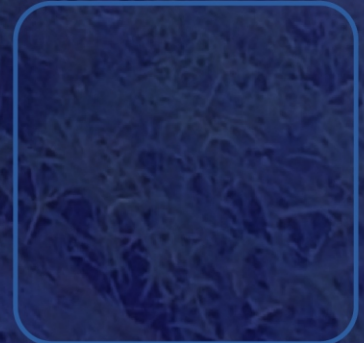




Metodologías de muestreo y procedimientos en laboratorio

para investigaciones en orquídeas presentes en la región del Sumapaz - Colombia



Banda Sánchez, L., Gil Clavijo, A. I., Moreno López, J. P., Ariza Castillo, C. A., Vanegas Martínez, L. E.

Metodologías de muestreo y procedimientos en laboratorio para investigaciones en orquídeas presentes en la región del Sumapaz – Colombia.

Fusagasugá: Editorial de la Universidad de Cundinamarca. 2020.

67 p.

ISBN: 978-958-52515-9-5



UDEC
UNIVERSIDAD DE
CUNDINAMARCA

ISBN: 978-958-52515-9-5
Primera Edición, 2020
Dirección de Investigación
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Programa de Ingeniería Agronómica
Universidad de Cundinamarca
<https://www.ucundinamarca.edu.co/>
investigación@ucundinamarca.edu.co
Dg 18 No. 20-29 Fusagasugá

COPYRIGHT © Universidad de Cundinamarca, 2020
Editorial de la Universidad de Cundinamarca
editorial@ucundinamarca.edu.co
Autores: Laguandio del Cristo Banda Sánchez.
Arlette Ivonne Gil Clavijo.
Jenny Paola Moreno López.
César Alfonso Ariza Castillo.
Luis Eduardo Vanegas Martínez.
Corrección de estilo: Yesid Castiblanco Barreto.
Diseño editorial: Fec Suministros y Servicios sas
Revisión editorial: Rosemberg del Carpio.

DERECHOS RESERVADOS:

Prohibida la reproducción total o parcial de este libro, sin permiso previo y por escrito de los titulares del copyright.

Los conceptos aquí expresados son responsabilidad exclusiva de sus autores y no necesariamente representan la posición oficial de la Universidad de Cundinamarca.

No comercial: no puede utilizar esta obra con fines comerciales de ningún tipo. Tampoco puede vender esta obra bajo ningún concepto ni publicar estos contenidos en sitios web que incluyan publicidad de cualquier tipo.

El presente libro ha sido fruto de la labor del grupo de investigación PROSAFIS (grupo de investigación en propagación, sanidad y fisiología vegetal).

En cuanto a la información consignada en el presente documento, fue revisada y evaluada por pares evaluadores externos doble ciego con el fin de garantizar una valoración crítica e imparcial sobre la calidad de los manuscritos; por lo cual los autores fueron informados sobre las recomendaciones dadas por los pares para realizar los respectivos cambios y/o ajustes del caso, para finalmente ser aprobados por el Comité Editorial de la Universidad de Cundinamarca.

El desarrollo y el resultado final representado en el presente libro fue posible gracias a:

Dr. Adriano Muñoz Barrera
Rector

Dra. María Eulalia Buenahora Ochoa
Vicerrectora Académica

Dr. José Zacarías Mayorga Sánchez
Director de Investigación Universitaria

Dra. Vilma Moreno Melo
Decana de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

**METODOLOGÍAS DE MUESTREO Y
PROCEDIMIENTOS EN
LABORATORIO PARA
INVESTIGACIONES EN ORQUÍDEAS
PRESENTES EN LA REGIÓN DEL
SUMAPAZ - COLOMBIA**

LOS AUTORES

Laguandio del Cristo Banda Sánchez. Ingeniero agrónomo, M. C. en Ciencias Agrarias-Fitoprotección Integrada. Docente investigador en el programa de Ingeniería Agronómica, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá (Colombia).

Arlette Ivonne Gil Clavijo. Ingeniera agrónoma, M. C. en Ciencias Agrarias-Fisiología de Cultivos. Docente investigadora en el programa de Ingeniería Agronómica, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá.

Jenny Paola Moreno López. Ingeniera agrónoma, M. C. en Ciencias Agrarias-Fitopatología. Docente investigadora en el programa de Ingeniería Agronómica, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá.

César Alfonso Ariza Castillo. Ingeniero agrónomo, M. C. en Ciencias Agrarias-Genética y Fitomejoramiento. Docente investigador en el programa de Ingeniería Agronómica, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá.

Luis Eduardo Vanegas Martínez. Ingeniero agrónomo, especialista en Biotecnología Agraria. Docente investigador en el programa de Ingeniería Agronómica, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN PROSAFIS

El grupo de investigación PROSAFIS (grupo de investigación en propagación, sanidad y fisiología vegetal) sustenta su creación a partir de las áreas de estudio de la ingeniería agronómica: propagación vegetal, sanidad vegetal (entomología, fitopatología, malherbología), fisiología vegetal, fitomejoramiento, sociología y extensión rural, ecología y recursos naturales y el desarrollo rural. Las necesidades de investigación se basan en la optimización de la producción agrícola, teniendo entre ellas la generación de información que permita superar limitantes, como los métodos de propagación de diversas especies alimenticias, ornamentales, de producción de fibra, entre otros grupos de plantas cultivadas. Adicionalmente, se tiene la necesidad de reconocer y proteger los recursos genéticos, de generar conocimiento sobre la diversidad de entomofauna asociada a las plantas cultivadas (benéfica o plagas) y los microorganismos que interactúan con ellas. A este conjunto se suma la fisiología vegetal, reconociendo los procesos fundamentales en las plantas relacionados con la anatomía, la ecofisiología y la nutrición vegetal, entre otros. Con ello se busca crear conocimientos dentro de la producción de alimentos, insumos, fibras u otros derivados de las plantas, según las necesidades o demandas, con un alto grado de manejo ecológico y sostenible para el beneficio de la sociedad.

PRÓLOGO

Las orquídeas colombianas representan aproximadamente el 25 % de las especies identificadas en el ámbito mundial, y son indicadores de la amplia diversidad de flora con que cuenta el país. En este contexto, el grupo de investigación PROSAFIS empezó a desarrollar estudios preliminares en orquídeas desde el año 2011, dada la importancia ecológica, cultural y económica de estas especies para el país, a partir de la preocupación general por su disminución paulatina debido a la expansión de la frontera agrícola, la extracción ilegal con fines comerciales y el daño a su hábitat natural, lo que las hace aparecer en el *Libro rojo de plantas de Colombia - Volumen 6: orquídeas*. Así mismo en 1977, el Instituto Nacional de los Recursos Naturales Renovables (Inderena), mediante la Resolución 213, estableció la protección especial de las orquídeas, entre otras especies, a través de la veda en todo el territorio nacional del aprovechamiento, transporte y comercialización. En el plano internacional las orquídeas silvestres se encuentran protegidas por la Convención sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES), aprobada por Colombia mediante la Ley 17 de 1981, y la Resolución 956 del 19 de mayo de 2010 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial que declaró en Colombia el 2010 como Año Nacional de las Orquídeas.

Esta primera publicación, original del grupo de investigación PROSAFIS, está ligada a los dos proyectos de investigación realizados entre 2013 y 2017: “Desarrollo de procedimientos de propagación *in vitro* de orquídeas nativas de la región del Sumapaz” y “Aspectos generales de la ecología y la adaptación de orquídeas en municipios de la región del Sumapaz”, aprobados en convocatorias internas de investigación de la Universidad de Cundinamarca, poniendo énfasis en la temáticas de bioprospección, aspectos ecológicos y propagación *in vitro*, con el fin de contribuir en la conservación y multiplicación de orquídeas nativas, por lo cual es necesario tener herramientas básicas de metodologías y protocolos de laboratorio, lo que constituye el objetivo de este manuscrito.

En el primer capítulo se describen métodos de campo para muestrear y monitorear las orquídeas para conocer *in situ* sus poblaciones, hábitats y especies en ecosistemas de la región del Sumapaz.

El segundo capítulo comprende los métodos para realizar toma de muestras de frutos y semillas de orquídeas a fin de establecer sistemas de propagación en condiciones controladas, como una alternativa de conservación para estas especies vulnerables.

El tercer capítulo describe los pasos para muestrear la entomofauna asociada a las orquídeas en condiciones de campo en diversos ecosistemas. Se estandarizaron metodologías de muestreo orientadas hacia áreas con presencia de orquídeas, en las cuales se realizaron evaluaciones directas en las plantas y en espacios con influencia de orquídeas.

En el cuarto capítulo se abordan procedimientos de laboratorio para el registro de hongos formadores de micorrizas y microorganismos endófitos.



El quinto capítulo consta de un mosaico fotográfico y la identificación de algunas orquídeas encontradas en la provincia del Sumapaz, específicamente en el cerro del Quininí y el parque San Rafael.

En el sexto y último capítulo se ofrece al lector algunas pautas generales para evaluar y conocer orquídeas nativas.

Los autores agradecen a la Universidad de Cundinamarca por el apoyo financiero dado para el desarrollo de estas investigaciones y se espera que los lectores de esta publicación convivan en un ámbito conservacionista con el fin de disminuir la posible extinción de estas especies de la flora regional.

INTRODUCCIÓN

La familia *Orchidaceae* es una de las más grandes entre las plantas superiores y su distribución es mundial: se estiman en 25 000 las especies descritas, repartidas en 750 géneros. En las zonas tropicales la mayoría de las orquídeas son epifitas y de flores muy vistosas. Sus flores son hermafroditas, trímeras (tres sépalos y tres pétalos) y poseen una columna central o ginostemo que sustenta las estructuras reproductivas masculinas (anteras y estambres) y femeninas (pistilo) que se encuentran fusionadas. La inflorescencia o agrupación de flores de las orquídeas puede ser terminal o axilar, en racimo o panícula, o también puede tener flores solitarias. En las flores, uno de los pétalos es más distintivo que los otros dos y se conoce con el nombre de labelo o labio, el cual se encuentra opuesto a los estambres y en posición inferior a la flor (Castellanos-Castro y Torres-Morales, 2018). La gran diversidad en color, forma, tamaño y olor tienen como fin atraer a los polinizadores que, en su mayoría, son insectos, con alta especificidad para determinadas especies (Mora-Osejo, 2004).

Para evaluar y muestrear las plantas de orquídeas hay que tener presente la clasificación taxonómica y, con ello, reconocer aspectos morfológicos que identifican a este grupo de plantas. La taxonomía de las orquídeas según el sistema Englerm, modificado según Fuller y Tippon (1951) en su *College Botany*, está dada así: Reino: *Plantae*. División: *Magnoliophyta*. Clase: *Liliopsida*. Orden: *Orchidales*. Familia: *Orchidaceae*.

En este escrito se exponen los elementos básicos de la metodología del muestreo de orquídeas y los organismos asociados a ellas en ecosistemas naturales, buscando contribuir con la generación de conocimiento en aspectos ecológicos y adaptativos de estas especies en Colombia.

Con los resultados de estos estudios, fruto de las investigaciones realizadas por el grupo PROSAFIS como parte de los proyectos “Aspectos generales de la ecología y la adaptación de orquídeas en municipios de la región del Sumapaz” y “Desarrollo de procedimientos de propagación *in vitro* de orquídeas nativas de la región del Sumapaz”, se pretende tener una idea global acerca de los métodos y procedimientos de campo y laboratorio para el muestreo y monitoreo de orquídeas, la entomofauna, los hongos relacionados y los microorganismos endófitos asociados a las orquídeas encontradas en la zona del Sumapaz (Cundinamarca). Con ello se busca que el lector tenga un acercamiento a dichas especies, con el fin de que analice y profundice en el área de su preferencia, teniendo en cuenta aspectos conservacionistas que permitan minimizar el daño infligido a esta familia botánica debido a su explotación y comercialización indiscriminada.

BIBLIOGRAFÍA

Castellanos-Castro, C. y Torres-Morales, G. (Eds.) (2018). *Guía para la identificación y el cultivo de algunas especies de orquídeas nativas de Cundinamarca*. Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.

Mora-Osejo, L. E. (2004). *Morfología, sistemática y evolución de las Angiospermae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.

CONTENIDO

1. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO Y MONITOREO EN PROCESOS DE RECONOCIMIENTO DE ORQUÍDEAS César Alfonso Ariza Castillo	10
1.1 Reconocimiento inicial	10
1.1.1 Manejo de los puntos de muestreo	11
1.1.2 Reconocimiento taxonómico de las orquídeas observadas	13
1.1.2.1. Exploración y reconocimiento detallado	13
• Senderos secundarios	13
• Parcelas fijas	14
• Transectos	16
1.1.3. Consideraciones especiales	17
1.2 Determinación del área mínima	18
1.3 Determinación de puntos especiales de muestreo	19
EPÍLOGO	19
BIBLIOGRAFÍA	20
AGRADECIMIENTOS	22
2. TOMA DE MUESTRAS DE FRUTOS Y SEMILLAS DE ORQUÍDEAS PARA PROCESOS DE GERMINACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS Laguandio del Cristo Banda Sánchez, Arlette Ivonne Gil Clavijo y Luis Eduardo Vanegas Martínez	23
2.1. Manejo de muestras para siembra de semillas de orquídeas en condiciones controladas	27
2.1.1. Obtención de semillas	27
2.1.2. Medio de cultivo y proceso de siembra in vitro	29
EPÍLOGO	30
BIBLIOGRAFÍA	31
AGRADECIMIENTOS	33
3. MUESTREO DE ENTOMOFAUNA ASOCIADA A LAS ORQUÍDEAS Laguandio del Cristo Banda Sánchez	34
3.1. Definición del objetivo del muestreo	34
3.2. Delimitación del ecosistema o ambiente	34
3.3. Localización de las orquídeas y método de muestreo	35
3.3.1. Método de muestreo	35
3.3.2. Unidad de muestreo	36
3.3.2.1. Plantas de orquídeas	36
3.4. Área de influencia de las orquídeas como unidad de muestreo	38
3.5. Número de muestras	39
3.6. Variables de evaluación	39
3.6.1. Variables asociadas a las orquídeas	39
3.6.2. Variables asociadas a la entomofauna	40

3.6.3. Índices de diversidad	41
3.6.4. Variables complementarias o covariables	41
3.7. Frecuencia de muestreo	42
3.7.1. Tiempo (momento) del muestreo	43
3.8. Procesamiento y conservación de muestras en laboratorio	43
3.9. Análisis de la información	43
EPÍLOGO	44
BIBLIOGRAFÍA	45
AGRADECIMIENTOS	47
4. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA LA BÚSQUEDA DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y MICROORGANISMOS ENDÓFITOS EN ORQUÍDEAS Jenny Paola Moreno López y César Alfonso Ariza Castillo	48
4.1. Pauta para la toma de muestras	48
4.2. Conteo de enrollamientos hifales en raíces de orquídeas	49
4.3. Cómo realizar el aislamiento de hongos micorrízicos a partir de explantes de raíz	50
4.4. Obtención de cultivos monomiceliares y cultivos monospóricos	51
4.4.1. Cultivos monomiceliares	51
4.4.2. Cultivos monospóricos	51
4.5. Extracción de DNA, PCR y secuenciación de las muestras	52
EPÍLOGO	52
BIBLIOGRAFÍA	54
AGRADECIMIENTOS	57
5. MOSAICO FOTOGRÁFICO: ORQUÍDEAS PRESENTES EN ECOSISTEMAS NATURALES DE LA PROVINCIA DEL SUMAPAZ César Alfonso Ariza Castillo, Laguandio del Cristo Banda Sánchez, Arlette Ivonne Gil Clavijo, Jenny Paola Moreno López y Luis Eduardo Vanegas Martínez	58
6. PAUTAS GENERALES PARA LA EVALUACIÓN Y EL CONOCIMIENTO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DE COLOMBIA Arlette Ivonne Gil Clavijo y Laguandio del Cristo Banda Sánchez	72

1. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO Y MONITOREO EN PROCESOS DE RECONOCIMIENTO DE ORQUÍDEAS

César Alfonso Ariza Castillo

En los procesos de inventariado y reconocimiento de orquídeas en una localidad o región en particular se deben establecer procedimientos de monitoreo y muestreo, ya que estos permiten organizar de forma adecuada la toma de datos y sirven de guía ante las posibles eventualidades del trabajo de campo. Dichos procesos deben tener en cuenta que la determinación taxonómica de orquídeas solo es posible si se tiene acceso a las flores de estas plantas. Por lo tanto, el monitoreo debe realizarse durante extensos periodos con el fin de incluir en ellos las épocas de floración de las diferentes especies de orquídeas, que en general no son simultáneas.

