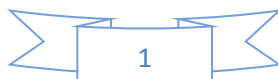


EFFECTO DEL USO DE DOS REGULADORES DE CRECIMIENTO (BAP - ANA) y
NUTRIENTES COMPLEJOS EN LA GERMINACIÓN *IN VITRO*
DE LA ORQUÍDEA *Prosthechea sp*

CRISTIAN CAMILO ORJUELA URREGO
EDWIN ANDRES DEAZA RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INGENIERÍA AGRONÓMICA
FUSAGASUGA, CUNDINAMARCA

2017



EFFECTO DEL USO DE DOS REGULADORES DE CRECIMIENTO (BAP - ANA) y
NUTRIENTES COMPLEJOS EN LA GERMINACIÓN *IN VITRO*
DE LA ORQUÍDEA *Prosthechea sp*

CRISTIAN CAMILO ORJUELA URREGO
EDWIN ANDRES DEAZA RODRIGUEZ

Trabajo de grado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo

Director

CESAR ALFONSO ARIZA CASTILLO

Ing. Agrónomo cMsc.

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA INGENIERÍA AGRONÓMICA
FUSAGASUGÁ
2017

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurad

Firma del jurado

Fusagasugá, Abril de 2017

Agradecimientos

Agradecemos a Dios por permitirnos estar aquí, al profesor César Ariza por la propuesta, dirección, acompañamiento y ejecución del trabajo en laboratorio, al profesor Luis Eduardo Vanegas por sus asesorías y conocimientos sobre cultivo de orquídeas *in vitro*.

Agradecemos al grupo PROSAFIS por su gran apoyo y acompañamiento en la recolecta de las cápsulas de orquídea y a la Universidad de Cundinamarca por permitirnos utilizar los laboratorios de microbiología para el desarrollo del trabajo.

A nuestros padres por su gran apoyo, consejos, comprensión, ayuda en los momentos difíciles, y por brindarnos los recursos necesarios para estudiar. Nos brindaron valores, principios, comprensión, empeño, perseverancia, para conseguir cada uno de los objetivos propuestos por nosotros.

A la Universidad de Cundinamarca sede Fusagasugá, por darnos la oportunidad de estudiar y formarnos como profesionales en la etapa de pregrado, por brindarnos los espacios como laboratorios y demás para realizar la práctica de este trabajo, agradecemos de igual manera a todos nuestro profesores durante toda nuestra carrera profesional.

Contenido

INDICE DE ABEVIATURAS	7
GLOSARIO.....	8
1. CARACTERIZACION DEL PROBLEMA.....	14
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.2 GENERAL.....	16
3.3 ESPECÍFICOS	16
4. MARCO TEÓRICO	17
4.1. BIOLOGÍA DE LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE ORQUÍDEA.....	17
4.2 FUNDAMENTOS DE LA GERMINACIÓN DE ORQUÍDEAS <i>IN VITRO</i>	21
4.3. EL MEDIO DE CULTIVO: MURASHIGE & SKOOG (MS).....	22
4.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	23
4.4.1 Auxinas	24
4.4.2 Citoquininas.	24
4.5. SUPLEMENTOS	25
4.5.1. Fécula de maíz.	26
4.5.2. Agua de coco.....	26
4.5.3. Jugo de piña	27
4.6 MARCO DE ANTECEDENTES.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1. METODOLOGÍA	29
5.1.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	29
5.1.2. MATERIAL VEGETAL Y PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN	29
5.2.3. El experimento	31
5.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
6.1 EFECTO DE NUTRIENTES COMPLEJOS (JUGO DE PIÑA, AGUA DE COCO Y ALMIDÓN), BAP Y ANA SOBRE LA GERMINACIÓN.....	34
6.2 EFECTO DE NUTRIENTES COMPLEJOS (JUGO DE PIÑA , AGUA DE COCO Y ALMIDÓN), BAP Y ANA SOBRE LA FORMACION DE PROTOCORMOS.....	39

6.3 EFECTO DE NUTRIENTES COMPLEJOS (JUGO DE PIÑA, AGUA DE COCO Y ALMIDÓN), BAP Y ANA SOBRE EL DESARROLLO DE RIZOIDES.	44
7. CONCLUSIONES.....	51
8. RECOMENDACIONES	52
9. BIBLIOGRAFIA	53

INDICE DE ABEVIATURAS

ANA:	Ácido naftalenacético
AC:	Agua de Coco
AL:	Almidón
BAP:	Bencilaminopurina
JP:	Jugo de Piña
MS:	Medio Murachige y Skoog
g.L⁻¹:	Gramos por litro
mg.L⁻¹:	Miligramos por litro
ml/L :	Mililitros por litro

GLOSARIO

Callogenesis: Proceso en el cual un tejido diferenciado (raíz, tallo, hoja, flor, etc.) inicia con la división de células a manera de tumoraciones, de forma desorganizada “callo”, mediante la aplicación de Fitoreguladores. La callogénesis se expresa como el porcentaje de explantes que forman callos (Smith 2012).

Capsula: tipo de fruto de las orquídeas dehiscente que contiene las semillas de tipo polvoso (Contreras et al., 2016)

CAULOGENESIS: Crecimiento y desarrollo de tallos preformados o inducidos (Cresswell et al., 1982).

Coleoptilos: es una estructura característica del embrión de la familia de las gramíneas, el cual es, en realidad, una primera hoja modificada de tal modo que forma una caperuza cerrada sobre las hojas siguientes y el meristemo apical (Font P, 1982)

Crecimiento: aumento irreversible de volumen de una célula, tejido, órgano o individuo, generalmente acompañado de un aumento de masa. Para que exista crecimiento no basta con que se haya producido división celular, dado que la simple división de una célula no constituye un aumento de volumen o masa (Azul Courtis, 2014)

Des- diferenciacion: proceso por el cual células especializadas y con estabilidad fisiológica recuperan actividad meristemática, generalmente inducido por la acción de diferentes tipos de reguladores de crecimiento. (Strasburger, 1994).

Cultivo *in vitro*: es el conjunto de técnicas y métodos del cultivo de tejidos utilizados para obtener plantas asexualmente en forma rápida, eficiente, libres de enfermedades y en grandes cantidades (Ramos Amaya, 2012)

Organogénesis: La organogénesis es un evento morfo-genético que consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema, con el subsecuente desarrollo de un brote vegetativo. Existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno (Pérez Ponce, 1988).

Propagación: corresponde a un conjunto de procedimientos para incrementar la cantidad de plantas con el objeto de perpetuar individuos o grupos de ellos que tienen cierto valor. Las plantas se pueden propagar por distintos métodos, ya sea sexual o de reproducción, y asexual o de multiplicación (Pedroza-Manrique, 2006).

Protocolo: conjunto de procedimientos estandarizados para la propagación eficiente de células o tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. Permite cumplir con

los requisitos de calidad y control para asegurar los mismos resultados durante la repetición de sus procesos (Contreras et al., 2016)

Protocormo: estructura tuberosa que se forma la germinación de las semillas de orquídea y a partir de la cual se desarrolla una planta completa (Rincón y Chávez, 2006).

Reguladores de crecimiento: Son compuestos orgánicos sintetizados por plantas superiores y diversos microorganismos. Funcionan a manera de señales químicas que facilitan la comunicación entre células y coordinan sus actividades (Azcón-Bieto, 2008; Salisbury y Ross, 1994; Rodríguez *et al.*, 2009).

