., Dendooven, L. & Gutiérrez, A. (2010). *Plant growth regulators optimization for in vitro cultivation of the orchid Guarianthe kinneri (Bateman) Dressier & W.E. Higgins*. *Gayana Bot*, 67(1), 19-26. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432010000100003>
- Collantes, B. Soto, C. Koechlin, J. (2007). *Orquídeas en Machu Picchu*. Inkaterra asociación
- Curtis, H., y Schnek, A. (2008). *Biología*. Ed. Medica Panamericana.
- Custódio, C., Marks, T., Pritchard, H., Hosomi, S. & Machado, N. (2016). *Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick carapace (Dactylorhiza fuchsii) or dark seed coat (Vanda curvifolia)*. *Seed Science and Technology*, 44(1), 177-188
- Damon, A., Aguilar, E., 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*, 10(2), 195-203.

- Das, D, Reddy M, Upadhyaya K y Sopory, SK (2002) *An efficient leaf-dise culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (Vitis vinifera L.)*. Plant Cell Rep. 20: 991-1005
- De Feria, M. (2000). *Empleo de biorreactores para la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de Coffea arabica L. cv. Catimor 9722*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Santa Clara
- De Klerk, G., Arnholdt B., Lieberei R. y Neumann K. (1997). *Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects*. Biologia Plantarum 39 (1): 53-66.
- De la Cruz, R. (2006). *Micropropagación y adaptación a condiciones ambientales de: Prosthechea vitellina (Lindl) W. E. Higgins (Orchidaceae)*. Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 21-32.
- Deb, C. y Pongener, A. (2011). *Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of Cymbidium aloifolium (L.) Sw.: a multipurpose orchid*. J. Plant Biochem. Biotechnol. 20(1):90 - 95.
- Díaz, J., Solano, F., Sánchez, L., Espinosa, F. (2004). *Riqueza y distribución de las orquideaceae en la provincia de Pamplona*. Bistua. 2(1): 106-112.
- Dohling, S., Kumaria, S. and Tandon, P. (2008). *Optimization of Nutrient Requirements for Asymbiotic Seed Germination of Dendrobium longicornu Lindl. And Dendrobium formosum Roxb*. Proceedings of Indian National Academy of Sciences , 74, 167-171.

- Dressler, R. (1990). *The orchids Natural History and Classification*. Cambridge, USA. Harvard University Press. 332p. Press. Portland, USA. 314p
- Dressler, R. L. (1981). *The Orchids: Natural history and classification*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Dulić, J., Ljubojević, M., Ognjanov, V., Barać, G., & Dulić, T. (2019). *In vitro germination and seedling development of two European orchid species, Himantoglossum jankae Somlyay, Kreutz & Óvári and Spiranthes spiralis (L.) Chevall.* In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(4), 380-391.
- Dutra, D., Johnson, T., Kauth P., Stewart, S., y Kane, M. (2008). *Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid Bletia purpurea.* *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 94: 11-21.
- El-Abagy, H. M. H., Rashad, E. S. M., Abdel-Mawgoud, A. M. R., & El-Greadly, N. H. (2010). *Physiological and biochemical effects of some bioregulators on growth, productivity and quality of artichoke (Cynara scolymus L.) plant.* *Res. J. Agric. Biol. Sci*, 6, 683-690.
- Escalant, J y Teissont C (1989) *Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species Musa acuminata and Musa balbisiana.* *Plant Cell Reports* 7: 665-668
- Escobar, A. O. Q. (2019). *Análisis de la expresión de los ARF y Aux/IAA durante la inducción de la embriogénesis somática en Coffea canephora* (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán).
- Escobar, R., & Múnera, J. M. (1990). *Native Colombian Orchids*. Editorial Colina, Compañía Litografica Nacional.