Además, el proceso de caracterización de orquídeas silvestres en Colombia debe contar inicialmente con el Permiso de Recolección de Especímenes de la Diversidad Biológica con fines de investigación científica no comercial (Decreto 1376 de 2013) o con el Permiso de Recolección de Especímenes de la Diversidad Biológica para la elaboración de estudios ambientales (Decreto 3016 de 2013), según sea el caso. Estos permisos se solicitan ante las corporaciones autónomas regionales cuando las actividades del estudio se realizan dentro de sus respectivas jurisdicciones, ante la Agencia Nacional de Licencias Ambientales cuando las actividades de reconocimiento se hacen en la circunscripción de dos o más autoridades ambientales y ante el Sistema Nacional de Parques Naturales de Colombia cuando el reconocimiento se lleve a cabo dentro de los parques naturales nacionales (Decreto 1376 de 2013 y Decreto 3016 de 2013). Esto concede la facultad de recolectar muestras de plantas en lo posible florecidas que permiten la determinación taxonómica.

1.1 Reconocimiento inicial

Los procesos de inventariado y reconocimiento de orquídeas comienzan con la observación inicial de los ecosistemas en los cuales se encuentran presentes. Esta primera observación de la localidad de estudio se realiza por medio de recorridos por los caminos o senderos principales del lugar de estudio. Cada una de las rutas de reconocimiento inicial hechas deben ser georreferenciadas y, en general, cada 50 o 100 m se referencia un punto de muestreo (figura 1). Estos recorridos iniciales permiten establecer los distintos tipos de ecosistemas y coberturas vegetales presentes en la localidad de estudio y sus límites (Ideam, Igac y Cormagdalena, 2007; Ideam, 2010).

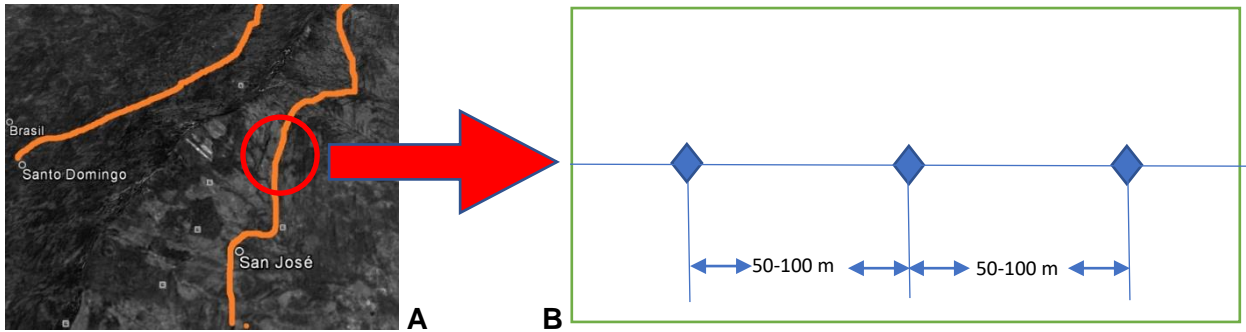


Figura 1. A. Caminos o senderos principales de una fracción del Distrito de Manejo Integrado de Peñas Blancas correspondiente a los municipios de Sylvania, Viotá y Tibacuy (Cundinamarca, Colombia). B. Descripción gráfica de la separación entre puntos de muestreo y reconocimiento.

1.1.1 Manejo de los puntos de muestreo

Cada uno de los puntos de muestreo es georreferenciado e identificado con un código. Sobre una zona entre 10 y 20 m a la redonda del punto de muestreo (figura 2), se realiza un proceso de observación de orquídeas. En esta actividad se hace un conteo de las orquídeas encontradas, predeterminándolas inicialmente por morfotipos de acuerdo con características visuales pudiendo llegar a niveles taxonómicos tales como subfamilia, tribu, género o especie según las guías de identificación de orquídeas como: *Native Colombian orchids* (Escobar *et al.*, 1990), *A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America* (Gentry, 1996), *Orchids and ecology in Colombia* (Ospina, 1996), *Illustrated dictionary of orchid genera* (Alrich *et al.*, 2008), *Orquídeas de la serranía del Baudó, Chocó, Colombia* (Misas, 2005), *Guía ilustrada de las orquídeas del valle geográfico del río Cauca y el piedemonte andino* (Reina-Rodríguez y Otero, 2011) y *Orchids of America tropical: an introduction and guide* (Meisel, Kaufmann y Pupulin, 2014) y *Orquídeas, tesoro de Colombia*, tomos I, II y III (Ortiz y Uribe, 2014, 2017), entre otras. Estos conteos permiten establecer la frecuencia y abundancia de cada una de las especies o morfoespecies de orquídeas encontradas.

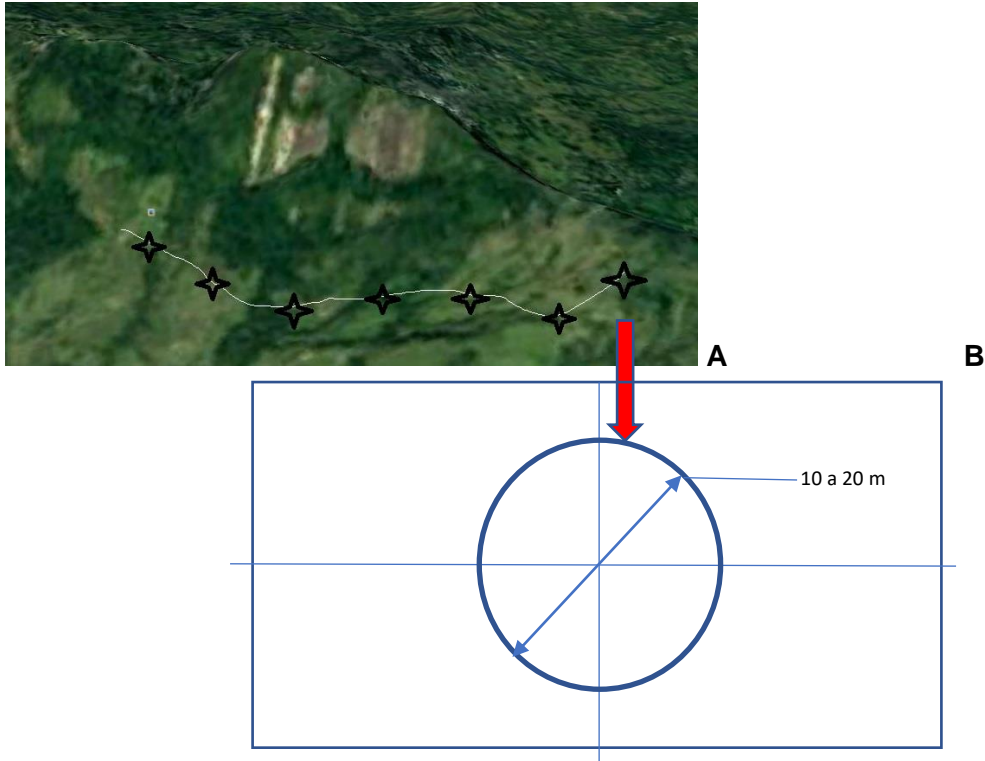


Figura 2. A. Puntos de muestreo y reconocimiento de orquídeas sobre un sendero en el Distrito de Manejo Integrado de Peñas Blancas. B. Descripción del área de muestreo y reconocimiento en los puntos de muestreo y reconocimiento.

Cada especie o morfoespecie de orquídea encontrado es fotografiado para evidenciar las características de sus flores, bulbos, tallos, hojas y su forma de crecimiento. Posteriormente es descrito en una libreta de apuntes y se destacan sus particularidades principales, siguiendo estas recomendaciones:

1. Anotar los datos de localización de la planta observada, como lo son: localidad (municipio, vereda y sector), longitud, latitud y altura, con la ayuda de un sistema de posicionamiento global (GPS).
2. Apuntar el número, la fecha de observación y los nombres de los investigadores que realizan el proceso de reconocimiento de orquídeas. Los números de observación deben ser consignados de forma consecutiva, usualmente empleando las iniciales del investigador principal o iniciales del proyecto, por ejemplo: AC1, AC2, AC3, etc.
3. Después se procede en cada observación a realizar la descripción del lugar donde se encuentra(n) la(s) orquídea(s) observada(s), escribiendo las características relevantes, primero desde lo más general hasta lo particular y específico.
4. La forma de acceso a las orquídeas (fácil o difícil) también debe ser registrado en una libreta de campo.
5. Luego se describe de forma detallada la planta observada y se procede a recolectar el individuo para su determinación taxonómica, siguiendo las recomendaciones de

Cascante (2008) y la *Guía para la recolección y preservación de muestras botánicas en campo* (Herbario Universidad Distrital, s. f.).

1.1.2 Reconocimiento taxonómico de las orquídeas observadas

Como se ha mencionado en el punto anterior, todo tipo de orquídea encontrado es fotografiado y descrito detalladamente en una libreta de apuntes. Además, si la planta se encuentra en floración se toma una fracción o el total de la inflorescencia de esta (sincado). Lo más conveniente para el secado de flores sin pérdida de segmentos es utilizar papel periódico, envolviéndolas en segmentos de papel mantequilla dentro de los periódicos. Las fotografías que describen la planta serán de gran utilidad en la posterior clasificación botánica, basada en la explicación de los sincados.

1.1.2.1. Exploración y reconocimiento detallado

Luego del reconocimiento inicial se debe explorar de forma detallada el territorio en estudio, lo cual puede hacerse de tres formas distintas:

- **Senderos secundarios**

Por medio de senderos secundarios que parten de los recorridos de reconocimiento inicial, cada 250 m o más, dependiendo del tamaño de la localidad de estudio, tanto a la derecha como a la izquierda. Al igual que en los senderos principales, cada 50 o 100 m se realizan puntos de muestreo. Es importante indicar que, si se observan nuevas morfoespecies de orquídeas entre puntos de muestreo, estas se georreferencian y se tratan igual a las encontradas en los puntos de muestreo (figura 3).



Figura 3. Senderos secundarios para muestreo y reconocimiento de orquídeas en el Distrito de Manejo Integrado de Peñas Blancas, correspondiente a los municipios de Silvania, Viotá y Tibacuy (Cundinamarca). Las líneas anaranjadas corresponden a los senderos principales y las líneas verdes a los senderos secundarios.

- **Parcelas fijas**

Las parcelas en las cuales se realizará un monitoreo de orquídeas deben preferiblemente tener un tamaño igual al área mínima cualitativa o estructural de mayor tamaño, observada en los ecosistemas presentes en la localidad de estudio.

Cada una de las formaciones ecológicas que conforman el área de estudio puede ser evaluada de forma independiente o todas en conjunto por medio de un diseño de muestreo estratificado dependiendo de los objetivos del estudio.

El número de parcelas fijas por muestrear puede ser determinado por el uso conjunto de las ecuaciones I y II, o a través de la ecuación III, basados en la abundancia de la familia *Orchidaceae* en un premuestreo. En el caso de realizar muestreo estratificado, el número de parcelas por formación ecológica o cobertura vegetal es establecido de forma ponderada de acuerdo con el tamaño de cada unidad ecológica.

$$n_o = \frac{(\sigma^2 * (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2)}{\varepsilon^2} \quad \text{Ecuación I (Díaz, 2009)}$$

$$n = \frac{n_o}{(1 + n_o/N)} \quad \text{Ecuación II (factor de corrección de poblaciones finitas)}$$

$$n = \frac{t_v^2 * CV^2}{\varepsilon^2 + \frac{t_v^2 * CV^2}{N}} \quad \text{Ecuación III (Mostacedo y Fredericksen, 2000)}$$

En las cuales:

n_o Tamaño de muestra no corregido o tamaño de muestra para poblaciones infinitas.

n Tamaño de muestra corregido.

σ^2 Varianza de la abundancia de orquídeas en el premuestreo.

$Z_{\alpha/2}$ Valor de la distribución normal estándar para el percentil 97.5.

Z_{β} Valor de la distribución normal estándar para el percentil 80 o 90.

ε^2 Error máximo admisible.

N Número total de parcelas de un área establecida en la localidad de estudio.

t Valor de la distribución t-Student para el percentil 97.5 con v grados de libertad.

- v Número de muestras realizadas en el premuestreo.
- CV Coeficiente de variación en el premuestreo.

En algunas ocasiones no es posible evaluar el número de parcelas establecido por las fórmulas de tamaño de muestra, debido a los costos del muestreo y monitoreo. En estos casos es conveniente determinar un mínimo de parcelas fijas por unidad ecológica o cobertura vegetal, o un número específico de parcelas para un área determinada, en concordancia con la experiencia de los investigadores y el conocimiento previo de las zonas de estudio (Mostacedo y Fredericksen, 2000).