Rhizogenesis: Tipo de organogénesis por el cual sólo tiene lugar la formación de raíces adventicias en los tejidos del callo (Contreras et al., 2016). La rhizogénesis puede estar gobernada por: a) Hormonas o cofactores de enraizamiento (Hr.ss, 1961); b) Presencia o ausencia de inhibidores de enraizamiento (Barlow et al., 1961; COYAMA, 1962)

Simbionte: organismo que vive en simbiosis con otro organismo diferente (Rincón y Chávez, 2006)

Testa: Es la más externa de las dos capas que constituyen el episperma o tegumento que rodea a la semilla de las plantas espermatofitas (Font Quer P 1982).

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar el efecto del uso de dos reguladores de crecimiento (BAP - ANA) y nutrientes complejos jugo de piña y agua de coco, para la multiplicación de *Prosthechea sp.*, una orquídea que actualmente está sujeta a problemas por deforestación y saqueo ilegal por parte de los habitantes de la zona rural de San Rafael ubicada en la Agudita, corregimiento del municipio de Fusagasugá Cundinamarca.

Como alternativa para su propagación se establecieron directamente semillas de *Prosthechea sp.*, sobre los medio M y S (Murashige y Skoog, 1962), adicionalmente suplementado con nutrientes complejos (almidón 10 g.L⁻¹, coco 200ml/L y piña 200 ml/L). También se evaluaron los reguladores de crecimiento; ANA en concentraciones de (0,0, 0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹). BAP (0,0, 0.5, 1y2mg.L⁻¹).

Se utilizó un diseño completamente al azar –DCA- con un factorial 2x4x4+6, con38 tratamientos y 5 repeticiones, cada frasco de vidrio consistió en la unidad experimental.

El cultivo se realizó bajo condiciones *in vitro* durante 12 semanas; el mejor tratamiento para germinación fue T3, Medio MS con almidón (10g.L⁻¹), y aguade coco(200ml/L) con un 66%, seguido de T30, Medio MS con almidón(10g.L⁻¹), ANA(0,5mg.L⁻¹),con un 55%.El mejor tratamiento para formación de protocormos fue T3, Medio MS con almidón (10g.L⁻¹), y agua de coco(200ml/L) con un 76% . Seguido de T6, Medio MS con agua de coco (200ml/L) con un 69%. El T6 medio MS con agua de coco (200ml/L) presento la mejor respuesta para el desarrollo de rizoides obteniendo como resultado un 69,7%, al igual que el T24 Medio MS con almidón (10g.L⁻¹) y BAP(0,5mg.L⁻¹), que presenta un 57,3% del desarrollo de rizoides, respuesta significativa para esta etapa.

Palabras claves: Nutrientes complejos, *in vitro*, protocormos, ácido nafta acético, bencil amino purina.

ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of determining the effect of the use of two growth regulators (BAP - ANA) and complex nutrients pineapple juice and coconut water, for the multiplication of *Prosthechea* sp., An orchid that is currently Subject to problems by deforestation and illegal plunder by the inhabitants of the rural zone of San Rafael located in the Agudita, corregimiento of the municipality of Fusagasugá Cundinamarca.

As an alternative to propagation, *Prosthechea* sp. Seeds were grown directly on M and S mediums (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with complex nutrients (10 gL⁻¹ starch, 200 ml / L coconut and 200 ml / L pineapple). Growth regulators were also evaluated; ANA at concentrations of (0.0, 0.5, 1 and 2 mg.L⁻¹). BAP (0.0, 0.5, 1 and 2mg.L⁻¹).A completely randomized design -DCA- with a factorial 2x4x4 + 6 was used, with 38 treatments and 5 replicates, each glass bottle consisted of the experimental unit.

The culture was performed under in vitro conditions for 12 weeks; The best treatment for germination was T3, MS medium with starch (10g.L⁻¹), and coconut water (200ml / L) with 66%, followed by T30, MS Medium with starch (10g.L⁻¹), ANA (0.5mg.L⁻¹), with 55%. The best treatment for protocorms formation was T3, MS medium with starch (10g.L⁻¹), and coconut water (200ml / L) with a 76 %. Followed by T6, MS medium with coconut water (200ml / L) with 69%. The mean T6 MS with coconut water (200ml / L) presented the best response for the development of rhizoids resulting in 69.7%, as well as the T24 Medium MS with starch (10g.L⁻¹) and BAP (0.5mg.L⁻¹), which presents 57.3% of the rhizoid development, a significant response for this stage.

Key words: Complex nutrients, in vitro, protocorms, naphtha acetic acid, benzyl amino purine

INTRODUCCION

Es de resaltar que entre las plantas del reino vegetal, no hay duda que las orquídeas ocupan un lugar muy especial, no tanto por el valor económico, como otras plantas nutritivas o productoras de madera, si no por su valor ornamental. Se puede decir que las orquídeas en este aspecto son verdaderamente fascinantes. (p .e. Ortiz, 1976).

Colombia es un país biodiverso, en cultura, fauna y flora. Dentro de estos factores es importante destacar la gran diversidad de orquídeas nativas que encontramos. (Alrededor de 9000 especies entre los bosques húmedos de Ecuador y Colombia), sin embargo, cabe aclarar que a pesar de este aspecto, se reportan aproximadamente 3000 especies en peligro de extinción. (p. e. Pérez *et al.*, 2009).

En Colombia las orquídeas ocupan el poco honroso primer lugar como la familia de plantas con el mayor número de especies amenazadas de extinción (Calderón-Sáenz, 2007). Las especies de los bosques de niebla del país tienen doble riesgo debido a sus niveles elevados de endemismo y las altas tasas de conversión de sus ecosistemas a usos como la agricultura y la ganadería además se prevé que esta situación, ya difícil de las orquídeas de los bosques de niebla de Colombia, se agravará como consecuencia del calentamiento global (Jarvis, 2009).

Conforme a lo anteriormente mencionado, *La Orquídea Prosthechea sp.* es apetecida normalmente por el color y forma de sus flores, que llaman mucho la atención de las personas, las cuales han afectado su población a causa de la deforestación que se ha presentado paulatinamente en el municipio de Fusagasugá (Cundinamarca, Colombia) esta problemática se genera especialmente en las zonas rurales a causa de la extracción indiscriminada por parte de los pobladores. (Contreras et al., 2016).

Ante esta situación, es evidente la necesidad de conservación de orquídeas, en este caso del género *Prosthechea sp.* para lo cual se realizan diferentes actividades de laboratorio como lo es propagación *in vitro* teniendo en cuenta que es necesario conocer las diferentes concentraciones o cantidades adecuadas (reguladores de crecimiento, vitaminas, etc.), esto con el fin de producir más plántulas en menor tiempo posible, y también disminuir los costos de producción.

De manera tal que las medidas que se han generado para contrarrestar esta problemática y velar por la conservación de las mismas se encuentran los

programas de propagación artificial de especies en peligro de extinción (Arditti y Ernst., 1993).

De acuerdo a lo anteriormente mencionado el primer método para la germinación asimbiótica de orquídeas *in vitro* fue realizado por Knudson (1921), quien demostró que era posible la germinación de orquídeas sobre un medio simple que contuviera minerales y azúcares. De esta manera, contribuyó con la formulación de medios para la propagación *in vitro* de orquídeas sin necesidad de hongos micorrízicos (Salazar, 2012).