- Fast, G. (1980). *Propagation and cultivation*, In: *Orchid culture*. Botanical principles, cultural practices, plant descriptions, ed: Fast, G., Ulmer, Stuttgart, p. 207-23.
- Fehér, A., P. Taras y D. Dudits (2003). *Transition of somatic plant cells to an embryogenic state*. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* 74(3), 201-228.
- Ferl, R., Paul L. (2000). *Genome organization and expression*. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
- Ferreira, W. & Suzuki, R. (2008). *O cultivo in vitro de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção*. In: Loiola MIB, Baseia IG & Lichston JE (Org.) *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Natal, Imagem Gráfica, p.67-68.
- Florez, V., y Cruz, R. (1994). *Guía de laboratorio de fisiología vegetal*. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogota.
- Fonnegra, R., y Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. 2 ed. Editorial universidad de Antioquia de Colombia.
- Franco, M., Guevara, G., Mesa N y Ureña G. (2007). *Hardening of the national flower of Colombia, the threatened *Cattleya trianae* (Orchidaceae), from in vitro culture with previous invigoration phase*. *Rev. Biol. Trop.*,55 (2), 681-691.
- Gallo, F., Souza, L., Milaneze, M. & Almeida, O. (2016). *Seed structure and in vitro seedling development of certain *Laeliinae* species (Orchidaceae)*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(1), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.01.005>

- García, J., Alvarado, E., Bolaños, J. (2015). *Efecto del AIA y el AIB sobre el enraizamiento in vitro de brotes de Sechium edule(Jacq.) Sw.* Biotecnología Vegetal. 2015;15(1):3–7.
- Gnasekaran, P., Rathinam, X., Sinniah, U.R. and Subramaniam, S. (2010). *A Study on the Use of Organic Additives on the Protocorm Like Bodies (PLBs) Growth of Phalaenopsis violacea.* Orchid Journal of Phytology, 2, 29-33.
- Gonzales, A. (2005) *Esquema del Ciclo de vida del Paraíso cultivado in vitro.* Morfología de plantas vasculares. Facultad de ciencias agrarias. Argentina.
- Griga, M. (2000). *Morphological alterations in sterile mutant of Pisum sativum obtained via somatic embriogenesis.* Biologia Plantarum 43 (2): 161-165
- Haccius, B (1977) *Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures.* Phytomorphology 28: 74-81
- Hágsater, E.; M. A. Soto Arenas; G. A. Salazar Chávez; R. Jiménez Machorro; M. A. López Rosas; R. L. Dressler. (2005). *Las Orquídeas de México.* Instituto Chinoin, México, 304 pp.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación.*
- Hirano, T.; Yukawa, T.; Miyoshi, K.; y Mii, M. (2011). *In vitro germination and seedling development of cryopreserved Dendrobium hybrid mature sedes for seeds of some Cymbidium species.* Plant Biotechnol.28:99-102
- Hosomi S, Santos R, Custodio C, Seaton P, Marks T, y Machado N. (2011) *Preconditioning Cattleya seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability.* Seed Sci Technol 39:178–189

- Hosomi, S; Custódio, C; Seaton, T; Marks, T; y Machado N. (2012). *Improved assessment of viability and germination of Cattleya (Orchidaceae) seeds following storage*. In *Vitro Cell.Dev.Biol.Plant*, 48:127–136
- Hosomi, S; Bonome, T; Custódio, C; Barbosa, N. (2017). *Refining the tetrazolium test for evaluation of Cattleya labiata and C. tigrina seeds viability*. *Australian Journal of Crop Science* 11:1320-1326. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.17.11.10.pne606>.
- Hossain, M.M., Sharma, M. and Pathak, P. (2009) *Cost Effective Protocol for in Vitro Mass Propagation of Cymbidium aloifolium (L.) Sw. —A Medicinally Important Orchid*. *Engineering in Life Sciences*, 9, 444-453.<https://doi.org/10.1002/elsc.200900015>
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (2005). *Listas rojas preliminares de plantas fanerógamas y briófitos de Colombia*. Citado el 12.10.2020. Disponible en internet <URL: <http://www.humboldt.org.co/humboldt/mostrarpagina.php?codpage=30000113>>
- Jardinería E. (2002). *Manual para la germinación in vitro de las orquídeas*. (<http://www.grancanariaweb.com/edgar/orquidea/>).
- Jauregui, J. & Chavez, N. (2006). *Glosario de biotecnología*. (N. sirs) i9789707280496).
- Jiménez, V. (2001). *Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormone*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13: 196- 223.
- Johnson, T., Kane, M. (2007). *Asymbiotic germination of ornamental Vanda: in vitro germination and development of three hybrids*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 91:251–261.