Las parcelas de muestreo y monitoreo de orquídeas son escogidas de forma aleatoria o aleatoria sistemática, sobre una cuadrícula de área mínima del mapa de la región de estudio. En algunas ocasiones se prefiere realizar un muestreo estadístico no probabilístico preferencial o de opinión (Vargas, 2019), en el cual las áreas o parcelas de estudio son seleccionadas de forma deliberada, crítica o por juicio (Cristancho y Melo, 2005; Javes-Sánchez, 2011) de acuerdo con el conocimiento previo de los investigadores de la zona de estudio de la presencia y abundancia de orquídeas (figura 4).

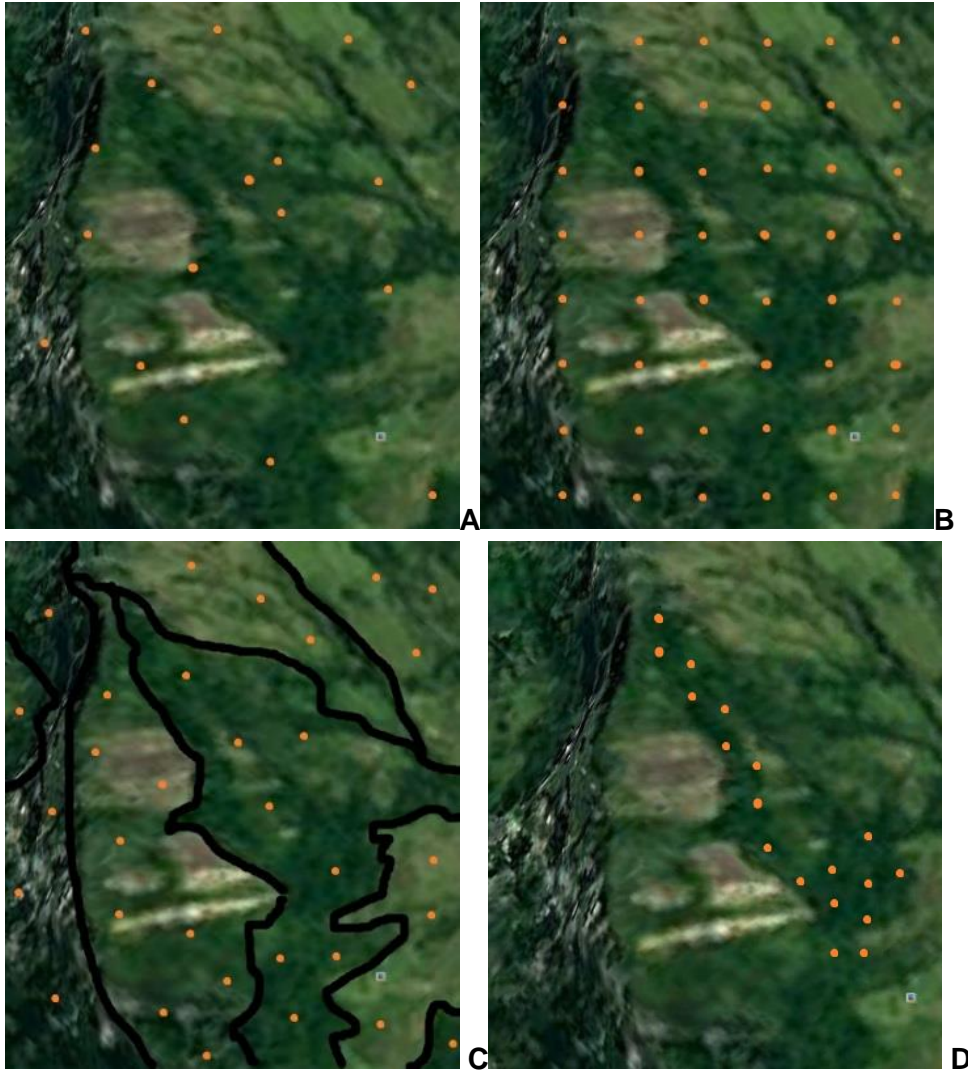


Figura 4. A. Ilustración de un muestreo al azar (superior izquierda). B. Sistemático (superior derecha). C. Estratificado (inferior izquierda). D. Preferencial (inferior derecha), para el muestreo y reconocimiento de orquídeas en el Distrito Manejo Integrado de Peñas Blancas, correspondiente a los municipios de Silvania, Viotá y Tibacuy (Cundinamarca). Los puntos anaranjados corresponden a los sitios de muestreo.

Cada una de las parcelas utilizadas en el estudio es georreferenciada y delimitada. Posterior a esto, en cada una de las parcelas se procede a cuantificar e identificar a las orquídeas en su interior.

- **Transectos**

La observación y el reconocimiento de orquídeas se puede realizar por medio del censo de rectángulos de un ancho y largo fijos conocidos como transectos (Mostacedo y Fredericksen, 2000), alrededor o sobre los senderos principales o secundarios (figura 5). El tamaño de los transectos debe ser igual en todo el estudio y se recomienda utilizar tamaños que permitan reconocer fácilmente las comunidades vegetales en las cuales se presentan

orquídeas, utilizando preferentemente tamaños iguales o superiores a los conseguidos con rectángulos de 12.5 x 5.0 m (Mostacedo y Fredericksen, 2000). Al igual que en el uso de parcelas fijas, los transectos deben ser delimitados y georreferenciados. Dentro de cada uno de los transectos se cuantifican e identifican las orquídeas presentes en ellos. El número de transectos por muestrear se determina de forma similar al método de parcelas fijas.

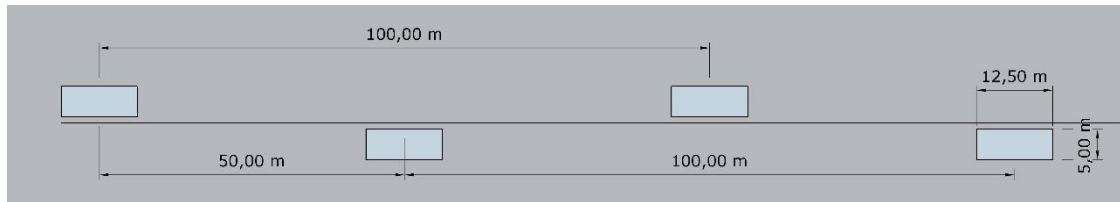


Figura 5. Esquema de ubicación de los transectos de observación sobre un sendero principal o secundario.

1.1.3. Consideraciones especiales

Por otra parte, es importante resaltar que en estudios de reconocimiento de orquídeas, la observación de estas debe realizarse a través de varias visitas en diferentes épocas del año, a cada uno de los puntos georreferenciados en los senderos, transectos o parcelas fijas, con el fin de observar los diferentes estados fenológicos, en particular la floración, debido a que las inflorescencias y flores son el principal elemento de identificación o determinación taxonómica de la familia *Orchidaceae*.

En la medida de lo posible, se recomienda realizar un monitoreo semanal o quincenal, mínimo durante un año, sobre un mismo recorrido o parcela determinada. Lo anterior permite hallar en varios estados la floración y fructificación de la mayoría de las morfoespecies de orquídeas encontradas en el recorrido o la parcela, y establecer las fases fenológicas de las especies de orquídeas presentes en el lugar de estudio y su relación con las condiciones climáticas.

En algunas ocasiones es indispensable establecer una descripción detallada de algunas plantas, apoyada por fotografías. Sin embargo, el acceso a ellas, en algunos casos, es complicado ya que las orquídeas se encuentran en lo alto del dosel, en afloramientos rocosos, pendientes pronunciadas y otras áreas peligrosas para acceder a las muestras. En estas circunstancias se debe planear una nueva visita al punto con equipos de escalada y trabajo en altura, con el fin de acceder a estas áreas, inseguras y complejas, con seguridad por parte del equipo de trabajo.

1.2 Determinación del área mínima

El área mínima se define como el espacio de menor tamaño en el cual se encuentra la mayor parte de especies vegetales que conforman la estructura florística de un ecosistema determinado (Mostacedo y Fredericksen, 2000; Alcaraz, 2013). Esta se establece por medio de la construcción de la curva área-número de especies, la cual se realiza de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Se delimita una parcela de un área inferior al área mínima, es decir área que alberga una diversidad de especies inferior, a la que puede encontrarse en una comunidad biológica, generalmente un cuadrado de 2 x 2 m.
- Luego se procede a determinar el número de especies vegetales que se encuentra en la parcela.
- Posterior a este conteo, se duplica el área de muestreo y se establece de nuevo el número de especies vegetales que está en la nueva parcela.
- Se repite el paso anterior hasta que el número de especies vegetales entre parcelas de tamaños contiguos sea similar o el aumento del número de especies en las parcelas sea muy pequeño, con respecto a los incrementos iniciales.
- Después se construye un gráfico de área versus número de especies, y se determina sobre este el punto de inflexión de la curva (figura 6). A partir de este punto se traza una línea perpendicular al eje de abscisas. El valor de corte entre la línea perpendicular trazada y el eje de las abscisas es el área mínima.

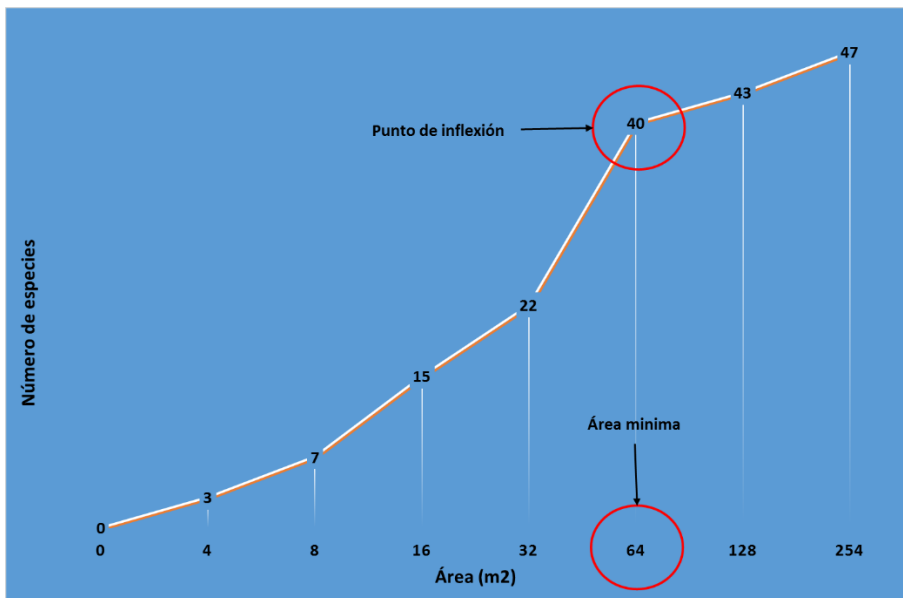


Figura 6. Ilustración de la determinación del área mínima cualitativa por medio de una gráfica área versus número de especies.

1.3 Determinación de puntos especiales de muestreo

En una localidad de estudio siempre se van a presentar algunos puntos que destacan ya sea por la abundancia de orquídeas o por la diversidad de estas con respecto a las zonas aledañas. Estos puntos son de especial interés porque revelan condiciones especiales que favorecen el desarrollo de las orquídeas y se determinan por la comparación de la abundancia y el número de diferentes morfoespecies tipos aparentes de orquídeas entre los distintos puntos muestreados. Aquellos puntos que presenten una mayor concentración de orquídeas y un mayor número de distintas morfoespecies de orquídeas con respecto a los demás, serán considerados puntos especiales de muestreo y, por lo tanto, deben ser monitoreados varias veces en el año y con una mayor intensidad con el fin de establecer claramente cuántas morfoespecies de orquídeas componen estas concentraciones de orquídeas y qué hábitats o nichos ocupan estas especies.

EPÍLOGO

Al recorrer las zonas rurales y los relictos boscosos de los Andes septentrionales en busca de estos tesoros naturales conocidos como orquídeas, es bastante difícil comprobar que la diversidad y abundancia que se espera encontrar no es tal, y en muchas ocasiones está muy por debajo de las expectativas, debido a la depredación humana y a la pérdida de su hábitat. Aun así, todavía es posible deleitarse con la visión misteriosa de sus flores, su fortaleza y su capacidad de adaptación. Ir a investigar estas plantas ha mostrado que todavía se pueden encontrar en medio de nuestras zonas rurales, en los relictos boscosos, en los jardines y solares, pero también demuestra su fragilidad ante la ambición humana por la belleza, el misterio y el dinero, pero, sobre todo, la incapacidad para protegerlas debido al inmenso desconocimiento sobre ellas. En este documento se presentan algunas de las metodologías utilizadas y adaptadas para construir conocimiento sobre el estado de las comunidades y poblaciones de orquídeas en la región del Sumapaz. Es nuestra obligación generar conocimiento sobre su ecología y ecofisiología, su estado, sus comunidades y poblaciones, así como las estrategias para su conservación y aprovechamiento sustentable.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcaraz, F. (2013). *El método fitosociológico*. Universidad de Murcia, España. Recuperado de www.um.es/docencia/geobotanica/ficheros/tema11.pdf
- Alrich, P., Higgins, W., Hansen, B. Dressler, R., Sheehan, T. y Atwood, J. (2008). *The Marie Selby Botanical Gardens, illustrated dictionary of orchid genera*. Ithaca, Nueva York: Comstock Publishing Associates.
- Cascante, A. (2008). *Guía para la recolecta y preparación de muestras botánicas*. Herbario Nacional (CR), Museo Nacional de Costa Rica. San José. Recuperado de <http://www.museocostarica.go.cr/herbario/pdf/Guia-para-recolectar.pdf>
- Cristancho, C. y Melo, O. (2005). Optimización de sistemas de respuesta dual. Una aproximación compromiso. *Revista Colombiana de Estadística*, 28(2), 155-171, diciembre. Recuperado de www.scielo.org.co/pdf/rce/v28n2/v28n2a04.pdf
- Díaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos: la estadística en la experimentación*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Escobar, R. y Múnera, J. M. (1991). *Native Colombian orchids*. Vols. 1-3. Bogotá: Compañía Litográfica Nacional.
- Fuller, H. y Tippon, O. (1951). *College Botany*. Nueva York: Henry Holt and Company.
- Gentry, A. (1996). *A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Perú) with supplementary notes on Herbaceous Taxa*. Chicago: University of Chicago Press.
- Herbario Universidad Distrital Francisco José de Caldas. (s. f.). *Guía para la recolección y preservación de muestras botánicas en campo*. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Recuperado de <https://bit.ly/2Hh0cHQ>
- Ideam. (2010). *Leyenda nacional de coberturas de la tierra. Metodología CORINE Land Cover adaptada para Colombia escala 1:100.000*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Bogotá. Recuperado de http://siatac.co/c/document_library/get_file?uuid=a64629ad-2dbe-4e1e-a561-fc16b8037522&groupId=762
- Ideam, Igac y Cormagdalena. (2007). *Mapa de cobertura de la tierra de la cuenca Magdalena-Cauca, metodología CORINE Land Cover adaptada para Colombia, escala 1:100.000*. Bogotá. Recuperado de <http://www.ideam.gov.co/web/ecosistemas/metodologia-corine-land-cover>
- Javes-Sánchez, A. (2011). *Taller de investigación administrativa. Metodología*. Universidad Nacional "San Agustín", Arequipa, Perú. Recuperado de <https://es.slideshare.net/ajavess/sesion-3-metodologa-de-la-investigacion>