Por lo tanto la tecnología de cultivos vegetales ofrece una alternativa adecuada para facilitar los trabajos de multiplicación a gran escala y suplir los requerimientos necesarios para planes de conservación (Contreras et al., 2016).

De manera tal que las hormonas de crecimiento vegetal *in vitro* son usados para promover la división y diferenciación celular e inducir la formación de protocormos. Por tanto estos reguladores de crecimiento tienen la capacidad de producir un aumento y alargamiento celular. Dentro del cultivo *in vitro* de orquídeas los reguladores de crecimiento vegetal más utilizados son: BAP (bencil-amino purina) y ANA (ácido naftalenacético), el primero es una citoquina y la segunda una auxina.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la germinación asimbiótica de la especie nativa de la región del Sumapaz, *Prosthechea sp.* En el medio de cultivo MS con dos suplementos orgánicos (agua de coco y jugo de piña). Además, se determinó el efecto de dos reguladores de crecimiento (ANA Y BAP) en la germinación de las semillas estudiadas.

1. CARACTERIZACION DEL PROBLEMA

Las orquídeas a nivel mundial son conocidas como las flores más raras en el reino vegetal debido a su complejidad en la morfología y taxonomía de cada especie, dando como resultado la admiración y fascinación de cada una de ellas generando así sobreexplotación en el medio natural, afectando la conservación y preservación de estas plantas; llegando al punto de convertirse en un negocio muy lucrativo por su valor comercial para los recolectores.

Por lo tanto la propagación de la familia Orquidácea, se hace muy compleja y limitada debido a que posee diminutas semillas con un embrión simple carente de endospermo, lo cual dificulta su germinación *ex vitro*. Por tal motivo impide su comercialización a gran escala, motivo por el cual se extraen abruptamente del hábitat de desarrollo generando así un desequilibrio en el ecosistema. (De La Noval, et al., 1998).

La propagación *in vitro* a lo largo de los años aún es un proceso desconocido por muchas personas, lo cual conlleva a un desinterés en el tema o se tiene la creencia que este tipo de propagación es para empresas con cierta posición económica. La familia orquidácea ha sido catalogada como plantas de difícil cuidado, es por ello que el método de cultivo *in vitro* brinda los beneficios necesarios en la cultura de la conservación de las orquídeas silvestres, como por ejemplo la producción de protocormos la cual es una masa indiferenciada de células que se genera cuando la semilla germina en un medio de cultivo. (De La Noval, et al., 1998). Teniendo en cuenta esto genera gran importancia que cada protocolo o medio de cultivo que se vaya a utilizar debe ser único y específico para cada especie vegetal a trabajar en este caso el género *Prosthechea sp.*

Conforme a lo anteriormente descrito es importante conocer las cantidades adecuadas de los reguladores de crecimiento que se utilizarán en la etapa de germinación (ácido nafta acético ANA), (bencil amino purina BAP) y nutrientes complejos agua de coco y jugo de piña los cuales contribuirán en la etapa de desarrollo de las diferentes plántulas las cuales presenten una mejor calidad, un índice de germinación más eficaz y un costo de producción menor lo cual conlleva a una mayor producción para contribuir a la preservación del género *Prosthechea sp.*

2. JUSTIFICACIÓN

Prosthechea sp., una orquídea silvestre apetecida por el color y forma de sus flores que está desapareciendo paulatinamente del medio por causa de la deforestación y extracción por parte de la población de la zona rural del municipio de Fusagasugá (Contreras et al., 2016). Debido a lo mencionado anteriormente por estos autores las orquídeas merecen una atención para su conservación. Para ello es necesario acudir a técnicas que faciliten y ayuden a la propagación de estas especies. Así, para poder llevar a cabo esta labor de manera controlada el método más eficiente es el cultivo *in vitro*, el cual ha demostrado en las orquídeas una gran eficiencia en su germinación y desarrollo; por lo que se plantea en el presente proyecto la evaluación del uso de dos reguladores de crecimiento (BAP y ANA), a diferentes concentraciones, además el uso de nutrientes complejos (agua de coco, jugo de piña y almidón). Determinar el tipo y la cantidad adecuada de estas sustancias es una labor que se debe realizarse para cada especie, lo que resulta en una tarea ardua que necesita ser ampliada para cada uno de los individuos de la familia Orchidaceae catalogados en riesgo.

El uso específico de ácido naftalenacético y bencil amino purina en las etapas de germinación y desarrollo de las semillas en medio *in vitro*, permite aumentar la tasa de germinación y reducir el tiempo de desarrollo de los protocormos, cualidades buscadas para un eficiente método de propagación a gran escala (Rodríguez et al., 2009). Además el uso adecuado de nutrientes complejos favorecen un mayor crecimiento y desarrollo de algunas especies de orquídeas, como lo encontró (Kitsaki et al., 2004; Yam y Arditti, 2009; Yong et al., 2009). En *C mendelii*, estos autores dicen que tanto el agua de coco como el jugo de piña contienen altos niveles de vitaminas, aminoácidos y fitohormonas y son muy energéticos. Por esto se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de *cultivo in vitro* (Arditti, 1993).

La propagación y cultivo de las orquídeas fue revolucionado después del descubrimiento de Knudson (1922) en donde las semillas pudieron ser germinadas en un medio simple con azúcar. Este trabajo demostró que la germinación de semillas de orquídeas en condiciones *in vitro* fue posible sin la asociación con hongos. Posteriormente, el mismo autor propuso una nueva solución con la adición de nutrientes para la germinación de semillas de orquídeas en 1946. (Martin KP, 2003).

Las aplicaciones son extensas del cultivo *in vitro* de orquídeas, permite la propagación masiva de plantas, especialmente de difícil propagación o en vías de extinción; clonación de individuos de características agronómicas muy deseables

durante todo el año; obtención de plantas libres de virus; conservación de germoplasmas; producción de nuevos híbridos; mejora genética de plantas; germinación de semillas. (Soto, 1993).

3. OBJETIVOS

3.2 GENERAL

Evaluar el efecto del uso de dos reguladores de crecimiento (BAP y ANA) y nutrientes complejos en la germinación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea sp*

3.3 ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de uso de diferentes concentraciones de ANA sobre la germinación *in vitro* de *Prosthechea sp*.
2. Evaluar el efecto de uso de diferentes concentraciones de BAP sobre la germinación *in vitro* de *Prosthechea sp*.
3. Evaluar el efecto de uso de nutrientes complejos (almidón, jugo de piña y agua de coco) sobre la germinación *in vitro* de *Prosthechea sp*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. BIOLOGÍA DE LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE ORQUÍDEA

Las orquídeas se caracterizan por poseer semillas muy pequeñas y numerosas, comúnmente llamadas semillas polvo, de considerable variación, estas poseen escasa reserva de nutrientes para germinar (Arditti y Ghani, 2000).

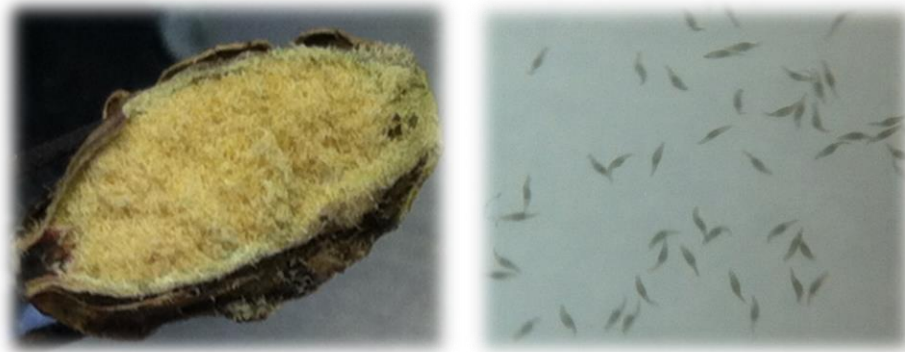


Figura 1. Morfología de la semilla de *Prosthechea* sp.