- Johnson, T., Stewart, L., Dutra, D., Kane, M, Larry Richardson. (2007). *Asymbiotic and symbiotic seed germination of Eulophia alta (Orchidaceae) preliminary evidence for the symbiotic culture advantage*. Plant Cell Tiss Organ Cult.90:313 – 323.
- Jualang, A.G., Devina, D., Hartinie, M., Sharon, J.S. and Roslina, J. (2014). *Asymbiotic Seed Germination and Seedling Development of Vanda dearei*. Malaysian Applied Biology, 43, 25-33.
- Kaneko, Y. and Morohashi, Y. (2003). *The effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons*. Plant Science. 164(2): 287-292.
- Kauth, P., Kane, M. & Vendrame, W. (2011). *Comparative in vitro germination ecology of Calopogon tuberosus var. tuberosus (Orchidaceae) across its geographic range*. In Vitro Cell Dev Biol – Plant, 47(1), 148–156. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9316-5>
- Kendon JP, Rajaovelona L, Sandford H, Fang R, Bell J, Sarasan V. (2017). *Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: “in vitro collecting” as a case study*. Bot Stud. 58(1):34.
- Kim, D. H., Kang, K. W., Enkhtaivan, G., Jan, U., & Sivanesan, I. (2019). *Impact of activated charcoal, culture medium strength and thidiazuron on non-symbiotic in vitro seed germination of Pecteilis radiata (Thunb.) Raf.* South African Journal of Botany, 124, 144-150.
- Kitsaki, C., Zygouraki, S., Ziobora M., Chintziest S. (2004). *In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species (Orchidaceae)*. Plant Cell Rep 23:284–290.
- Knudson, L (1921). *La germinacion no simbiotica de las semillas de orquideas*. Bol. Real Soc. Española Hist. Nat 21:250 -260.

- Knudson, L. (1946). *A new nutrient solution for germination of orchid seed*. American orchid society bulletin.
- Lallana V, y Garcia L. (2013) *Pre-treatments effect in Trichocentrum jonesianum seeds viability test*. Invest Agrar 15:120–132
- Lallana, V., Billard, C., & Klug, L. (2010). *Germinación y desarrollo de plántulas in vitro de Oncidium bifolium Sims var. bifolium (Orchidaceae)*. In C. Gallardo y E. Gagliano (Comps.), Libro de resúmenes del V Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales (pp. 272-274).
- Lauzer, D.; Renaut, S.; Arnaud.; y Barabé, D. (2007). *In vitro asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of Aplectrum hyemale (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae)*. J. Torrey. Bot. Soc. 134(3):344-348.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotechnología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2004). *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II*. En S. Radice, Morfogénesis (págs. 26-27). ArgenBio.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P., & Sandberg, G. (2001). *Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth*. The plant journal, 28(4), 465-474.
- Lo, S.; Wade, S.; Kuo, C.; Chen c. y Tsay H. (2004). *Asymbiotic germination of immature seeds, Plantlet development and ex vitro establishment of plants of Dendrobium tosaense makino—a medicinally important orchid*. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 40:528-535
- Long, B., Niemiera, A.X., Cheng, Z.Y., Long, C.L., (2010). *In vitro propagation of four threatened Paphiopedilum species (Orchidaceae)*. Plant Cell Tissue Organ.Cult. 101, 151–162

- López-Puc, G. (2008). *Inducción y Caracterización de la embriogénesis somática in vitro del chile habanero (Capsicum chinese Jacq.)*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 96 pp.
- Malmgren, S. (2006). *where propagation and cultivation, sales, Cypripedium* (and subheadings) [Online] Cited 12.10.2020. Available at the Internet <URL: www.lidaforsgarden.com/orchids>
- Manrique, V., Maria, A., y Vargas, L. (2016). *Caracterización morfológica y de las secuencias ITS de aislamiento de hongos asociados a raíces de orquídeas en la región del Sumapaz*. (Doctoral dissertation).
- Márquez, P., Lajovic, L., Mota D., Lorryne Nunes, G., y Tadeu, S. (2013). *Testes de viabilidade de sementes de Cyrtopodium fowliei L.C. Menenzes (Orchidaceae)*. I Congreso Brasileiro de Produção de Orquídeas. Fortaleza, Brasil. 05 al 10 de marzo de 2013. Resumen expandido. p. 34-35. Edición CD-ROM
- Matilla, A. J. (2008). *Desarrollo y germinación de las semillas*. Fundamentos de fisiología vegetal, 2, 549.
- McKendrick, S. L., Leake, J. R., & Read, D. J. (2000). *Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal Salix repens and Betula pendula to the orchid Corallorhiza trifida through shared hyphal connections*. The New Phytologist, 145(3), 539-548.
- Mejía, H. y Pino, T. (2010). *Diversity of orchids epiphytes in a tropical rain forest (Bh-T) of department Chocó, Colombia*. Acta biol. Colomb.15(2):37 - 46.