- Meisel, J., Kaufmann, R. y Pupulin, F. (2014). *Orchids of tropical America: an introduction and guide*. Ithaca, Nueva York: Cornell University Press.
- Misas, G. (2005). *Orquídeas de la serranía del Baudó, Chocó (Colombia)*. Bogotá: ConCreto.
- Mora-Osejo, L. E. (2004). *Morfología, sistemática y evolución de las Angiospermae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.
- Mostacedo, B. y Fredericksen, T. (2000). *Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal*. Santa Cruz de la Sierra: Proyecto de Manejo Forestal Sostenible (BOLFOR).
- Ortiz, P. y Uribe, C. (2014). *Orquídeas, tesoro de Colombia*, Tomo I (A-D). Bogotá: Da Vinci Publicidad y Medios & Cía. S. En. C, 1-397.
- Ortiz, P. y Uribe, C. (2017). *Orquídeas, tesoro de Colombia*, Tomo II (E-Ha). Bogotá: Da Vinci Publicidad y Medios & Cía. S. En. C, 1-402.
- Ospina, M. (1996). *Orchids and ecology in Colombia: to the rescue of paradise*. Bogotá: Panamericana Formas e Impresos.
- Reina-Rodríguez, G. A. y Otero, J. T. (2011). *Guía ilustrada de las orquídeas del valle geográfico del río Cauca y piedemonte andino bajo*. Cali: Asociación Vallecaucana de Orquideología, Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- República de Colombia - Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2013). *Decreto 1376 de 2013 por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial*. Recuperado de <https://bit.ly/2NrgUYV>
- República de Colombia - Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2013). *Decreto 3016 de 2013 por el cual se reglamenta el Permiso de Estudio para la recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de Elaboración de Estudios Ambientales*. Recuperado de <https://bit.ly/2Zfa8aI>
- Vargas, L. D. (2019). *Reconocimiento de orquídeas y su diversidad en la reserva natural Cuchilla de Peñas Blancas en Tibacuy, Cundinamarca*. Tesis de grado, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá, Facultad de Ciencias Agropecuarias.



AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación PROSAFIS y a los estudiantes Yury Andrea Díaz, Joan Sebastián Beltrán, Juan Camilo Franco y Luis Daniel Vargas por su constante inquietud en el desarrollo de sus trabajos, que fueron la inspiración para el desarrollo de este escrito.

2. TOMA DE MUESTRAS DE FRUTOS Y SEMILLAS DE ORQUÍDEAS PARA PROCESOS DE GERMINACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS

Laguandio del Cristo Banda Sánchez, Arlette Ivonne Gil Clavijo y Luis Eduardo Vanegas Martínez

La continua pérdida de hábitat de las orquídeas nativas en Colombia y las limitaciones de la germinación en estado silvestre han dado lugar a una mayor preocupación por la conservación de las orquídeas. Por consiguiente, el cultivo *in vitro* es una herramienta alternativa para la conservación de especies en peligro de extinción (Salazar y Cancino, 2012). Como parte de las medidas propuestas para la conservación de orquídeas están los programas de propagación artificial. En condiciones naturales, las semillas dependen obligatoriamente del establecimiento de una simbiosis con un hongo específico para que pueda ser llevado a cabo el proceso de germinación (Izco *et al.*, 2004).

Otero y Bayman (2009) han determinado que las técnicas de germinación simbiótica utilizando hongos micorrízicos de orquídeas son una alternativa para la germinación de semillas de estas plantas epifitas tropicales, y que en comparación con la utilización de métodos asimbióticos, el uso de simbioses naturales puede ser más eficiente si se cuenta con los hongos apropiados para la germinación.

Los métodos de cultivo *in vitro* se presentan como una alternativa para suplir las condiciones necesarias para el desarrollo de las semillas, ya sea facilitando la simbiosis, o en medios asimbióticos en los cuales se reemplaza el papel del hongo simbiote. Mediante diversas técnicas y medios de cultivo se logra estimular el proceso germinativo y también acortar el tiempo de desarrollo de las plántulas; en estas condiciones, se deben crear protocolos de propagación *in vitro* con la expectativa de ser aplicados en programas de multiplicación masiva de especies en peligro de extinción y contribuir sustancialmente también a proyectos de conservación y luego a planes de reintroducción al medio natural (Rodríguez *et al.*, 2009). Por lo tanto, la tecnología de cultivos de tejidos vegetales ofrece una alternativa adecuada para facilitar los trabajos de multiplicación a gran escala y suplir los requerimientos necesarios para los planes de conservación (Gil, Contreras y Gutiérrez, 2016).

El estado de madurez del fruto (cápsula) de las orquídeas es variable, dependiendo de la especie, y se ha evaluado de acuerdo con los parámetros de referencia anotados por Ruiz *et al.* (2008) y Arditti (2008). La madurez se determina según el color de esta, de la siguiente manera: cápsula C1 (color verde); cápsula C2 (color verde-amarillento); cápsula C3 (color amarillo, sin dehiscencia) y cápsula C4 (color café con inicio de dehiscencia).

Las semillas de las orquídeas son diminutas, extremadamente livianas y producidas en gran número, que puede variar de 20 hasta 4 000 000. Aguilar-Morales, Laguna-Cerda, Vences-Contreras y Lee-Espinosa (2016) registraron en *Encyclia adenocaula* (La Llave &

Lex.) Schltr, 63 500 semillas por gramo, con un peso aproximado de $1.6 \pm 0.08 \mu\text{g}$, y Banda, Pinzón y Vanegas (2017) en semillas de *Prosthechea* procedentes de la región del Sumapaz determinaron que el peso de 15 000 semillas fue de $5.5 \times 10^{-3} \text{ g}$ y el número de semillas fue de 3 334 091 por cápsula.

Barthlott, Große-Veldmann y Korotkova (2014) describen que la semilla tiene una estructura muy simple que consiste en un embrión reducido a unas pocas células, rodeado de una cubierta seminal o testa usualmente transparente con unas pocas células uniformes, y carente de endospermo (figura 7). Sus reservas alimenticias y energéticas son limitadas, consisten en inclusiones celulares de gotas de aceite y granos de almidón en niveles muy escasos (Calderón, 2006; Arditti y Abdul, 2000).


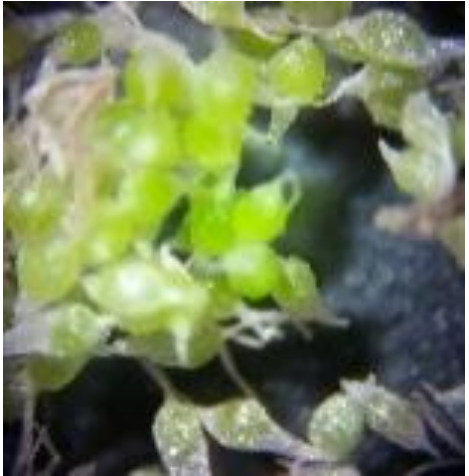




Figura 7. Semillas de la orquídea *Epidendrum* sp. (Fotografía: Banda, 2017).

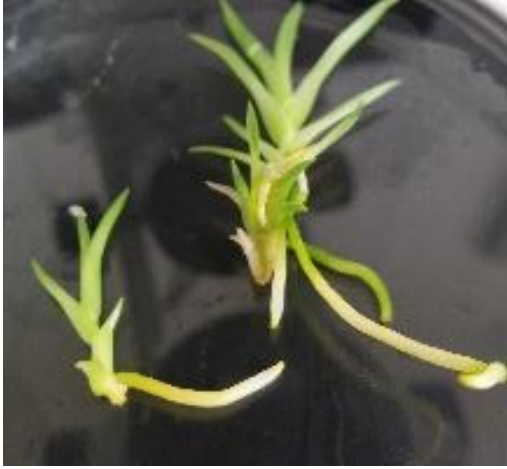
El proceso de germinación ha sido dividido en categorías de acuerdo con los estados de desarrollo del embrión. En la tabla 1 se presenta la escala fenológica con seis diferentes estados de desarrollo, basado en experimentos con *Orchis coriophora* L., *Prosthechea vespa* Vell. y *Sobralia klotzcheana* Rchb.f. (Yamazaki y Kazumitsu, 2006; Jhonson y Kane, 2007); esta escala puede ser adaptada con modificaciones según la especie de orquídea.

Los tiempos estimados para cada fase en condiciones *in vitro* son inciertos, debido a que varían según el medio de cultivo, la especie y las condiciones ambientales. Durante la germinación el embrión inicialmente se ensancha hasta llenar el espacio interior de la testa hasta romperlo y así emerger (fase 1). A continuación, forma un pequeño tubérculo o masas de células indiferenciadas llamado protocormo, que tiene la apariencia de una esfera ovoide y color verde (fase 2). Esta siempre posee micorrizas y sobre la cual eventualmente se desarrollarán los primordios caulinares y radicales (fases 3 y 4) (Izco *et al.*, 2004; Bewley y Black, 1994).

Tabla 1. Fases de la germinación de semillas de orquídeas (adaptado de Johnson y Kane, 2007) (Fotografías: Banda, 2017).

Fase	Descripción	Representación fotográfica
0	Semillas con embrión no germinado	 <p>Semillas de <i>Epidendrum</i> sp. en fase 0</p>
1	Expansión del embrión, ruptura de la testa	 <p>Semillas de <i>Epidendrum</i> sp. en fase 1</p>

2	Aparición del protocormo y rizoides	 <p>Protocormos de <i>Epidendrum</i> sp. en fase 2</p>
3 y 4	Emergencia y aparición de la primera hoja / aparición de raíces	 <p>Aparición de la primera hoja en <i>Cattleya trianae</i> Linden & Rchb.f.</p>

5	Plántula con presencia de raíces y dos o más hojas	 <p>Plántulas de <i>Epidendrum</i> sp. en fase 5</p>
---	--	--

2.1. Manejo de muestras para siembra de semillas de orquídeas en condiciones controladas

2.1.1. Obtención de semillas

La siembra de semillas de orquídeas a partir de diferentes cápsulas se puede llevar a cabo adaptando la metodología propuesta por McKendrick (2000), de la siguiente manera:

- Obtener la cápsula o el fruto maduro de una planta en adecuadas condiciones sanitarias.
- Lavar la cápsula con agua esterilizada las veces que sean necesarias, hasta remover toda suciedad.
- Si el procedimiento de obtención de las semillas se va a realizar en un tiempo posterior, se aconseja envolver la cápsula en papel de aluminio y colocarla dentro de un sobre de papel Kraft, para luego llevarla a refrigeración a 4 °C hasta el momento de su uso, según recomendación de Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón (2016).
- Remover cuidadosamente los segmentos de pétalos o sépalos muertos (figura 8).

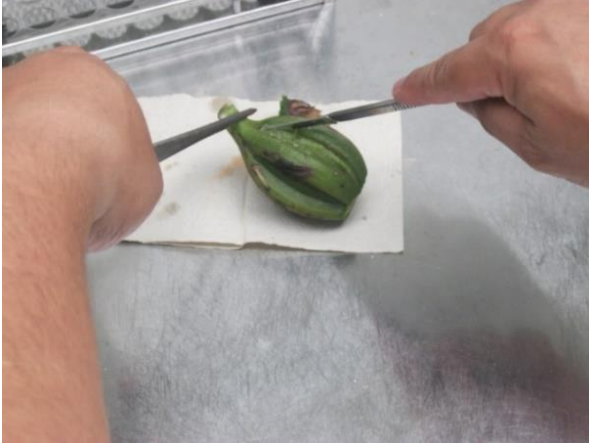


Figura 8. Remoción de los segmentos de pétalos o sépalos muertos de una cápsula de *C. trianae* (Fotografía: Vanegas, 2016).

- Introducir la cápsula en solución jabonosa y luego enjuagarla con abundante agua por riego continuo o inmersión, hasta que no quede jabón sobre su superficie.
- Sumergir la cápsula posteriormente por 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 5 %, a la que se ha añadido una gota de detergente.
- Transferir la cápsula a la cámara de flujo laminar. Extraerla inmediatamente de la solución de cloro usando unas pinzas y tomándola preferiblemente del pecíolo. De inmediato se sumerge en alcohol al 100 % y se pasa de manera rápida por el fuego.
- Colocar cada cápsula en una superficie desinfectada, sobre papel absorbente esterilizado, para realizar un corte longitudinal con un bisturí desinfectado (figura 9). Se debe utilizar una hoja de bisturí nueva para cada cápsula.



Figura 9. Corte longitudinal de una cápsula de *C. trianae* (Fotografía: Vanegas, 2016).

- Levantar cada mitad de la cápsula con las pinzas y golpear ligeramente sobre toda la superficie del medio de cultivo *in vitro* con el fin de esparcir las semillas (figura 10).

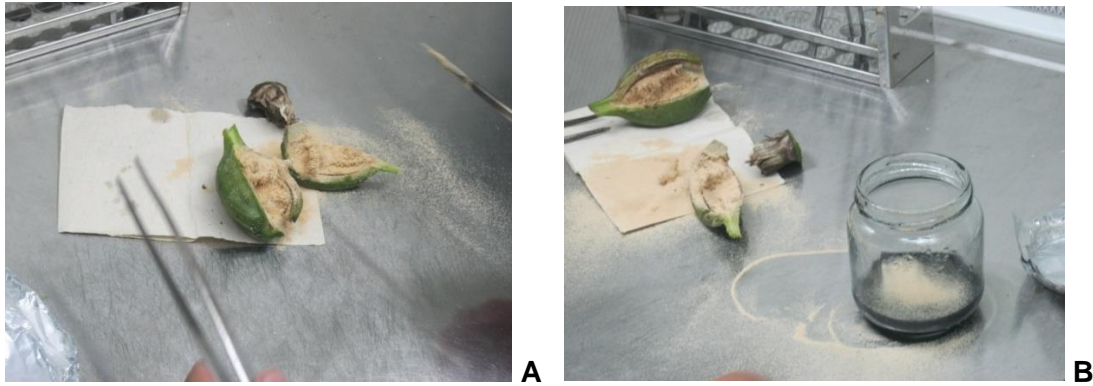


Figura 10. A. Cápsula disectada de *C. trianae* que muestra la gran cantidad de semillas en su interior. B. Semillas de *C. trianae* esparcidas sobre el medio de cultivo *in vitro* (Fotografías: Vanegas, 2016).