Fuente: Orjuela y Deaza, 2015.

Estas semillas están formadas por un embrión de pocas células, (entre 100 y 200), cubiertas por una testa muy dura (Mitchell 1989). El número de semillas puede variar de 13.000 a 4.000.000 por cápsula. El rango de peso de una semilla de orquídea varía de 0,3 a 14 μg y miden de 0,25 a 1,2 mm de largo y 0,009 a 0,27 mm de ancho (Arditti y Ghani, 2000).

En condiciones naturales las semillas requieren necesariamente la presencia e infección de un hongo simbiote que le proporcione una fuente de carbohidratos y nutrientes necesarios para el proceso de germinación (Barba *et al.*, 2001). Este hongo ayuda a las plántulas jóvenes de orquídeas a sobrevivir en campo con reservas alimenticias limitadas; el hongo actúa a manera de “endospermo” exógeno ya que aporta los nutrientes necesarios en los primeros estadios de la germinación. (Rasmussen, 1995, 2002).

La interacción micorrízica-orquídeas es un tema de estudio en el ámbito mundial (Clements, 1987). Algunos autores afirman que en este sentido existen orquídeas generalistas (Curtis, 1939; Hadley, 1970; Masuhara *et al.*, 1993) y otros, argumentan que son específicas (Clements, 1988; McKendrick *et al.*, 2002). No obstante, algunos estudios como los de Taylor y Bruns (1997) demostraron que

algunas orquídeas, generalmente las epífitas, son específicas en su interacción micorrízica. La especificidad del hongo micorrízico en orquídeas epífitas tropicales puede ser variable (Otero et al., 2002; 2004; 2007)

En la germinación de *Prosthechea sp.* Puede tardar unos pocos días a varios meses. La germinación se inicia con la imbibición de agua por semilla, para luego germinar al romper la testa de la semilla. La semilla empieza a cambiar de color amarillo a verde cuando empieza a realizar fotosíntesis, con la presencia de luz. Forma una pequeña esfera de células verdes que se llama protocormo. Una vez el protocormo crece se observa el desarrollo de pelos radicales y posteriormente el brote con la aparición de las hojas. (Roy et al., 2011).

De acuerdo con Pierik (1990) la germinación de las semillas de orquídeas tiene lugar de la siguiente forma: el embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen. Después se inicia la división celular, rompiendo el embrión la cubierta seminal. A continuación se forma una estructura de tipo protocormo a partir del agregado de células y sobre aquel puede distinguirse un meristemo del vástago. Tan pronto como se inicia la diferenciación de órganos (meristemo del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comienza un periodo de crecimiento intenso. Si el protocormo está a la luz adquiere un color verde y al mismo tiempo se desarrollan hojas. Como resultado de la producción de la clorofila la planta se hace autótrofa. Más tarde las primeras raíces auténticas se forman endógenamente; el protocormo y los rizoides (pelos radicales) pierden su misión nutritiva y desaparecen.

Durante la germinación el embrión aumenta su volumen para llenar el espacio interior de la testa hasta romperla y emerger fase 1. A continuación se forma una estructura tuberizada (o masas de células indiferenciadas) llamada protocormo, con apariencia esférica ovoide y de color verde (fase 2). Generalmente posee micorriza sobre la cual, eventualmente, se desarrollarán los primordios caulinares y radicales (fases 3 y 4) (Ávila-Díaz et al., 2009).

El proceso de germinación ha sido dividido en categorías de acuerdo a los estados de desarrollo del embrión. En la (figura 2) se presenta la escala fenológica con 6 diferentes estados de desarrollo que fue adoptado para este trabajo. Basados en experimentos sobre *Orchiscoriophora L.*, *Prosthechea vespa* Vell (Yamazaki y Kazumitsu, 2006). Y *Sobraliak lotzcheana* Rchb.f. (Jhonson y Kane, 2007). En éstos, los autores han adoptado esta escala con algunas modificaciones.

Los tiempos estimados para cada fase bajo condiciones *in vitro* es una cuestión incierta, debido a que varían de acuerdo al medio de cultivo, la especie y

condiciones ambientales. Durante la germinación el embrión inicialmente se hincha hasta llenar el espacio interior de la testa hasta romperlo y así emerger.