- Mendez Olaya, J. A. (2016). *Evaluación del uso de adictivos naturales en el medio ambiente de cultivo para la germinación asimbiótica de cinco especies de orquídeas del área del Bajo Calima* (Chocó biogeográfico)
- Mendoza, I. (2016). *Eficiencia de los medios nutritivos basales: sólido y líquido en la etapa de establecimiento in vitro de la orquídea "Tripita" Trichopilia tortilis Lindl.* *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 5, 43-57.
- Merkle, S, Parrott W y Flinn B (1995) *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, TA (Ed) In vitro Embryogenesis in Plant.* pp. 155-203. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands
- Moore D. (1849). *On growing orchids from seeds.* *Garden Chron* 35:549.
- Mroginski, L. & Roca, W. (1991). *Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* (Eds. Roca, WM & Mroginski, LA). CIAT. Cali, Colombia, 19.
- Muñoz, M y Jimenez, V. (2008). *Capsule development in vitro germination and plantlet acclimatization in Phragmipedium humboldtii, P. longifolium and P. pearcei.* *Lankesteriana* 8(2): 23 -31.
- Murashige, T., Skoog. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.* *Physiol. Plant* 15, 437–497.
- Mweetwa, A. M., Welbaum, G. E., & Tay, D. (2008). *Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on in vitro germinability of Phalaenopsis seeds.* *Scientia Horticulturae*, 117(3), 257-262.

- Nagaraju, V., Mani, S. (2005). *Rapid In Vitro Propagation of Orchid Zygopetalum intermedium*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 14:27-32.
- Naghashzadeh, M., Rafiee, M., & Khorgamy, A. (2009). *Evaluation of effects of gibberellic acid on maize (Zea mays L.) in different planting dates*. Plant Ecophysiology, Vol.3, pp.159-162.
- Narváez, G. (2009). *Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas In vitro de rosa, variedad Akito (Rosa sp. Var Akito)*. Sangolquí.
- Orjuela Urrego, C. C., & Deaza Rodriguez, E. A. (2017). *Efecto del Uso de Dos Reguladores de Crecimiento (Ban-Ana) y Nutrientes Complejos en la Germinación in Vitro de la Orquídea Prosthechea sp* (Doctoral dissertation).
- Orquimundo. (2010) *Anatomía y Morfología Vegetativa y Floral de las Orquídeas I parte*.
- Ossenbach, C., Arce, J., Warner J (2007). *Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas*. Tierra Tropical 3, (1):47-59.
- Padilla, J. 2011. *Prueba de viabilidad con tetrazolio*. Consultado en marzo 12,2020. En <http://snics.sagarpa.gob.mx/Documents/pruebaviabilidad>.
- Pant, B. and Thapa, D. 2012. *In Vitro Mass Propagation of an Epiphytic Orchid, Dendrobium primulinum Lindl. through Shoot Tip Culture*. African Journal of Biotechnology, 11, 9970-9974. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3106>
- Parrott, W (1993) *Cell culture the Biotechnology applications for banana and plantain improvement*. En: *Proceeding of the workshop on byotecnology applications for banana and plantain improment*, pp. 183-191. Reunión INBAP. 1992 San Jose, Costa Rica