2.1.2. Medio de cultivo y proceso de siembra *in vitro*

Para realizar la siembra de las semillas de orquídeas en medio *in vitro*, se deben seguir ciertos protocolos. La metodología mencionada a continuación ha sido tomada de Arditti (2008), Ramsay (1989) y Thompson (1980).

Las condiciones de esterilización en la preparación del medio de cultivo se crean en autoclave y los frascos para utilizar se dejan por 20 minutos a 15 atmósferas, ya que a esta temperatura y presión son suficientes para eliminar todas las esporas de bacterias y hongos presentes en el medio. Las semillas deben ser esterilizadas y sembradas en los frascos sin hongos o bacterias externos, además de asegurarse que todos los instrumentos utilizados en la transferencia estén desinfectados.

La cámara de flujo laminar siempre debe ser desinfectada por completo, utilizando alcohol de 70-90 % de concentración, mediante un atomizador y limpiando las superficies con servilletas estériles, incluyendo las paredes y el techo. Se debe desinfectar tanto antes como después de utilizar la cámara. Es obligatorio el uso de guantes, desinfectándolos completamente antes de usarlos, rociando alcohol y guardándolos en la cámara. Las manos y uñas se lavan usando jabón antibacterial y aplicando alcohol posteriormente.

Los frascos de vidrio con un volumen de 250 ml deben estar limpios al introducirlos en la cámara; los instrumentos pueden ser autoclavados antes de su uso, envolviéndolos previamente en papel de aluminio sellado con cinta adhesiva. Una vez en la cámara, la esterilización es asegurada encendiéndola tres veces antes de usarla. La mejor manera de conservar el alcohol es en frascos grandes de vidrio para permitir la máxima exposición de los instrumentos. Después de flamear los instrumentos, estos deben ser ubicados rápidamente sobre un frasco de vidrio esterilizado para continuar con el flameado. Se debe dejar enfriar antes de su uso.

Los movimientos dentro de la cámara deben ser suaves, para evitar crear turbulencia de aire que pueda ocasionar contaminación. No se debe hablar, toser o

estornudar dentro de ella. Se debe trabajar en lo posible en la parte posterior, minimizando el tiempo de exposición de los medios.

En la germinación es de vital importancia que el medio de cultivo, los frascos, los equipos y las semillas se mantengan desinfectados desde el principio del proceso de germinación. Cualquier bacteria u hongo que se introduzca en los frascos crecerá más rápido que las semillas y pronto ocupará su espacio hasta eliminarlas.

EPÍLOGO

Ante la creciente expansión de la frontera agrícola y su indiscriminada comercialización, es inevitable que las orquídeas estén en riesgo inminente de extinción mundial, y la región del Sumapaz no escapa a esta situación, en la cual se encuentra un gran número de especies nativas. Para mitigar un poco esta circunstancia, se han propuesto métodos de propagación *in vitro* en laboratorio, con el fin de pensar a largo plazo en repoblar las poblaciones naturales disminuidas, teniendo en cuenta que esta situación toma años de trabajo constante y arduo, debido a la dificultad de sus interacciones ecológicas y las respuestas diversas según las especies de orquídeas utilizadas. Este capítulo trató de la toma de muestras de frutos y semillas de orquídeas para procesos de germinación en condiciones controladas de laboratorio, donde se pueden seguir los pasos determinados para obtener nuevas plántulas de orquídeas, como un elemento más en la lucha contra la extracción de estas especies en los relictos naturales del Sumapaz.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Morales, M. A., Laguna-Cerda, A., Vences-Contreras, C. y Lee-Espinosa, H. E. (2016). Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (*Orchidaceae*) para su conservación *ex situ*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(7), 1741-1747.
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of orchids*. Volume I, 2nd Edition. Wiley-Blackwell.
- Arditti, J. y Abdul, A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications: Tansley Review, N.º 110. *The New Phytologist*, 145(3), 367-421.
- Banda, L., Pinzón, Y. H. y Vanegas, L. E. (2017). Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea* sp. de la zona andina, Fusagasugá, Colombia. *Biota Colombiana*, 18(1), 80-87. Recuperado de <https://bit.ly/2Pegy86>
- Barthlott, W., Große-Veldmann, B. y Korotkova, N. (2014). Orchid seed diversity: a scanning electron microscopy survey. *Englera*, (32), 1-245. Recuperado de <https://bit.ly/3bVdo2B>
- Bewley, J. D. y Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of development and germination*. Segunda edición, pp. 10-31. Nueva York: Plenum Press.
- Calderón, E. (2006). *Libro rojo de plantas de Colombia. Vol. 6. Orquídeas, primera parte*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Gil, A., Contreras, D. y Gutiérrez, L. (2016). Establecimiento *in vitro* de protocormos de *Prosthechea* sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético. *Revista Mutis* 6(1), 6-15. <https://doi.org/10.21789/22561498.1108>
- Izco, J., Brugués, M., Costa, M., Devesa, J., Fernández, F., Gallardo, T., Limona, X., Prada, C., Talavera, S. y Valdés, B. (2004). *Botánica*. 2.^a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.
- Johnson, T. R. y Kane, M. (2007). Asymbiotic germination of ornamental Vanda: *in vitro* germination and development of three hybrids. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91(3), 251-261. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9291-7>
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Recuperado de <https://bit.ly/2Zily11>
- Otero, J. y Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270-276. Recuperado de <https://bit.ly/2vTxHgi>
- Pérez-Martínez, B. A. y Castañeda-Garzón, S. L. (2016). Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vegetal*, 16(3), 143-151. Recuperado de <https://bit.ly/2T2Kjtn>

- Ramsay, M. (1989). *Apuntes no publicados sobre germinación de semillas de orquídeas*.
- Rodrigues, J., Gomes, A., Pasqual, M., Rodrigues, F. y Aparecida, F. (2009). Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento in vitro de plântulas de orquídea. *Ciência Rural*, 39(3), 772-777. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n3/a21v39n3.pdf>
- Ruiz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H., Azpíroz, R. y Moreno, M. (2008). *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave y Lex.) Schltr (Orchidaceae) seeds. *Revista Internacional de Botánica Experimental Python*, (77), 203-215.
- Salazar, S. A. y Cancino, G. O. (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. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Thompson, P. A. (1980). *Orchids from seed*. Londres: HMSO.
- Yamazaki, J. y Kazumitsu, M. (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98(6), 1197-1206. Recuperado de <https://academic.oup.com/aob/article/98/6/1197/195218>



AGRADECIMIENTOS

A la empresa Geoambiente S. A. S. por su colaboración para el uso del laboratorio de propagación vegetal en la estación Chilacas, municipio de Pacho (Cundinamarca), que permitió el desarrollo de esta investigación.

3. MUESTREO DE ENTOMOFAUNA ASOCIADA A LAS ORQUÍDEAS

Laguandio del Cristo Banda Sánchez

La diversidad de plantas de orquídeas en los ecosistemas andinos de Colombia está asociada a la diversidad de insectos, y su función ecológica con las orquídeas está relacionada especialmente con la polinización y la fitofagia. En esta sección se presentan pautas de una metodología de muestreo para dichos organismos.

3.1. Definición del objetivo del muestreo

Los estudios de entomofauna asociada a orquídeas, usualmente buscan conocer insectos benéficos (polinizadores) y posibles insectos fitófagos que se comportan como plagas para estas especies de plantas. Además, se plantean estudios de diversidad asociada entre las diferentes especies de orquídeas y los diversos grupos de insectos en el ambiente donde interactúan.

Los alcances de la evaluación de entomofauna asociada en orquídeas nativas de áreas de influencia del Sumapaz (Cundinamarca, Colombia), buscan conocer la diversidad de insectos asociados, grupos de insectos fitófagos y proyección de estudios de insectos polinizadores específicos que contribuyen con la supervivencia de la familia *Orchidaceae*, para lo que se establece una metodología de muestreo sugerida.

3.2. Delimitación del ecosistema o ambiente

El ambiente natural donde se desarrollan las especies de plantas de orquídeas está conformado por diferentes ecosistemas, en los cuales se dan múltiples procesos biológicos y relaciones ecológicas que contribuyen con la supervivencia de dichas plantas. Las áreas naturales con presencia de orquídeas nativas suelen tener topografía variada, condiciones climáticas específicas y caracterizadas por una alta diversidad de flora y fauna.

En Cundinamarca, la región del Sumapaz se encuentra localizada en el Parque Nacional Natural del Sumapaz, el cual tiene ecosistemas representativos de bosque andino y alto andino, páramo y superpáramo, y comprende alturas entre los 1500 a 4300 m s. n. m. (Villegas Editores, 2006). El Parque Nacional Natural del Sumapaz es representativo de la región Andina, la cual cuenta con 2542 especies de orquídeas de las 4270 identificadas en Colombia, según el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, y la Universidad Nacional de Colombia (2015).

3.3. Localización de las orquídeas y método de muestreo

Inicialmente se realizan recorridos, transectos lineales o en direcciones irregulares (según accesibilidad) en la zona de estudio para la ubicación de las plantas de orquídeas (georreferenciación), así como las rutas y los senderos por los cuales se hace el estudio (figura 11).

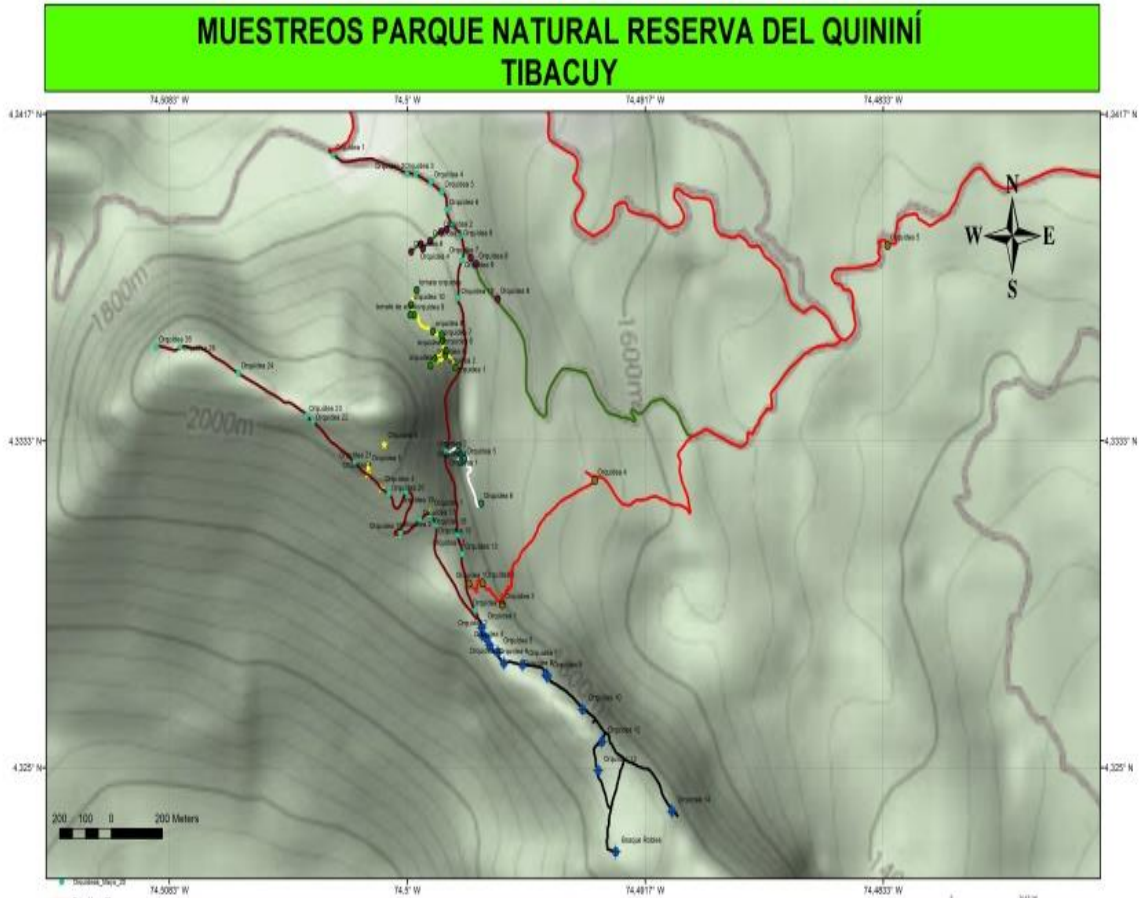


Figura 11. Delimitación y georreferenciación de un área representativa del Sumapaz para el estudio de orquídeas (Diseño: Borda, 2015).

3.3.1. Método de muestreo

Dadas las características topográficas de la zona de estudio, se plantea un modelo sistemático de muestreo. Mediante los transectos definidos previamente se realizan las evaluaciones equidistantes o según la presencia de orquídeas nativas (figura 12). En ambientes con topografía variada, que es lo más común en la región Andina, se recomienda ejecutar los muestreos mediante el método de transectos, el cual se enmarca en un modelo de evaluación sistemática. Mostacedo y Fredericksen (2000), quienes definen el concepto de transecto como un rectángulo situado en un lugar para medir ciertos parámetros de un determinado tipo de vegetación, además anotan la utilidad y rapidez de evaluación debido

a la mayor heterogeneidad con que se muestrea la vegetación al utilizar el método en mención.