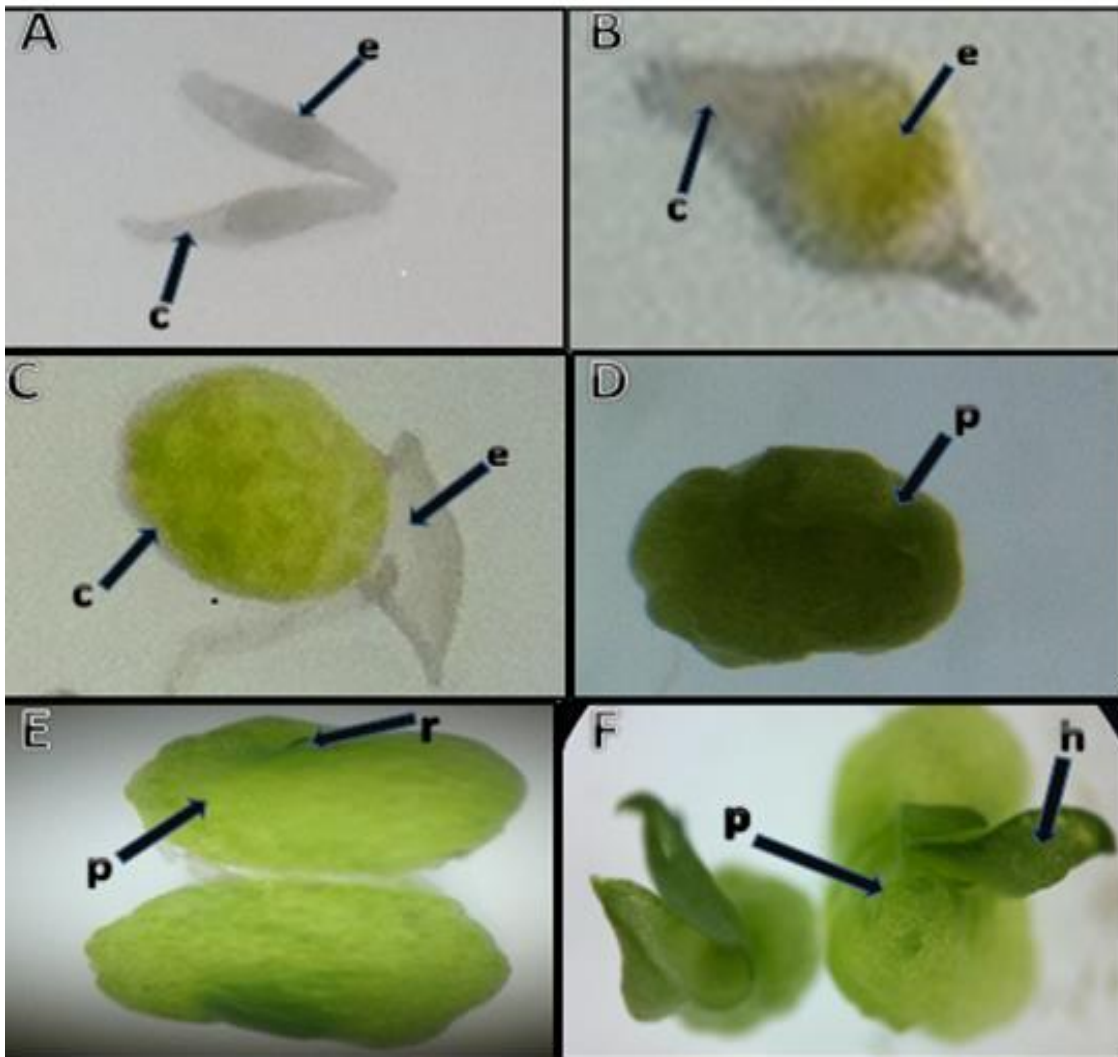


Figura 2. Etapas del desarrollo de *P Prosthechea* sp. A) Etapa 0: Semillas no germinadas. (B) Etapa 1: inicio de germinación. (C) Etapa 2: inicio de protocormo (D) Etapa 3: protocormos (E) Etapa 4: Desarrollo de rizoides (F) Etapa 5: Formación de hojas. (Rodríguez F, 2000).

c: cubierta de la semilla; **e:** embrión; **h:** hoja; **p:** protocormo; **r:** rizoide.

Fuente: Deaza y Orjuela, 2016.

El protocormo es una estructura organógena particular que procede del embrión, compuesta generalmente de una yema terminal y una corona de rizoides (Saiprasad y Polisetty, 2003). El cuerpo consiste de largas células parenquimáticas que acumulan sustancias de almacenamiento (Chugh et al., 2009). Las raíces, siempre adventicias, se forman más tardíamente en la base de

los nudos de los tallos con hojas. El protocormo está recubierto de una epidermis que puede llegar a producir otros protocormos por gemación adventicia a partir de los tejidos superficiales (Margara, 1988).

El protocormo puede continuar creciendo durante semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie, hasta alcanzar la edad apropiada para producir raíces y hojas; el abastecimiento por parte del hongo de los azúcares y nutrientes necesarios cesa en el momento en el que la planta joven tiene la capacidad de producirlos por sí misma (McKendrick, 2000). Esto indica que el protocormo tiene la función de actuar como un órgano de almacenamiento de nutrientes que más adelante permite la aparición de los brotes foliares y radicales (Pedroza-Manrique & Alonso, 2009).

La emergencia de los protocormos en la ontogénesis de las orquídeas puede ser considerado como un paso necesario en la transición de la reproducción sexual a la asexual, presente de manera exclusiva en este grupo de plantas (Mahendran y Narmatha, 2012). Debido a esta facilidad, los protocormos se han utilizado como explantes en trabajos de embriogénesis somática y organogénesis directa e indirecta, cuyas técnicas son aplicadas ampliamente en la micropropagación vegetativa (Tuong et al., 2004)

Estas estructuras poseen un alto grado de totipotencialidad, por lo que se puede inducir la brotación múltiple obteniendo varias plantas que se generan a partir de un sola semilla con un alto grado de estabilidad genética, estos brotes esféricos nuevos son llamados PLBs (Protocorm-likeBodies por sus siglas en inglés).La inducción de estos brotes se obtiene agregando un regulador de crecimiento en diversas concentraciones ya sean auxinas o citoquininas. Esta técnica está justificada en especies amenazadas con restringido material para ser propagadas, como la especie en estudio. (ERNST, R. 1993).

4.2 FUNDAMENTOS DE LA GERMINACIÓN DE ORQUÍDEAS *IN VITRO*

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

Para que la germinación se lleve a cabo, tres condiciones deben cumplirse: primero, la semilla debe ser viable; segundo, la semilla debe estar bajo adecuadas condiciones ambientales; tercero, cualquier condición de dormancia debe ser superado, causado por reguladores de crecimiento que inhiben la germinación o poseer embriones inmaduros (Pedroza Manrique et al., 2005).

De tal manera que la propagación natural de las orquídeas se dificulta porque sus semillas son diminutas y carecen de endospermo. Por esta razón, requieren de una relación obligada con hongos micorrízicos que permita la germinación de las semillas (Arditti, 1984). Por esta razón se ha demostrado en experimentos sobre *Cattleya shoroederae* Rchb.f. x *Cattleya gigas* Rchb.f. (1918) y *Cattleya labiata* Lindl. X *Cattleya aurea* Lindl. (1919) condujeron a Lewis Knudson afirmar que estas semillas pueden germinar sin el hongo si se usan cierto tipo de azúcares simples y nutrientes en el medio de cultivo. De acuerdo a lo mencionado anteriormente se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in vitro* (Arditti y Ernst, 1993; Serna, 1999; Mckendrick, 2000; Cavalcante et al., 2001; Damon et al., 2004; Pedroza et al., 2005; Yamazaki y Kasumitsu, 2006; Pedroza y Mican, 2006; Haddix et al., 2006; Steele, 2007). De esta manera la germinación asimbiótica de semillas en medios artificiales es una manera simple de conservar diferentes especies de orquídeas; por lo tanto existen varios métodos de conservación mediante micropropagación (Shimasaki y Uemoto, 1991; Arditti y Ernst 1993; Latha y Seení, 1994; Nayak et al., 1998; Murthy y Pyati, 2001; Chen et al., 2002; Park et al., 2002; Pyati et al., 2002). Una de las cuestiones básicas de la siembra asimbiótica es la desinfección adecuada de frutos y semillas para lograr cultivos libres de contaminación (Billard et al., 2012).

4.3. EL MEDIO DE CULTIVO: MURASHIGE & SKOOG (MS)

Para orquídeas es muy común la utilización del medio nutritivo *Murashige & Skoog* (MS), formulados por los científicos Folke Skoog y Toshio Murashige en 1962. Este medio proporciona los nutrientes esenciales a las semillas con el objeto de desplazar el papel del hongo en la simbiosis (Roca et al., 1991). Por esta razón se eligió el medio Murashige y Skoog (1962) debido a que contiene una formulación básica que sirve de fuente de nutrientes a gran variedad de plantas, además es usado en el cultivo de helechos, los cuales se relacionan un poco con los briófitos, aunque este medio tiene un contenido elevado de sales (Hurtado y Merino, 1987; Pierik, 1990). Los 17 nutrientes esenciales para la mayoría de plantas, incluyendo los briófitos, se encuentran en estos medios de cultivo, tanto los micronutrientes como los macronutrientes (Taiz y Zeiger, 1998; Jaques, 1998; Glime, 2006).

Tabla 1. Formulación del medio basal Murashige & Skoog (MS).

Nutrientes	mg.L ⁻¹	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20.6
KNO ₃	1900	18.8
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	3.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1.5
KH ₂ PO ₄	170	1.25
KL	0.83	5.0
H ₃ BO ₃	6.2	100
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	30
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.0
O		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.1
Na ₂ EDTA	37.3	100
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	100
Sacarosa (g)	30	...
Ph	5.7	...