- Pedroza, J. (2009). *The effect of activated charcoal, indol acetic acid (IAA) and benzylaminopurine (BAP) on Epidendrum elongatum Jacq protocormlike body (PLB) development in in vitro conditions*. Rev. Colomb. Biotecnol. 6(1):17 - 32.
- Pedroza, J., Fernandez, C., Suarez A. (2005). *Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of comparettia falcata seeds under in vitro conditions*. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 41(6) 838- 843.
- Pereira, G., Albornoz, V., Romero, C., Lara, S., Sánchez, M. Ríos, D., & Atala, C. (2017). *Germinación asimbiótica en tres especies de Chloraea (Orchidaceae) de Chile*. Gayana. Botánica, 74(1), 131-139. DOI: 10.4067/S0717-66432017005000107.
- Pérez B. (2010). *Realización de protocolos de propagación in vitro de 3 especies vegetales priorizadas dentro del proyecto 318 (Citharexylum sulcatum, Disterigma alaternoides y Orthosantus sp.) y finalización de los protocolos de Rubus acanthophyllos y Gaultheria anastomosans*. 331120215318-Uso sostenible de los recursos vegetales del Distrito Capital y la Región.
- Pérez, B. (2005). *Germinación in vitro de Masdevallia ignea Rchb. f (Orchidaceae) a partir del cultivo de semillas provenientes de diferentes tipos de polinización*. Universidad francisco de Paula Santander. Facultad deficiencias agrarias y del ambiente. Plan de estudios de ingeniería de producción biotecnológica. San José de Cúcuta.
- Pérez, M. (1974). *Introducción a la enfermería/ Introduction to Nursing*. Editorial Limusa.
- Pérez, R., Luna y Barba (2001). *Cultivo simbiótico in vitro de Bletia macrithmochila greenman*. XV congreso mexicano de botánica. México.

- Pérez, Y., Suárez, S., Giraldo, V., Saraza, L., Chica, S., & Bermúdez, L. (2017). *Determinación de un método para el establecimiento in vitro de orquidias adaptado a condiciones de recursos de los estudiantes de la IE Rural de Marinilla*. Encuentro Sennova del Oriente Antioqueño, 67-81.
- Pérez-Molphe, E.M., R. Ramírez-Malagon, H. G. Núñez-Palenius y Ochoa, N. (1999). *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, 179 pp.
- Philip, J., Wagner A. (2006). *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2006) 85: 91–102
- Potisek, M., Sarmiento, M., & Puc, L. (1996). *Germinación de semillas y su establecimiento in vitro de Laelia rubescens Lindley y Epidendrum stamfordianum Batem*. Reporte Anual de Ciencia y Tecnología INIFAP. CIR-SURESTE Campeche, Camp., México pp, 187-192
- Pritchard, H.; Prendergast, F. (1990). *Viability testing in terrestrial orchid seed*. *Acta Universitatis Wratislaviensis*, 1055:11-16.
- Pyati, A. N. (2019). *In vitro* Seed Germination, Protocorm Formation and Plantlet Regeneration in *Aerides ringens* Fisher. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29(1), 49-62.
- Rahman, M.S., Hasan, M.F., Das, R., Hossain, M.S. and Rahman, M. (2009). *In Vitro Micropropagation of Orchid (Vanda tessellata L.) from Shoot Tip Explant*. *Journal of Biological Science* , 17, 139-144. <https://doi.org/10.3329/jbs.v17i0.7122>
- Ramírez, F. C. (1990). *Establecimiento de Cultivo In vitro de Orquídeas Mexicanas en Peligro de Extinción*. Tesis Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. México. D. F. p 64.

- Ramos TV & Carneiro IF (2007) *Multiplicação in vitro de Cattleya x mesquitae pelo método de estiolamento de segmentos caulinares*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37:10-15.
- Rännbäck, L. (2007). *Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on Cypripedium spp.* Dept. of Crop Science, SLU. Bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme. 2007:1.
- Rasmussen, H. (1995). *Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, New York.
- Raven, P., Evert, R., y Eichhorn, S. (1992). *Biología de las plantas (Vol. 2)*. Reverte.
- Reinert, J. (1958). *Untersuchungen uber die morphogenese in gewebeulturen*. Ver. Dtsch. Bot. Ges. 71: 15-24
- Ríos, R., Sánchez, G., Ramírez, O., Dávila, C., Villalobos, E., Santiago, A., ... & González, G. (2013). *Establecimiento de cultivos in vitro de plantas modelo, plantas medicinales de la sierra Juárez y orquídeas de valle nacional, Oaxaca*.
- Rivera H. (2009). *Orquídeas: generalidades y cultivo*. El Herbario del Missouri Botanical Garden (Oxapampa).
- Rivera R, (2002). *Guía ilustrada de 55 especies de Orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras, Honduras*.
- Rodríguez, E. Gamboa, M., Hernández, F., y García, J. (2005). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica: Costa Rica.
- Rodríguez, L., González, R., Alvarado, K., & Telles, E. (2007). *Germinación asimbiótica in vitro de semillas de orquídeas silvestres*. Biotecnología vegetal, 7(3).