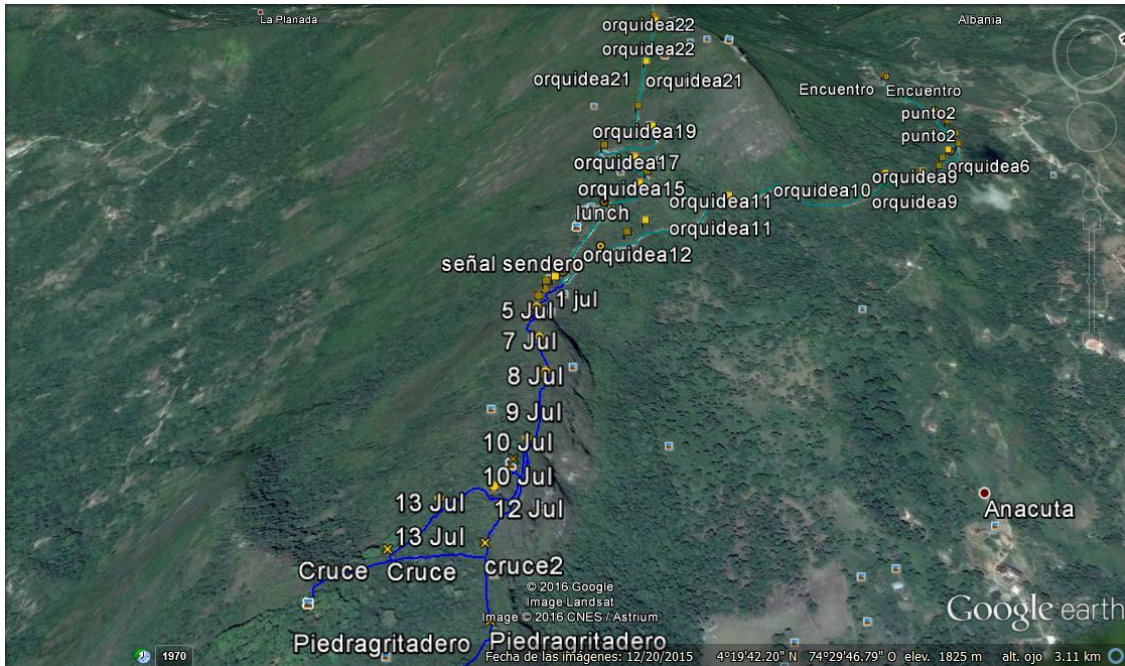


Figura 12. Definición y georreferenciación de sitios de muestreo de orquídeas en una zona del Quiníní (Tibacuy, Cundinamarca) mediante transectos (Diseño: Borda, 2015).

3.3.2. Unidad de muestreo

La unidad de muestreo está supeditada al objetivo del estudio o la investigación, y pueden plantearse unidades de muestreos directos sobre estructuras de las plantas de orquídeas o áreas de influencias de las especies. García (2004) anota que la unidad de muestreo debe ser apropiada al tamaño, a la distribución espacial y a la abundancia de los insectos por muestrear.

3.3.2.1. Plantas de orquídeas

La colecta de insectos se realiza directamente sobre la planta de orquídea, en la cual se pueden tener subunidades como hojas, flores, pseudobulbos, tallos, frutos, raíces u otra subunidad (figura 13).



Figura 13. Estructuras de las plantas de orquídeas para muestreo directo de insectos. A. Flores. B. Ramas. C. Hojas. D. Frutos (Fotografías: Banda, 2014).

La captura de los insectos se logra mediante técnicas de toma directa de las muestras sobre las plantas. Como alternativas se encuentran el golpeteo y la inserción de la estructura por evaluar en una red entomológica, y la toma directa de insectos presentes en las estructuras evaluadas (figura 14).





Figura 14. Herramientas para la captura de insectos asociados a las orquídeas. A. Golpeteo. B. Uso de aspirador entomológico. C. Captura directa de insectos presentes en flor (Fotografías: Banda, 2014).

3.4. Área de influencia de las orquídeas como unidad de muestreo

Diferentes especies de insectos asociados a las orquídeas no conviven constantemente con ellas, interactuando en su área de influencia; en consecuencia, se hace necesario evaluar los individuos alrededor de las plantas que se registren. Para este procedimiento se utilizan herramientas como la red entomológica (jama) y trampas (cebos, pegantes y otros).

Una alternativa es mediante la jama, con la que se muestrea en un radio aproximadamente de 2 m por cada punto donde se presentan las plantas de orquídeas, realizando de 3 a 4 pases para la captura de los insectos en el entorno (figura 15).



Figura 15. Muestreo de insectos alrededor de plantas de orquídeas (Fotografía: Banda, 2014).

3.5. Número de muestras

La cantidad de unidades de muestreo por evaluar en una fase exploratoria está dada por la distribución y el número de individuos de la población de plantas en el área de estudio. Este número de muestras depende de la existencia de estudios previos, en los cuales se pueden estimar número de muestras con base en los parámetros de media y varianza de una población en un espacio y tiempo dados, definiendo la distribución espacial de esta.

3.6. Variables de evaluación

3.6.1. Variables asociadas a las orquídeas

a. Especies de orquídeas. Las especies o determinados grupos de orquídeas tienen relación estrecha con los insectos asociados, lo que conlleva definir claramente qué especies, géneros, tribus e inclusive subfamilias de orquídeas se están evaluando.

b. Frecuencia de las orquídeas. El registro de los individuos de la misma especie o taxa definido en cada muestra tomada.

c. Densidad. Definida como el número de individuos de una especie o un grupo de plantas que se registran en un área de muestreo o zona de estudio. La densidad está relacionada con la abundancia relativa que pueden tener las orquídeas objeto de estudio.

3.6.2. Variables asociadas a la entomofauna

a. Densidad poblacional. Número de individuos por especie, género, familia, orden u otra categoría taxonómica definida.

b. Fluctuación poblacional. Relaciona los cambios en el número de individuos de una población en un tiempo definido para su evaluación. Con la fluctuación poblacional se pueden correlacionar aspectos biológicos (reproducción, ciclo de vida, etc.) y aspectos ecológicos, como los factores climáticos (temperatura y humedad relativa).

c. Órdenes de insectos. Taxa definido dentro de la clasificación de insectos. La categoría de orden, que agrega familias de insectos y está definida por características morfológicas, en la cual se pone énfasis en la presencia de las alas y otros aspectos que las identifican.

d. Familias, géneros y especies de insectos. Taxas aplicados a insectos y de interés por agrupar en estudios de entomofauna que están definidos por características morfológicas y genéticas muy específicas.

e. Hábito alimenticio. Los insectos tienen múltiples hábitos en las dietas alimenticias y es de interés para los estudios en orquídeas si son fitófagos, saprófagos, coprófagos, polinívoros, nectaríferos, filófagos, omnívoros u otro; también son de utilidad clasificarlos por los beneficios o perjuicios generados a las orquídeas (figura 16).





Figura 16. Daños por insectos plaga en orquídeas. A. Barrenaduras de una larva de Hymenoptera en el pedúnculo floral de *Cattleya* sp. B. Trozaduras en una flor de orquídea de *Eleanthus* sp., causada por un insecto fitófago (Fotografías: Banda, 2013-2014).

3.6.3. Índices de diversidad

Según Moreno (2001), el índice de diversidad es aquel valor que, dependiendo el número de individuos muestreados y las especies encontradas, permite conocer la diversidad de los individuos en los puntos reseñados.

Los índices de diversidad para Bouza y Covarrubias (2005) miden la disponibilidad de especies, la cantidad de individuos y la dominancia con que cuenta cada una de estas especies en el nicho muestreado. Dichos índices, según lo señala Krebs (1999), están constituidos por dos componentes principales: el número de especies o riqueza de especie y la abundancia o el equilibrio de especie. Dado lo anterior, para la estimación de la diversidad biológica de insectos, se pueden aplicar los índices de diversidad y riqueza, como el índice de diversidad de Simpson, el índice de diversidad de Shannon, el índice de riqueza de Margalef y el índice de riqueza de Menhinick.

3.6.4. Variables complementarias o covariables

a. Coordenadas geográficas. Definen la geolocalización de las unidades de muestreo evaluadas. Se utilizan diferentes equipos de georreferenciación.

b. Altura sobre el nivel del mar (a. s. n. m.). Establece la presencia de determinadas especies o grupos de orquídeas, como también los insectos que se registran en un

ecosistema dado, producto de las condiciones ambientales específicas que se dan por franjas altitudinales definidas por los diferentes pisos térmicos que caracterizan especialmente a la región Andina colombiana.

c. Temperatura, humedad relativa y precipitación. Son factores independientes de la densidad de las poblaciones evaluadas, que afectan la biología y ecología de las orquídeas y los insectos. En las zonas tropicales, la temperatura y la humedad relativa son afectadas por la altura sobre el nivel del mar y la estacionalidad de lluvias. Estos factores impactan la estacionalidad de la floración de las orquídeas de igual forma que los insectos presentes o asociados a estas plantas (figura 17).



Figura 17. Toma de temperatura y humedad relativa en áreas de influencia de orquídeas con equipo Modelo CENTER 314. (Fotografía: Banda, 2014).

3.7. Frecuencia de muestreo

La periodicidad de muestreo de la entomofauna en orquídeas está dada por el estado de desarrollo de las plantas de orquídeas y la estacionalidad de la floración de cada especie. Se pueden desarrollar muestreos con intervalos de tiempo mensual hasta completar un periodo de un año. Para evaluaciones específicas, como la presencia de insectos durante la floración de una planta de orquídea, se sugieren frecuencias de cortos periodos, que pueden estar definidas en días. En Colombia y para la región Andina, se debe revisar la

estacionalidad de lluvias en los ecosistemas o áreas de influencia donde se realizará el trabajo de muestreo, debido a que esta determina las épocas de floración de diferentes especies de orquídeas.

3.7.1. Tiempo (momento) del muestreo

El momento del muestreo está dado por los objetivos del estudio. Se pueden realizar evaluaciones en las orquídeas durante las horas del día y la noche, dado que algunas orquídeas atraen insectos nocturnos y otros diurnos; además algunas emiten sustancias químicas atrayentes diferenciales a insectos, por ejemplo, algunos himenópteros (Euglossini) (Oliveira-Junior, Almeida, Rodrigues, Silvério Júnior y Anjos-Silva, 2015; Zimmermann *et al.*, 2006), los cuales son atraídos por determinadas especies de orquídeas. Por consiguiente, para establecer en qué momento tomar las muestras de entomofauna se debe conocer los múltiples hábitos de los insectos y en qué momentos son más atraídos por las orquídeas.

3.8. Procesamiento y conservación de muestras en laboratorio

Las muestras de los insectos deben ser realizadas en frascos de colecta, de plástico o vidrio, con volumen entre 2 ml a 30 ml debidamente rotulados (fecha, lugar, coordenadas, orquídea), los cuales son llevados al laboratorio de entomología. Según Márquez (2005), se pueden utilizar líquidos fijadores como mecanismo de conservación de muestras; de esta manera, para la conservación de los insectos colectados en este estudio, se utilizó solución Hood, la cual consta de 95 % (v/v) de alcohol al 70 % y 5 % (v/v) de glicerina pura. La cantidad de individuos para tomar por muestra esa supeditada a la diversidad de cada taxa de insectos.

3.9. Análisis de la información

Este aspecto está supeditado al tipo de estudio, investigación, variables o parámetros poblacionales de los insectos evaluados, como en el caso de la evaluación de diversidad, en la cual se pueden determinar índices de diversidad o riqueza específica, y la diversidad de especies de orquídeas en cada ecosistema evaluado. Junto al análisis de diversidad se pueden generar conocimientos sobre la distribución espacial y temporal de las especies, la fluctuación poblacional, frecuencia de registro de especies, densidad poblacional de orquídeas e insectos evaluados, varianza de las poblaciones de orquídeas e insectos, diagramas matemáticos de la asociación de insectos a determinadas especies de orquídeas y correlaciones entre especies de insectos polinizadores y fitófagas con las especies de orquídeas, entre otros.

EPÍLOGO

Para la evaluación de la entomofauna se siguen las premisas anotadas, planteando elementos diferenciados o específicos, como son las evaluaciones directas sobre la planta, y en áreas de influencia (radio de interacción) de las orquídeas y los insectos polinizadores, fitófagos o de cualquier otro hábito alimenticio. Ambas herramientas de muestreo generan información pertinente sobre cualquier especie de entomofauna asociada o que interviene de forma directa o indirecta en los procesos de supervivencia de la familia de plantas más diversa en el ámbito mundial y en Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- Bouza, C. y Covarrubias, D. (2005). Estimación del índice de diversidad de Simpson en m sitios de muestreo. *Revista Investigación Operacional*, 26(2). Universidad de La Habana, Cuba. Recuperado de <https://bit.ly/37JIBDD>
- García, F. (2004). *El muestreo de poblaciones de artrópodos: principios y métodos*. Phytoma España, (164), 12-18.
- Krebs, C. (1999). *Ecological methodology*. 2^{da} edición. Londres: Addison-Wesley.
- Márquez, J. (2005). Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, (37), 385-408. Laboratorio de Sistemática Animal, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca (México).
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y Universidad Nacional de Colombia. (2015). *Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia*. Textos: Betancur, J., H. Sarmiento-L., L. Toro-González y J. Valencia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Colombia; Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Mora-Osejo, L. E. (2004). *Morfología, sistemática y evolución de las Angiospermae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.
- Moreno, C. (2001). Métodos para medir la biodiversidad, Vol. 1. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Oficina Regional de Ciencia y Tecnología para América Latina y el Caribe de Unesco y Sociedad Entomológica Aragonesa. Serie Manuales y Tesis SEA. *Revista de Biología Tropical*, 49(3-4), 1300-1302.
- Mostacedo B. y Fredericksen, T. (2000). *Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal*. Santa Cruz de la Sierra. Recuperado de <http://www.bio-nica.info/biblioteca/mostacedo2000ecologiavegetal.pdf>
- Oliveira-Junior, J., Almeida, S., Rodrigues, L., Silvério Júnior, A. y Anjos-Silva, E. (2015). Abejas de orquídeas (Apidae: Euglossini) en un fragmento de bosque en el ecotono Cerrado-Selva Amazónica, Brasil. *Acta Biológica Colombiana*, 20(3), 67-78. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n3.41122>
- Villegas Editores. (2006). *Parques Nacionales Naturales de Colombia. Parque Nacional Natural del Sumapaz*.



Zimmermann, Y., Roubik, D. y Eltz, T. (2006). Species-specific attraction to pheromonal analogues in orchid bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60(6), 833-843. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0227-8>

AGRADECIMIENTOS

Se agradece especialmente a la Universidad de Cundinamarca, a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y al programa de Ingeniería Agronómica. Gran reconocimiento al grupo de investigación PROSAFIS que, desde su creación en el año 2011, ha contribuido con la “semilla” de una escuela investigativa en cada uno de los integrantes investigadores. Se extiende el agradecimiento a los ingenieros agrónomos graduados de la Universidad: Cristian Acosta, Angie Camacho, Juan David Vargas, Ximena León, Jeison Martínez y Jonathan Sánchez, quienes pertenecieron al Semillero SEMINAC y colaboraron en el desarrollo de proyectos de investigación sobre orquídeas liderados por PROSAFIS. También se agradece al profesional David Borda, tecnólogo en cartografía, por su colaboración con los mapas para la georreferenciación de lugares de muestreo.

4. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA LA BÚSQUEDA DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y MICROORGANISMOS ENDÓFITOS EN ORQUÍDEAS

Jenny Paola Moreno López y César Alfonso Ariza Castillo

Las semillas de las orquídeas son diminutas y carecen de endospermo, por lo que es necesaria la interacción con hongos simbioses que le proporcionen los nutrientes necesarios para su normal crecimiento y desarrollo. De igual manera, se ha reconocido la importancia de microorganismos endófitos en la defensa, el crecimiento y desarrollo de las plantas. El género fúngico que se reporta con mayor frecuencia es *Rhizoctonia*, un estado asexual de los hongos del *phylum Basidiomycota*, que en estado teleomorfo podría pertenecer a las familias *Tulasnellaceae*, *Ceratobasidiaceae* o *Serendipitaceae* (Jacquemyn *et al.*, 2017).

Por otra parte, los hongos endófitos contribuyen a la toma de nutrientes, al crecimiento y a la inducción de mecanismos de defensa de las orquídeas contra *stress* abiótico y el ataque de patógenos y plagas. Se ha reportado la presencia de los géneros *Pestalotiopsis*, *Fusarium* y *Beauveria*, entre muchos otros (Khamchatra *et al.*, 2016; Pant *et al.*, 2017).

Los hongos formadores de micorriza y los microorganismos endófitos también se han encontrado en las raíces de las orquídeas jóvenes y adultas, por lo tanto, es importante reconocer la identidad del microorganismo que se encuentra interactuando con las plantas de la familia *Orchidaceae*; para esto, los procedimientos de laboratorio requieren técnicas de observación microscópica, aislamiento y una posterior caracterización molecular que permita identificar a los microorganismos que se relacionan positiva o negativamente con cada especie de orquídea. En consecuencia, en este capítulo se describe una metodología de trabajo sencilla para cuantificar, observar e identificar microorganismos asociados a plantas de *Orchidaceae*.

4.1. Pauta para la toma de muestras

Las raíces de orquídeas jóvenes se recolectan en los lugares donde se encuentren cultivadas o creciendo de manera silvestre (jardines, viveros o en zona rural), procurando tomarla desde la base de la planta y haciendo el menor daño posible. Las muestras deben tomarse con bisturíes desinfectados y deben envolverse de forma individual en servilletas estériles ligeramente humedecidas, que serán guardadas en bolsas de papel. Cada una se rotula indicando la especie de la orquídea, el lugar de procedencia, coordenadas geográficas, fecha de la recolección y nombre del colector. Para su transporte hasta el laboratorio las muestras deben conservar una temperatura promedio de 15 °C, con el fin de conservarlas frescas y su procesamiento se realiza en el laboratorio, en lo posible dentro de las 24 horas posteriores a la colecta (Moreno, Herrera-Sánchez y Prado-Dorado, 2014). Zettler y Corey (2018) reportan que el aislamiento de los hongos se puede realizar hasta 48

después de la toma de las muestras. Cabe aclarar que no se debe tomar material vegetal sin los permisos de las autoridades competentes de cada país.

4.2. Conteo de enrollamientos hifales en raíces de orquídeas

Algunos hongos forman enrollamientos de sus hifas en protocormos de orquídeas (Yeh *et al.*, 2019) que se conocen como enrollamientos hifales o pelotones. Su función es la de ser el sitio de transferencia de nutrientes entre hongos y orquídeas, contribuyendo en el crecimiento de estas en hábitats naturales (Dearnaley *et al.*, 2016).

Para realizar el conteo de los pelotones presentes en raíces de orquídeas se hacen cortes transversales de 3 a 4 cm del extremo de las raíces más jóvenes, utilizando cuchillas estériles. Estos cortes serán de aproximadamente 1 mm de grosor, los cuales se ubican en láminas portaobjetos con azul de metileno. Para verificar la presencia de enrollamientos hifales o “pelotones”, los montajes se observan en un microscopio óptico. El porcentaje de enrollamientos hifales se determina mediante el conteo de 20 células corticales de la raíz al azar, por cada muestra (Otero, Mosquera-Espinosa y Flanagan, 2013; Moreno, Herrera-Sánchez y Prado-Dorado, 2014) (figura 18).

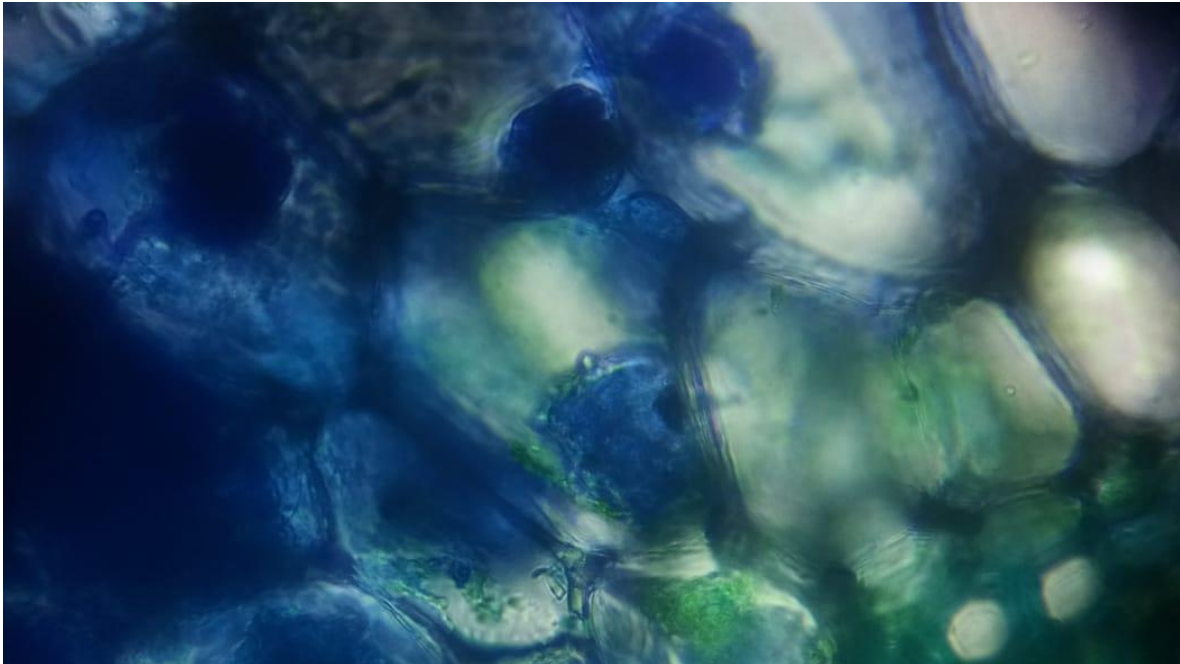


Figura 18. Enrollamiento hifal (pelotón) encontrado en raíces de *Rodriguezia* sp., 40X (Fotografías: Moreno, 2017).

4.3. Cómo realizar el aislamiento de hongos micorrícicos a partir de explantes de raíz

Con el fin de identificar los hongos presentes en las raíces, se realizan cortes de aproximadamente 0,5 cm de longitud teniendo en cuenta la ubicación de estos, es decir si estaban en los extremos o en el centro de la raíz; estos explantes se desinfectan utilizando etanol al 70 % e hipoclorito de sodio al 2,5 % y posteriormente se lavan con agua destilada estéril. La duración de la desinfección varía de acuerdo con la especie de orquídea por procesar.

Los tejidos desinfectados se secan con toallas de papel estériles y se siembran en cajas de Petri con medios de cultivo como el agar - papa - dextrosa (PDA) y agar Saboraud. Para evitar la contaminación por bacterias se utilizan antibióticos como la amoxicilina 0,05 g.L⁻¹. Las muestras se incuban entre 25-27 °C o a temperatura ambiente hasta observar desarrollo micelial de los hongos presentes. Los microorganismos aislados se mantienen en cultivo puro. Para su identificación en cuanto al género se debe tener en cuenta características macroscópicas como el color, diámetro y la forma de las colonias y las características microscópicas (presencia o ausencia de esporas o enrollamientos hifales) considerando claves taxonómicas como la desarrollada por Barnett y Hunter (1998). Dependiendo del microorganismo encontrado se hacen siembras en medios selectivos, como Ko y Hora (1971) para *Rhizoctonia* sp., reportado como micorrícico en orquídeas (Otero, Mosquera-Espinosa y Flanagan, 2013; Moreno, Herrera-Sánchez y Prado-Dorado, 2014) (figura 19); sin embargo, cuando los hongos no presentan esporulación la identificación por características morfológicas se hace difícil y podría llegar a ser imposible, por lo tanto, se debe proceder con el análisis molecular.

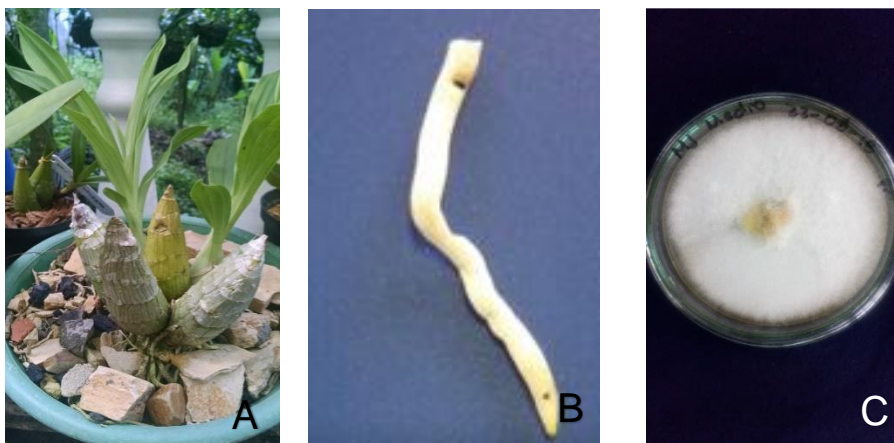


Figura 19. Aislamiento de hongos endófitos y micorrícicos. A. Planta de *Catasetum* sp. en fase vegetativa. B. Raíz sana de *Catasetum* sp. C. Cultivo puro de un hongo endófito del género *Rhizoctonia*. (Fotografías: Moreno, 2017).

4.4. Obtención de cultivos monomiceliares y cultivos monospóricos

Una vez identificado el género al que pertenece cada hongo aislado, se obtienen cultivos puros procedentes de un único genotipo por medio de la implementación de cultivos monomiceliares (para hongos que no producen esporas) o cultivos monospóricos (para hongos que producen esporas), con el fin de realizar una caracterización molecular de los aislamientos obtenidos que permita identificar cada microorganismo aislado.

4.4.1. Cultivos monomiceliares

A partir de cultivos con colonias puras, se realiza una resiembra en medio de cultivo y se lleva a incubación (entre 25 y 28 °C o a temperatura ambiente, dependiendo de la especie de hongo) durante 24 horas. Pasado este tiempo, dentro de la cámara de flujo laminar, las cajas de Petri se observan en el estereoscopio para ver el micelio del hongo en crecimiento, enfocando los bordes de la colonia con el fin de identificar las puntas de las hifas jóvenes. Luego con ayuda de un bisturí estéril, se corta un trozo de agar que tenga la punta de una única hifa, con precaución de no tocar otras hifas alrededor y este corte se transfiriere a una nueva caja Petri con medio de cultivo fresco. El aislamiento se lleva a la incubadora a 24 °C durante 10 días, según Castellanos *et al.* (2011) o se deja a la temperatura de incubación inicial.

4.4.2. Cultivos monospóricos

En el caso de los hongos que producen esporas, la pureza genética se garantiza cuando se parte de una sola de ellas, ya que sería un único individuo y no una población. A partir de un cultivo con una colonia pura, se toma un asa recta y se punza sobre el borde de la colonia, seguidamente se le agregan de 4 a 6 gotas de agua destilada estéril sobre una caja de Petri con medio de cultivo, para que las esporas caigan sobre este y luego se esparce el agua con un rastrillo de Drigalsky o un triángulo de vidrio y se lleva a incubación (27 °C) durante 24 horas, luego de las cuales las esporas empiezan a germinar. Pasado este tiempo, la caja de Petri se observa en el estereoscopio para ver las esporas individuales y con la ayuda de un asa, estas se transfieren a cajas de Petri con medio de cultivo fresco y se llevan a incubación a 24 °C por diez días (Castellanos, Jara y Mosquera, 2011).

Otra forma de obtener cultivos monospóricos es mediante dilución de una suspensión de esporas, para lo que se debe tener un cultivo puro al cual se le hace un raspado de micelio que se diluirá en 50 ml de agua destilada estéril. La suspensión se ajustará a 1×10^4 esporas.ml⁻¹. Se depositan 20 ml de la suspensión en una caja de Petri que contenga el medio agar-agua, distribuyendo uniformemente con ayuda del rastrillo de Drigalsky. Pasadas 24 horas se confirmará la germinación de esporas individuales utilizando un microscopio. Una vez identificadas las colonias individuales, se debe hacer un

repique a una caja de Petri con medio PDA y llevar a incubación (28 °C) (Brunner *et al.*, 2013).

Es importante recordar que todos los procedimientos de laboratorio requieren materiales estériles y deben hacerse dentro de la cámara de flujo laminar, cumpliendo adecuadamente con las normas de bioseguridad.

4.5. Extracción de DNA, PCR y secuenciación de las muestras

La identificación molecular en cuanto a especie de hongos endófitos y micorrícicos aislados a partir de orquídeas (al igual que en muchos otros integrantes del reino fungi) se basa principalmente en técnicas moleculares. Una vez obtenidos los cultivos monomiceliares o monospóricos, estos son codificados y se procede a subcultivar con el fin de obtener al menos tres replicas por cultivo. Después se realiza la extracción de ADN a cada uno de los aislamientos genéticamente puros, usando el protocolo más conveniente teniendo en cuenta disponibilidad y costos. Entre los kits comerciales usados para la extracción de ADN de hongos endófitos y micorrícicos aislados de orquídeas se han reportado el InstaGene™ Matrix Genomic DNA isolation (Parthibhan *et al.*, 2017) y el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) (Novotná *et al.*, 2018).