Fuente: Roca *et al*, 1991; Sultana *et al*, 2012

Al medio MS se le atribuye altos contenidos de nitrógeno en forma de NH₄⁺ y NO₃⁻ y de K⁺ respecto a otros medios utilizados en el cultivo de tejidos (Bhojwani, 1996). Se ha encontrado que altos contenidos de N y K favorece la germinación

en orquídeas y el cultivo de embriones (Contreras y Gutiérrez, 2012). Murashige determinó que el nitrógeno en particular mejoró el crecimiento en tabaco (Murashige y Skoog, 1962).

Hay un efecto indirecto entre el pH y el tipo de N en el crecimiento de tejidos; medios con pH por debajo de 5.0 toman nitratos y en pH de 5.0 a 5.5 los callos tienen preferencia por amonio o nitratos. Por otro lado, El potasio es necesario para la división celular, para la síntesis de proteínas, clorofila y para la reducción de nitratos. Los niveles de K⁺ *in vitro* raramente son problema pero ciertas especies son sensibles a altos niveles (Bhojwani, 1996).

Sacarosa. Es la fuente de carbono que aporta a las semillas las moléculas de carbono y energía para varias actividades metabólicas. La aplicación de carbohidratos como la sacarosa permite que las semillas de las orquídeas germinen con relativa facilidad casi en un 100%, lo cual no sucede en la naturaleza. Será el componente del medio que tomarán las células para formar otras moléculas orgánicas requeridas para su desarrollo (Barba *et al.*, 2001).

En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos, pero valores superiores al 10 % (p/v) pueden producir represión por catabolitos (Ertola *et al.*, 1994).

4.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas, son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que actúan a muy bajas concentraciones en sitios distantes de donde son producidos, interviniendo en muchos procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo y la caída de hojas (Purves *et al.*, 2002; Salisbury, 1994).

También en la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y que determinan el crecimiento relativo de todos los órganos (Azcón- Bieto, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009).

Existen siete clases de reguladores de crecimiento vegetal entre los cuales se encuentran auxinas, giberelinas, citoquininas, , ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico,, las cuales participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta (Kende & Zeevaart, 1997; Tanimoto, 2005).

Los reguladores de crecimiento vegetal, actúan de uno u otro modo en todos los procesos de desarrollo, estos fenómenos de regulación pueden clasificarse de acuerdo con Rojas & Ramírez, 1993 en:

1. De correlación, como multiplicación y alargamiento celular, dominancia apical, actividad de las yemas, letargo y abscisión de órganos.
2. De sensibilidad o movimiento como los tropismos y nastias.
3. De reproducción como floración, polinización y desarrollo del fruto.

4.4.1 Auxinas

Charles Darwin, en su libro *el Poder de Movimiento en las Plantas*, pone de manifiesto la actividad de una sustancia con capacidad para inducir el movimiento frente a una fuente de luz en coleoptilos de *Phalariscanariensis* (alpiste), en donde posteriormente fue identificada como auxina (Arteca, 1996). Desde ese entonces han sido ampliamente estudiadas y juegan un papel central en la regulación del crecimiento de las raíces, promueven la elongación del tallo e inhiben el crecimiento de brotes laterales manteniendo la dominancia apical (Salisbury, 1994). En cultivo de tejidos han sido usados para división celular y diferenciación radical; también promueve la formación de callo y junto con las citoquininas son empleadas en la diferenciación de yemas y raíces. En bajas concentraciones predomina la formación de raíces mientras que con altas las reprime, y tiene lugar la callogénesis. (Bhojwani, 1996). En plantas recién germinadas estimula la formación de raíces. (Azcon-Bieto y Talón, 2008; Montaldi, 1995).

Las auxinas son ampliamente utilizadas en trabajos de micropropagación y son incorporadas al medio nutritivo para promover el crecimiento de callo, suspensiones celulares u órganos y para regular la morfogénesis, conjuntamente con las citocininas. La respuesta del explante a la adición de auxinas a utilizar y la concentración requerida dependerá de

- El tipo de crecimiento o desarrollo requerido.
- La capacidad de los tejidos cultivados para sintetizar auxina en forma natural.
- La interacción (si hay) entre las auxinas sintéticas aplicada y las hormonas endógenas naturales (Amador, D. 1999).

4.4.2 Citoquininas.

Las citoquininas son un grupo de fitohormonas que regulan la división celular y la diferenciación en tejidos vegetales, participan en el control del desarrollo y la

senescencia. Además promueven la división celular, formación y actividad de brotes meristemáticos, inducción y expresión de genes de la fotosíntesis, senescencia foliar, movilización de nutrientes, germinación de semillas, crecimiento radical y respuesta al estrés (Yong et al., 2009).

En 1892, Wiesner y un poco más tarde, Haberland (1913) propusieron que existen hormonas que estimulan la división celular. Sin embargo, hasta en (1955) Miller *et al.* Aislaron de tejidos animales el compuesto que estimulaba fuertemente las divisiones celulares en las plantas. La estructura de este compuesto se identificó y la sustancia se le nombró cinetina.

4.5. SUPLEMENTOS

Los suplementos orgánicos que principalmente son ricos en carbohidratos, entre otros. Los principales son: el hidróxido proteico de caseína, lacto-albúmina, peptona y triptona que se emplean principalmente como fuente de aminoácidos. El jugo de naranja contribuye con el ácido cítrico, así como con otros estimulantes del crecimiento.

Al medio MS (base) se puede enriquecer con otras sustancias más complejas que permita promover el crecimiento de ciertos callos y órganos. Sin embargo, el uso de extractos naturales, especialmente provenientes de frutas, podría afectar la reproductibilidad de los resultados porque la cantidad y calidad de los constituyentes varían con la edad del tejido (maduración) e incluso con la variedad del organismo donador. (Contreras y Gutiérrez 2012)

En la actualidad es posible preparar medios de cultivo sustituyendo las sales minerales y los reguladores de crecimiento por suplementos orgánicos que fácilmente encontramos en nuestro alrededor, como el guineo, puré de papa o extracto de papa, el plátano o harina de plátano verde, agua de coco, etc., que aportan los nutrientes principales para la germinación del embrión y el desarrollo de la planta de orquídea. Al medio se debe agregar agar, para que mantenga sólido al medio aun a temperaturas del ambiente. Generalmente estos medios presentan un pH de 5,6; sin embargo, si no se encuentra en este pH es fácil regularlo, ya sea con un ácido o con una base (sal) e incluso con gotas de limón o sal de mesa, según sea el caso (Morales Benavent, 2011).

Actualmente, amantes de las orquídeas producen sus propias plantas en laboratorios caseros a partir de germinación asimbiótica vitro, y para ello utilizan medios de cultivo constitución orgánica (Silva et al., 2002). Entre los extractos naturales utilizados en el cultivo de semillas de orquídeas, se pueden encontrar la pulpa homogeneizada banano, agua de coco, peptona, triptona, levadura, hidrolizado de caseína, jugo de tomate, jugo de piña y extracto de papa (Torres et

al. , 2001). Estos aditivos contienen mezclas de vitaminas y aminoácidos y algunos actúan como reguladores del crecimiento (Pierik, 1989).

4.5.1. Fécula de maíz. Este componente aporta nutrientes a la semilla, principalmente glutamina que es necesaria para el crecimiento de embriones inmaduros; ésta es una fuente importante de nitrógeno (Pedroza-Manrique, et al. 2010). Es uno de los pocos aminoácidos que posee en su estructura dos átomos de nitrógeno, ambos en forma de amino (NH₂-). Este es una forma del “nitrógeno orgánico” reducido, que posteriormente se transfiere a otros compuestos carbonados para producir los aminoácidos que utiliza la planta para sintetizar la moléculas nitrogenadas (p. ej., proteínas y nucleótidos) (McKee et al., 2003).