- Rojas, C. (2015). *Etapas del cultivo de tejidos vegetales. Biotecnología vegetal*. Universidad del Tolima: Colombia.
- Rojas-Aréchiga, M., A. Orozco-Segovia y C. Vázquez- Yanes (1997). *Effect of light on germination of seven species of cacto from Zapotitlán Valley in Puebla, Mexico*. J. Arid Environments 36: 571-578.
- Rosales, S. (2006). *Conservación de especies vegetales mexicanas por cultivo de tejidos*. Mexico.
- Rueda Chacón, N. (2019). *Actualización de los conceptos asociados con la regeneración celular en plantas*.
- Ruiz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H., Azpíroz, R., & Moreno, M. (2008). *Germinación in vitro de semillas de Encyclia adenocaula (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae)*. Phytion (Buenos Aires), 77, 203-215.
- Salazar, S. & Gélvez, J. (2015). *Determining the viability of Orchid seed using the Tetrazolio and Carmín Índigo Tests*. Rev. Cienc, 19(2), 59-69.
- Salazar, S. (2012). *Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de Cattleya mendelii Dombroin (Orchidaceae)*. Acta Agronómica, 61(1), 69-78.
- Salazar, S. Maldonado, H. (2020). *Evaluation of the cytotoxic potential of sodium hypochlorite using meristematic root cells of Lens culinaris Med.* Sci Total Environ. 701: 134992. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134992>
- Salazar, S., & Cancino, G. (2012). *Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia*. Revista Colombiana de Biotecnología, 14(1), 53-59.

- Salazar, S., Amaya, A. & Barrientos, F. (2013). *Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de Phalaenopsis (Orchidaceae)*. Rev. Colomb. Biotecnol, 15(2), 97-105.
- Salazar, S., Maldonado, H. (2019). *Evaluation of cytotoxic potential of chlorpyrifos using Lens culinaris Med as efficient bioindicator*. Ecotoxicol Environ Saf. 183, 109528. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109528>
- Salazar, S., Quintero, J. y Moreno, L. (2020). *Mejora de la metodología del tetrazolio prueba usando diferentes pretratamientos en semillas del género Epidendrum (Orchidaceae)*. Journal of Seed Science, v.42, e202042013, 2020 <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v42231028>
- Salazar, S.; Botello, E. & Quintero, J. (2019). *Pre-treatments effect on the tetrazolium test on Epidendrum barbaricum Hágsater & Dodson seeds*. Acta Agronómica, 68(4).
- Salazar-Mercado, S. A., & Vega-Contreras, N. A. (2017). *Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of Cattleya trianae Linden & Reichb. f. (Orchidaceae)*. Acta Agronómica, 66(4), 544-548.
- Salgado, J., & Peñaranda, L. (2019). *Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción in-vitro de orquídeas*. Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales, 6(1), 16-28.
- Sánchez N., & Jiménez, V. (2010). *Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales*. Agronomía mesoamericana, 21(1), 193-205.
- Sánchez-Romero, C., Perán-Quesada, R., Márquez-Martín, B., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2003). *Efecto de la desecación parcial sobre la germinación de embriones*

zigóticos inmaduros de aguacate. In Proceedings V congreso mundial del aguacate (Vol. 1, pp. 83-87).

Sandoval, J. (1985). *Micropropagación de musáceas*. Revista de la Asociación Bananera nacional (ASBANA). Costa Rica. 9(24): 21-23.

Sannasgala, K (1989) *In vitro somatic embryogenesis in Musa*. PhD. Thesis. Leuven. Bélgica. Katholieke Universiteit Leuven

Sardi, L., & Guzmán, S. (2007). *Análisis de la variación de la tasa de germinación y crecimiento de las orquídeas Epidendrum secundum y Oncidium excavatum a través de medios de cultivo convencionales combinados con naturales* (Bachelor's thesis, Universidad del Azuay).