Posterior a la extracción del ADN se debe llevar a cabo una PCR, cuyo protocolo y condiciones dependerán del hongo por identificar. Los genes utilizados para la amplificación (se recomienda el uso de al menos dos diferentes) son los de la región genética denominada ITS (Internal Transcribed Spacer) del DNA ribosomal fúngico. Los cebadores o *primers* ITS1, ITS2 e ITS4 se reportan como unos de los más utilizados (Gardes y Bruns, 1993; Herrera *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Cevallos *et al.*, 2018; Zettler y Corey, 2018). También se han utilizado otras secuencias como las de β -Tubulina y nrLSU (nuclear ribosomal small and large Subunits) (Chen *et al.*, 2013; O'Donnell y Cigelnik, 1997; White *et al.*, 1990).

Una vez obtenidos los productos de PCR se deben verificar mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) (Sarsaiya *et al.*, 2020) y se secuencian por medio de técnicas como Sanger o secuenciación de segunda generación (SNG). Las secuencias obtenidas se recortan y editan usando un *software* como Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA) y se comparan con las que se encuentran registradas en el GenBank (National Center of Biotechnology Information) mediante la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (González-Chávez *et al.*, 2018).

EPÍLOGO

Colombia es un país megadiverso, en el cual se encuentran una buena parte de las especies de orquídeas que habitan nuestro planeta. La región del Sumapaz es una zona privilegiada por encontrar diferentes especies de estas plantas, tanto en hábitats naturales como para la producción en vivero. Las orquídeas son organismos bellos y sorprendentes,

y sus interacciones con otros miembros de los ecosistemas, por ejemplo, con algunos microorganismos no terminan de asombrar a quienes las investigamos, ya que trabajan en sociedad con hongos del género *Rhizoctonia* para poder germinar y siguen esta asociación hasta cuando la planta puede conseguir sus nutrientes por sí misma. Estas interacciones la protegen, colonizando sus raíces y evitando que otros microorganismos patógenos las ataquen, impidiendo así que haya una interacción negativa que afecte las funciones fisiológicas de las orquídeas. Recientemente se ha descubierto que hay otros microorganismos que habitan dentro de las plantas, incluidas las de la familia *Orchidaceae*, que habitan en su interior e inducen la producción de metabolitos secundarios con variadas funciones: propiedades antimicrobianas, inducción de la resistencia vegetal y competir en la rizosfera con otros por nutrientes y espacio. Aún nos quedan muchos aspectos por estudiar en las interacciones entre los microorganismos y las orquídeas para encontrar soluciones a problemáticas que se generen tanto en la conservación como en la producción de orquídeas.

BIBLIOGRAFÍA

- Barnett, H. L. y Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4^{ta} edición. Saint Paul, Minnesota: APS Press.
- Brunner, C., Navarro-Barranco, H., Ayala-Zermeño, M., Mellín-Rosas, M. A. y Toriello, C. (2013). *Obtención y caracterización de cultivos monospóricos de Metarhizium anisopliae (Hypocreales: Clavicipitaceae) para genotipificación*. En Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico, pp. 52-55.
- Castellanos, G., Jara, C. y Mosquera, G. (2011). *Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del fríjol*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Cevallos, S., Herrera, P., Sánchez-Rodríguez, A., Declerck, S. y Suárez, J. P. (2018). Untangling factors that drive community composition of root associated fungal endophytes of Neotropical epiphytic orchids. *Fungal Ecology*, 34, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.05.002>
- Chen, J., Zhang, L.-C., Xing, Y.-M., Wang, Y.-Q., Xing, X.-K., Zhang, D.-W., ...Guo, S.-X. (2013). Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). *PloS One*, 8(3), e58268-e58268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058268>
- Dearnaley, J., Perotto, S. y Selosse, M.-A. (2016). Structure and development of orchid mycorrhizas. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, 63-86. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch5>
- Gardes, M. y Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- González-Chávez, M. C. A., Torres-Cruz, T. J., Sánchez, S. A. et al. (2018). Microscopic characterization of orchid mycorrhizal fungi: Scleroderma as a putative novel orchid mycorrhizal fungus of Vanilla in different crop systems. *Mycorrhiza*, (28): 147-157. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0808-6>
- Herrera, H., Valadares, R., Contreras, D., Bashan, Y. y Arriagada, C. (2017). Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile. *Mycorrhiza*, (27), 175-188. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0733-0>
- Jacquemyn, H., Duffy, K. J. y Selosse, M.-A. (2017). Biogeography of Orchid Mycorrhizas. En L. Tedersoo (ed.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)* (pp. 159-177). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_8

- Khamchatra, N., Dixon, K., Chayamarit, K., Apisitwanich, S. y Tantiwiwat, S. (2016). Using in situ seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. (Orchidaceae). *Agriculture and Natural Resources*, 50(1), 8-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.01.002>
- Ko, W-H. y Hora, F. K. (1971). A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, (61), 707-710. University of Hawaii, Department of Plant Pathology.
- Moreno, J., Herrera-Sánchez, Y. A. y Prado-Dorado, A. (2014). Aislamiento y caracterización de *Rhizoctonia* sp. asociados a raíces de orquídeas en Fusagasugá, Cundinamarca. *Fitopatología Colombiana*, 38(1), 9-12. Recuperado de <https://bit.ly/2PloAM9>
- Novotná, A., Benítez, Á., Herrera, P., Cruz, D., Filipczyková, E. y Suárez, J. P. (2018). High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience*, 59(1), 24-32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.07.007>
- O'Donnell, K. y Cigelnik, E. (1997). Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103-116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- Otero, J. T., Mosquera-Espinosa, A. T. y Flanagan, N. S. (2013). Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 13(1-2), 57-63. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44340043007>
- Pant, B., Shah, S., Shrestha, R., Pandey, S. y Joshi, P. R. (2017). An Overview on Orchid Endophytes. En A. Varma, R. Prasad y N. Tuteja (eds.), *Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration*, pp. 503-524. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68867-1_26
- Parthibhan, S., Rao, M. V. y Kumar, T. S. (2017). Culturable fungal endophytes in shoots of *Dendrobium aqueum* Lindley - An imperiled orchid. *Ecological Genetics and Genomics*, 3-5, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2017.06.004>
- Sarsaiya, S., Jain, A., Jia, Q., Fan, X., Shu, F., Chen, Z., ...Chen, J. (2020). Molecular Identification of Endophytic Fungi and Their Pathogenicity Evaluation Against *Dendrobium nobile* and *Dendrobium officinale*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 316. <https://doi.org/10.3390/ijms21010316>
- Sneh, B., Burpee, L. y Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. St. Paul Minnesota: APS Press.

- Wang, X., Li, Y., Song, X., Meng, Q., Zhu, J., Zhao, Y. y Yu, W. (2017). Influence of host tree species on isolation and communities of mycorrhizal and endophytic fungi from roots of a tropical epiphytic orchid, *Dendrobium sinense* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, (27), 709-718. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0787-7>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). 38 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. B. T.-P. C. R. P. White (eds.), *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yeh, C.-M., Chung, K., Liang, C.-K. y Tsai, W.-C. (2019). New Insights into the Symbiotic Relationship between Orchids and Fungi. *Applied Sciences*, 9(3), 2076-3417. <https://doi.org/10.3390/app9030585>
- Zettler, L. W. y Corey, L. L. (2018). Orchid Mycorrhizal Fungi: Isolation and Identification Techniques. En Y.-I. Lee y E. C.-T. Yeung (eds.), *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses - Methods and Protocols* (pp. 27-59). New York: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_2



AGRADECIMIENTOS

A Yurany Angélica Herrera, Aura Alexandra Prado, Laura Daniela Vargas y Ana María Victorino por su colaboración en los aislamientos y la caracterización de los hongos encontrados en los procesos de investigación para los cuales se desarrollaron estas metodologías.

Agradecemos también a Alberto Suárez Quiñónez por su colaboración en el laboratorio de fitopatología de la Universidad de Cundinamarca, sede Fusagasugá.

5. MOSAICO FOTOGRÁFICO: ORQUÍDEAS PRESENTES EN ECOSISTEMAS NATURALES DE LA PROVINCIA DEL SUMAPAZ

César Alfonso Ariza Castillo, Laguandio del Cristo Banda Sánchez, Arlette Ivonne Gil Clavijo, Jenny Paola Moreno López y Luis Eduardo Vanegas Martínez

Se presentan a continuación diferentes fotografías de especies nativas de la familia *Orchidaceae* en ecosistemas naturales, donde se desarrollaron e implementaron las distintas herramientas de muestreo o evaluación de orquídeas de acuerdo con los diversos parámetros ecológicos y biológicos indicados en los capítulos anteriores.



Figura 20. Planta de *Sobralia* sp. presente en el cerro del Quinini (Tibacuy, Cundinamarca, Colombia) (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 21. Flor de *Epidendrum* del grupo *secundum* presente en el cerro del Quinini (Tibacuy) (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 22. Planta de *Epidendrum acuminatum* Ruiz & Pav. sobre forofito presente en el cerro del Quinini. (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 23. Inflorescencia de *Oncidium* sp. ubicada en el cerro del Quinini. (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 24. Planta de orquídea *Stelis* sp. a unos 30 m de altura, representación típica de una epífita en inmediaciones de la Reserva San Rafael (Fusagasugá, Cundinamarca) (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 25. Planta de *Stelis* sp. ubicada en la Reserva San Rafael. (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 26. Flor de *Lepantopsis* sp. ubicada en la Reserva San Rafael. (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 27. Orquideas del género *Cattleya* en la zona del Quinini (Tibacuy). (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 28. Flor de *Prosthechea vespa* (Vell.) W.E. Higgins en la zona del Quinini. (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 29. Planta de *Orchidaceae* representativa de las litófitas (crecimiento sobre rocas). (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 30. Planta de *Stelis* sp. ubicada en la Reserva San Rafael. (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 31. Flor de *Epidendrum* grupo *secundum* presente en el área de influencia de San Rafael (Fusagasugá). (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 32. Flor de *Pleurothallis phalangifera* (C. Presl) Schltr. en San Rafael (Fusagasugá). (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 33. Flor de *Pleurothallis* sp. en San Rafael. (Fotografía: Banda, 2014).



Figura 34. Orquídea epífita en fase vegetativa, común en la Reserva Natural San Rafael, resaltada por la oscuridad del entorno, observándose claramente bulbos, hojas, estolones y raíces. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 35. Orquídea *Epidendrum* sp. sobre un tocón de madera en la Reserva Natural San Rafael. Destaca la forma de copa de sus hojas, y en la parte izquierda sobre el árbol se resaltan las raíces epífitas de varias orquídeas entre las que se pueden observar *E. acuminatum* Ruiz & Pav. y otro tipo de *Epidendrum* perteneciente al grupo *secundum*. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 36. Orquídea de gran tamaño creciendo sobre rocas en la Reserva Natural San Rafael. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 37. Flores de *Epidendrum* sp. del grupo *secundum* que pueden observarse sobre árboles de gran tamaño en las zonas de transición entre pastizales y bosques secundarios, en la Reserva Natural San Rafael. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 38. Flores amarillas y bulbos oscuros de *Brassia* sp., que puede observarse sobre árboles de gran tamaño en las zonas de transición entre pastizales y bosques secundarios en la Reserva Natural San Rafael. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 39. Ejemplar de *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f., florecido en las cercanías a la Reserva Natural del Quinín. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 40. Orquídea *Epidendrum* sp. florecida en las cercanías a la Reserva Natural del Quinini. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 41. Orquídea *Prosthechea vespa* (Vell.) W. E. Higgins florecida en la zona alta de la Reserva Natural del Quinini. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 42. *Epidendrum* sp. florecida en la zona baja de la Reserva Natural del Quinini. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 43. Inflorescencia de *Prosthechea vespa* (Vell.) W. E. Higgins, en la cual se destaca la belleza de sus "pecas" en sus flores. Estas plantas se pueden observar sobre árboles y rocas en la Reserva Natural del Quinini. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 44. Orquídea perteneciente al grupo *Pleurothallidinae*, que crece sobre rocas expuestas en la Reserva Natural del Quinini. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 45. Nubes sobre la regiones del Sumapaz, Tequendama y Bajo Magdalena vistas desde la Reserva Natural del Quinini. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 46. Relicto de los antiguos bosques de robles andinos en la Reserva Natural del Quininí. (Fotografía: Ariza, 2015).



Figura 47. Orquídea perteneciente al grupo *Pleurothallidinae*, epífita y litófila que puede observarse en la Reserva Natural del Quininí. (Fotografía: Ariza, 2015).

6. PAUTAS GENERALES PARA LA EVALUACIÓN Y EL CONOCIMIENTO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DE COLOMBIA

Arlette Ivonne Gil Clavijo y Laguandio del Cristo Banda Sánchez

El conocimiento de las poblaciones de plantas, así como de cualquier organismo en los ecosistemas, requiere de metodologías de evaluación que permitan obtener información de diferentes aspectos relacionados o ligados a cada una de ellas. Para la familia de plantas *Orchidaceae* presentes en múltiples ecosistemas naturales de Colombia, se proponen metodologías de estudio con el fin de ampliar el conocimiento sobre diferentes parámetros biológicos y ecológicos, principales propósitos que fueron expuestos en el presente libro.

Al iniciar la evaluación de las orquídeas en un ecosistema o ambiente natural, se requieren trabajos exploratorios y muestreos “pilotos” que posibiliten un primer acercamiento a la presencia de estas plantas en las áreas objeto de estudio. Para ambientes naturales con difícil acceso (característica predominante en la cual se encuentran orquídeas nativas de la región del Sumapaz) es aceptable la evaluación o el método de muestreo sistemático, en el que las unidades de evaluación se seleccionen según su disponibilidad y ubicación de acuerdo con múltiples componentes de la vegetación natural (figura 48).



Figura 48. A y B. Panorámicas de ecosistemas naturales de la región Andina (Cundinamarca, Colombia) con presencia de orquídeas nativas. (Fotografías: Banda, 2014).

Para la toma de muestras de orquídeas (raíces, hojas, flores, frutos o semillas, u otra estructura) con fines de propagación o diagnóstico fitosanitario, se debe recopilar información complementaria en la cual se resalte una completa georreferenciación de las plantas objeto del estudio y la delimitación de taxones de interés (géneros o especies), su determinación taxonómica, el registro de las condiciones ambientales como la altura sobre el nivel del mar, temperatura y humedad relativa, entre otros factores climáticos y ecológicos que caracterizan el ecosistema. Al ubicar las plantas, se procede a considerar el estado de

supervivencia, edades, sanidad y vigor. Todos estos parámetros contribuyen a un acertado diagnóstico fitosanitario y son determinantes en el éxito de procesos de propagación en condiciones controladas, especialmente la propagación *in vitro* que es una alternativa tecnológica que contribuye al aprovechamiento y la comercialización de múltiples especies de orquídeas; y la entomofauna, como factor ecológico indispensable para la supervivencia de las orquídeas, justifica su evaluación en los ecosistemas naturales.