Se ha probado que la implementación de almidones o gomas como agentes gelificantes alternativos permite la disminución en los costos de los medios de cultivo para tejido *in vitro* de hasta el 70% comparados con los del agar, fisiológicamente hablando los mejores resultados se obtienen en las sustituciones parciales que se han estudiado (Martín-Gordo et al. 2012; Mengesha et al., 2012).



Figura 3. Medio M y S, suplementado con fécula de maíz

Fuente: Deaza y Orjuela 2015

4.5.2. Agua de coco. Es ampliamente usado en la industria de cultivos vegetales, como un promotor de crecimiento en los medios de cultivo. Aunque no es extensivamente usado en la germinación de semillas de orquídeas (Arditti, 2008)

El efecto del medio de cultivo MS, se potencializa utilizando aditivos orgánicos en el medio de cultivo. (Kitsuki et al., 2004) informaron que el medio de cultivo suplementado con agua de coco, resulta más eficaz para la germinación y formación de protocormos, a diferencia de otros medios de cultivo suplementados. Parece tener propiedades como regulador de crecimiento, ya que posee Auxinas, Giberelinas y en mayor grado Citoquininas. Posee iones

inorgánicos, vitaminas (B6 y B9) y otras sustancias relacionadas como hexitol. Algunos de estos son compuestos biológicamente activos como L-arginina, ácido ascórbico y magnesio. Tiene alto contenido de potasio y antioxidantes.

(Nigrum et al. 2007) y (Abbas et al. 2011) encontraron que la adición del agua de coco al medio de cultivo tuvo un efecto benéfico en la germinación y formación de plántulas de *Coelogyne ovalis* y *Grammatophyllum scriptum* respectivamente

El agua de coco, en general 3 a 15% (v / v) y el aditivo que más se ha utilizado para un número de especies *in vitro*, no sólo para estimular el crecimiento de callo, sino también para aumentar la formación embriogénesis somática, inducir la división de granos de polen, y en su primera aplicación, en la inducción del desarrollo de embriones inmaduros (Caldas et al., 1998). Knudson (1922) observó que la sacarosa, la fructosa y otros complejos 231 Quelato de hierro y agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae), químicos de extractos vegetales, favorecen la germinación y promueven el desarrollo de los protocormos. El endospermo líquido de la semilla de coco se ha usado a varias concentraciones y varias especies establecidas *in vitro*, incluyendo las orquídeas, ya que contiene vitaminas, enzimas, azúcares, fuentes nitrogenadas, reguladores de crecimiento y una fracción de sales inorgánicas (Hicks, 2007). Los efectos promotores del agua de coco se deben a la presencia de compuestos orgánicos como citoquininas, zeatinas, kinetinas y purinas, que se consideran promotores del crecimiento vegetal (Yong et al., 2009; Hicks, 2007). Las citoquininas juegan un papel fundamental en la organogénesis vegetal, ya que inducen la formación de hojas y brotes y aumentan la velocidad de desarrollo y la germinación de la semilla (Werner et al., 2001; Huan et al., 2004)

4.5.3. Jugo de piña. Se encontró que el medio de cultivo suplementado con jugo de piña, un tiene efecto en las fases del desarrollo en las especies trabajadas con diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, se puede inferir que la adición adecuada de componentes orgánicos, como agua de coco y jugo de piña al medio de cultivo MS *in vitro*, es un elemento importante para la germinación y desarrollo de plántulas, debido a que son ricos en energía y contienen iones inorgánicos, aminoácidos, vitaminas, reguladores de crecimiento y ácidos orgánicos necesarias para el desarrollo de las semillas de orquídeas (Kurosaki et al., 2004, Young et al., 2009; Abbas et al., 2011).

Cabe anotar que tanto el agua de coco, el jugo de piña y el almidón contienen altos niveles de vitaminas, aminoácidos y fitohormonas y son muy energéticos (Kitsaki *et al.*, 2004; Yam y Arditti, 2009; Yong *et al.*, 2009).

4.6 MARCO DE ANTECEDENTES

“Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de Phalaenopsis (Orchidaceae)

En esta investigación se determinó el medio de cultivo más apropiado para la germinación in vitro de un híbrido de Phalaenopsis. Inicialmente se evaluó la viabilidad de las semillas utilizando la prueba de tetrazolio (TZ). Las semillas se desinfectaron y se cultivaron aplicando el método de la jeringuilla. El porcentaje de viabilidad en promedio fue de 92,2 % ($P \leq 0,05$: Tukey HSD), con un porcentaje de germinación entre todos los medios de 95,1 % ($P \leq 0,05$: Tukey HSD). El medio de cultivo más eficiente para la germinación de híbridos de Phalaenopsis a las 18 semanas de cultivo fue el Murashige & Skoog (MS) suplementado con agua de coco, y jugo de piña con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$: Tukey HSD), con respecto a los demás medios de cultivo, contribuyendo de esta manera al uso de componentes orgánicos con el fin de mejorar la germinación y desarrollo de Phalaenopsis”.

“Propagación in vitro de la orquídea Prosthechea citrina (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México

Prosthechea citrina es una orquídea sujeta a protección especial debido a que presenta diversas problemáticas en su hábitat natural que inciden negativamente en su viabilidad biológica, como son el deterioro y la modificación de su entorno y la extracción de plantas. En el presente estudio se reporta la propagación masiva de P. citrina in vitro, esto mediante protocormos así cultivados en medio Murashige y Skoog (1962) MS con reguladores de crecimiento vegetal. La eficiencia observada en nuevos brotes fue de 6.75 por explante, no hubo diferencias significativas en número de hojas y raíces, la longitud máxima de hoja fue de 20.6 mm y la de raíces fue de 38.27 mm. En aclimatación se observó una supervivencia de 85%.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. METODOLOGÍA

5.1.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo en laboratorio se llevó a cabo en la Universidad de Cundinamarca en el laboratorio de cultivo de tejidos (figura 4.) entre el segundo periodo de 2015 y primer periodo de 2016. Las instalaciones cuentan con áreas especializadas e independientes que se recomiendan para garantizar el espacio adecuado y condiciones de asepsia. Entre éstas están: cámara de flujo laminar, área de preparación de medios, lavado y esterilización, de transferencia y área de crecimiento o incubación.



a) Estantes con todos los tratamientos



b) Laboratorio

Figura 4. Laboratorio de microbiología de la Universidad de Cundinamarca

Fuente: Deaza y Orjuela 2015.

5.1.2. MATERIAL VEGETAL Y PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN

- Obtención del material vegetal y esterilización

En la reserva natural de San Rafael, ubicada al nororiente del casco urbano de Fusagasugá, sobre la vía Fusagasugá Síbate, se ubicó una población de plantas del genero *Prosthechea*. Sobre arboles de caucho (*Ficus sp*). De esta población se obtienen 8 cápsulas con una madurez avanzada de *Prosthechea sp* con un diámetro entre dos y tres centímetros (figura 5).



Figura 5. Capsulas de *Prosthechea sp* con madurez avanzada, sobre arboles de caucho (*Ficus sp*).

Fuente: Juan Camilo franco, 2016.