Sarmiento, A. (2002). *Criterios fundamentales de investigación*. Universidad Francisco de Paula Santander. Facultad de Educación, Artes y Humanidades. Departamento de Humanidades. San José de Cúcuta. Colombia.

Seaton, P., Ramsay, M. (2009). *Cultivo de orquídeas por semillas*. Royal Botanic Gardens, Kew

Seon, K., Kim, D. H., Kang, K. W., & Sivanesan, I. (2018). *Highly competent in vitro propagation of Thrixspermum japonicum (Miq.) Rchb. f., a rare epiphytic orchid*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 54(3), 302-308.

Soares, J. Rosa, Y, Tatará, M, Sorgato, J, y Lemes, C. (2014). *Viability identification of orchid seeds by the tetrazolium test*. Semina Ciênc Agrár 35:2275–2284

Solomon, E. P. (2011). *Biology 9th edition*. Brooks/Cole Cengage Learning. Versión en español: Solomon, EP, LR, Berg y DW Martin. 2008. Biología, la vida en la tierra.

Stanier, R., y Villanueva, J. (1996). *Microbiología*. Reverte.

- Stefanowicz-Hajduk, J., & Ochocka, J. R. (2020). *Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: usefulness and comparison with tetrazolium salt assays*. Toxicology Reports.
- Steward, F., Mapes, M. y Mears, K. (1958). *Growth and organized development of cultured cells*. American Journal of Botany. 45: 705-708
- Stewart, S y Kane, M. (2006). *Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria Macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid plant*. Cell. Tiss. Organ Cult. 86:147- 158.
- Street, H. (1977). *Cell (suspension) cultures techniques*. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.
- Street, H. y Withers, L. (1974). *The anatomy of embryogenesis in culture*. En Tissue Culture and Plant Science, pp. 179-187 Academic Press, London. New York
- Sulong, N.A.; Khalil, N.I.M.; Dahari, M.I.; Zakaria, A.A. (2016). *Effect of different sound genres on in vitro seed germination of *Grammatophyllum* hybrid and *Grammatophyllum Stapeliiflorum* orchids*. The Open Conference Proceedings Journal, v.7, p.94-103, 2016. https://www.researchgate.net/publication/302902599_Effect_of_Different_Sound_Genres_on_In_Vitro_Seed_Germination_of_Grammatophyllum_Hybrid_and_Grammatophyllum_Stapeliiflorum_Orchids
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal (Vol. 10)*. Universitat Jaume I, 1265.
- Takao, S., Bonome, T., Castillo, C. & Barbosa, N. (2017). *Refining the tetrazolium test for evaluation of *Cattleya labiata* and *C. tigrina* seeds viability*. Australian Journal of Crop Science, 11(10), 1320-1326. Doi: 10.21475/ajcs.17.11.10. pne606.

- Thompson, D., Trevor, J., Van, J. (2006). *Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing Disa (Orchidaceae) germinability in vitro: relationships, requirements and first-time reports*. Plant Growth Regulation. 49:269–284.
- Thorpe, E. (1995). *In vitro embriogénesis in plant*. Kiuwer Academia Publishers Netherlands.pp.543.
- Thorpe, T. A. y Yeung, E. C. (2011). *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol, 710*, DOI 10.1007/978-1-61737-988-20_20. Springer Science+Business Media, LLC.
- Tisserat, B., E.B. Essan y T. Murashige (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. Hortic. Rev. 1:1-78.
- Tombolato AFC & Costa AMM (1998) *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas, Instituto Agronômico. 72p. (Boletim técnico 174).
- Tukey, J. W. (1994). *The problem of multiple comparisons*. En: H. L. Braun (ed.). The collected works of John W. Tukey. Nueva York: Chapman and Hall. Vol. VIII, Chapter 1, p. 1 - 300.
- Utami, E., Hariyanto, S., & Manuhara, Y. (2017). *In vitro propagation of the endangered medicinal orchid, Dendrobium lasianthera J.J.Sm through mature seed culture*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(5), 406-410. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.011>
- Valdivia, C., Figueroa, C., & Flores, M. (2018). *Prueba de tetrazolio en semillas de espárrago (Asparagus officinalis L.)*. In Anales Científicos (Vol. 79, No. 2, pp. 386-392). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Vasudevan, R. y Staden, J. (2010). *In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of Ansellia africana Lindl.* Sci Hortic. 123:496 -504.

- Vendrame, W. A.; Carvalho, V. S.; y Dias J. M. 2007. *In vitro germination and seedling development of cryopreserved Dendrobium hybrid mature seeds*. Sci Hortic 114(3): 188-193.
- Vldivia, C. (2015). *Prueba de tetrazolio en semillas de espárrago (Asparagus officinalis L.)*. Vitrocultivo (2018). *Preparación de explante y establecimiento in vitro*. Recuperado de <https://doralaexplorador.jimdofree.com/inicio/fase-i-establecimiento/>
- Vogel, I., y Macedo, A. (2011). *Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of Cyrtopodium glutiniferum Raddi., a medicinal orchid*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 104: 147-155.
- Vudala, S. M., & Ribas, L. L. F. (2017). *Seed storage and asymbiotic germination of Hadrolaelia grandis (Orchidaceae)*. South African Journal of Botany, 108, 1-7.
- Vujanovic, V.; Arnaud, M.; Barabe, D.; y Thibeault, G. (2000). *Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination*. Ann. Bot. 86:79-86
- Wagner, A., Carvalho, V y Dias, M. (2007). *In vitro germination and seedling development of cryopreserved Dendrobium hybrid mature seeds*. Scientia horticultrae. 114, (3) 188-193.
- Wida, E., Hariyanto, S. & Wulan, Y. (2017). *In vitro propagation of the endangered medicinal orchid, Dendrobium lasianthera J.J.Sm through mature seed culture*. Asian Pac J Trop Biomed,7(5), 406-410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.011>
- Williams, E. y Maheswaran, M. (1986). *Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group*. Annals of Botany 57: 443-462
- Yam, W.; Nair, H.; Hew, S.; y Arditti, J. (2002). *Orchid seeds and their germination: An historical Account*. In: Kull T, Arditti J (eds.). Orchird biology: reviews and perspective. Kluwer Dordrech. Vol. 8:387- 507.

- Yamazaki, J., & Miyoshi, K. (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of botany*, 98(6), 1197-1206.
- Yong, J., Ge, L., Yan, F., Ngin, S. (2009). *The chemical composition and biological properties of coconut (Cocos nucifera L.) water*. *Molecules*. 14:5144-5164.
- Zeng, S., Wu, K.L., Teixeira da Silva, J., Zhang, J.X., Chen, Z.L., Xia, N.H., Duan, J., (2012). *Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of Paphiopedilum wardii Sumerh., an endangered terrestrial orchid*. *Sci. Hortic.* 138, 198–209.
- Zeng, S.J., Zhang, Y., Teixeira da Silva, J.A., Wu, K.L., Zhang, J., Duan, J., (2013). *Seed biology and in vitro seed germination of Cyrtopodium*. *Critical reviews in biotechnology*, 34(4), 358-371
- Zhang, Z., Yan, Y., Tian, Y., Li, J., He, J.S., y Tang, Z. (2015). *Distribution and conservation of orchid specie richness in China*. *Biological Conservation*, 181, 64-72.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2014.10.026>

Anexos

Anexo 1 *Formato de registro y seguimiento semanal de las fases de desarrollo fenológico en C. gaskelliana y C. warscewiczii*

FASES DE GERMINACIÓN	MEDIOS DE CULTIVOS	# DE REPETICIONES							
		I	II	III	IV	V	VI	TOT	PROM
F0	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F1	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F2	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F3	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F4	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								
	MS + GA ₃								
F5	MS								
	OSSM								
	MS + AC								
	MS + JP								
	MS+AIA								

Anexo 2 *Formato de observación de semillas viables de C. gaskelliana y C. warscewiczii.*

ESPECIE:					
TIEMPO DE EXPOSICION:					
CONCENTRACION:					
Viables	No Viables	Viables	No Viables	Viables	No Viables
SUBTOTAL		SUBTOTAL		SUBTOTAL	
TOTAL		TOTAL		TOTAL	