Posteriormente las capsulas de *Prosthechea sp*. Fueron llevadas al laboratorio de microbiología de la Universidad de Cundinamarca, fueron lavadas superficialmente con abundante agua y jabón. Luego se sumergieron durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Se lavó dos veces con agua esterilizada para luego sumergir nuevamente en alcohol al 70% por 1 minuto. Ya dentro de la cámara de flujo laminar se dejaron escurrir sobre servilletas estériles y finalmente flameadas con el mechero de *Bunsen*.

Para extraer la semilla se hizo un corte longitudinal en la cápsula con la ayuda de pinzas y bisturí previamente esterilizados. La semilla (de tipo polvoso) fue esparcida sobre la superficie de medio MS suplementado con los diferentes tratamientos en frascos de vidrio 250 ml (figura 6).



Figura 6. Corte de la capsula y esparción de las semillas de *Prosthechea sp.*

Fuente: Deaza y Orjuela, 2016.

- Medio de germinación, formación de Protocormos y rizoides

Se utilizó como medio de germinación, iniciación y desarrollo de protocormos el medio desarrollado por Murashige & Skoog (1962) suplementado con diferentes concentraciones de ANA (0,0, 0,5, 1 y 2 mg.L⁻¹) y ó BAP (0,0 0,5, 1,0 y 2,0 mg.L⁻¹) y o nutrientes complejos (Almidón, agua de coco y jugo de piña). Cuando se utilizó almidón se usó a una concentración de 10 gr.l⁻¹, El agua de coco y el jugo de piña se utilizaron a una concentración de 200 ml.l⁻¹. Los medios obtenidos fueron ajustados a un pH de 5.8.

5.2.3. El experimento

- Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar –DCA- con un factorial 2x4x4+6, con 38 tratamientos (Tabla 2) y 5 repeticiones, cada frasco de vidrio de 250 ml consistió en la unidad experimental. Los factores del factorial fueron: 1) El uso o no de almidón, 2) La concentración de BAP (0,0, 0.5, 1 y 2 mg.l⁻¹) y 3) La concentración de ANA (0,0, 0.5, 1 y 2 mg.l⁻¹). Se utilizan como tratamientos adicionales los suplementos complejos (almidón, coco, piña), con el fin de evaluar el efecto de estos en la germinación y formación de protocormos y desarrollo de rizoides en *Prosthechea sp.*

Tabla 2. Claves y tratamientos, medio M y S con suplementos orgánicos y hormonas sintéticas.

Clave	Tratamientos
T1	M y S (Murashige and Skoog, 1962)
T2	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹)
T3	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), agua de coco(200mL/L)
T4	Medio M y S con almidón(10g.L ⁻¹), agua de coco(200mL/L), jugo de piña (200mL/L)
T5	Medio M y S con almidón(10g.L ⁻¹), jugo de piña (200mL/L)
T6	Medio M y S con agua de coco (200mL/L)
T7	Medio M y S con jugo de piña (200mL/L) y agua de coco(200mL/L)
T8	Medio M y S con jugo de piña (200mL/L)
T9	Medio M y S con BAP(0,5mg.L ⁻¹)
T10	Medio M y S con BAP(1mg.L ⁻¹)
T11	Medio M y S con BAP(2mg.L ⁻¹)
T12	Medio M y S con ANA(0,5mg.L ⁻¹)
T13	Medio M y S con ANA(0,5mg.L ⁻¹) y BAP(0,5mg.L ⁻¹)
T14	Medio M y S con ANA(0,5mg.L ⁻¹) y BAP(1mg.L ⁻¹)
T15	Medio M y S con ANA(0,5mg.L ⁻¹) y BAP(2mg.L ⁻¹)
T16	Medio M y S con ANA(1mg.L ⁻¹)
T17	Medio M y S con ANA(1mg.L ⁻¹) y BAP(0,5mg.L ⁻¹)
T18	Medio M y S con ANA(1mg.L ⁻¹) y BAP(1mg.L ⁻¹)
T19	Medio M y S con ANA(2mg.L ⁻¹)
T20	Medio M y S con ANA(2mg.L ⁻¹) y BAP(0,5mg.L ⁻¹)
T21	Medio M y S con ANA(2mg.L ⁻¹) y BAP(1mg.L ⁻¹)
T22	Medio M y S con ANA(2mg.L ⁻¹) y BAP(2mg.L ⁻¹)
T23	Medio M y S con ANA(1mg.L ⁻¹) y BAP(2mg.L ⁻¹)
T24	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹) y BAP(0,5mg.L ⁻¹)
T25	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹) y BAP(1mg.L ⁻¹)
T26	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹) y BAP(2mg.L ⁻¹)
T27	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹) y ANA(0,5mg.L ⁻¹)
T28	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(0,5mg.L ⁻¹), BAP(0,5mg.L ⁻¹)
T29	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(0,5mg.L ⁻¹), BAP(1mg.L ⁻¹)
T30	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(0,5mg.L ⁻¹), BAP(2mg.L ⁻¹)
T31	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹) y ANA(1mg.L ⁻¹)
T32	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(1mg.L ⁻¹), BAP(0,5mg.L ⁻¹)
T33	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(1mg.L ⁻¹), BAP(1mg.L ⁻¹)
T34	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(1mg.L ⁻¹), BAP(2mg.L ⁻¹)
T35	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹) y ANA(2mg.L ⁻¹)
T36	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(2mg.L ⁻¹), BAP(0,5mg.L ⁻¹)
T37	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(2mg.L ⁻¹), BAP(1mg.L ⁻¹)
T38	Medio M y S con almidón (10g.L ⁻¹), ANA(2mg.L ⁻¹), BAP(2mg.L ⁻¹)

- Evaluación.

Cada 8 días se observan bajo estereoscopio tres unidades experimentales (frascos). En cada uno de los ellas se evaluó la mitad del área de la base del frasco observando las siguientes variables:

- El número de semillas.
- El número de semillas germinadas.
- El número de protocormos formados.
- El número de protocormos con rizoides formados.
- El número de semillas no germinadas.

En base a los datos obtenidos se obtienen los porcentajes de germinación, formación de protocormos y desarrollo de rizoides de acuerdo con las siguientes formulas.

- $\% \text{ de Germinación} = \frac{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas}}{N^{\circ} \text{ total de individuos evaluados}}$

- $\% \text{ de protocormos} = \frac{N^{\circ} \text{ de protocormos formados}}{N^{\circ} \text{ total de individuos evaluados}}$

- $\% \text{ de rizoides} = \frac{N^{\circ} \text{ de rizoides desarrollados}}{N^{\circ} \text{ total de individuos evaluados}}$

5.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos registrados fueron sometidos a un análisis de varianza –ANOVA- pruebas de diferencias de medias (Diferencias mínimas significativas) utilizando el programa Infostat versión estudiantil.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 EFECTO DE NUTRIENTES COMPLEJOS (JUGO DE PIÑA, AGUA DE COCO Y ALMIDÓN), BAP Y ANA SOBRE LA GERMINACIÓN.

Para la fase de germinación se evaluó a partir de la primera semana, después de la siembra de las semillas de *Prosthechea sp.*,. Hasta la semana siete.

El medio MS es ampliamente utilizado para diversas especies de orquídeas en diferentes proporciones y suplementado con reguladores de crecimiento vegetal y otras sustancias como el agua de coco, jugo de piña, almidón, con lo que se han obtenido resultados favorables. Casos similares se han reportado con *P. citrina*, en el cual se obtuvo un promedio de 6.75% de germinación. Estudio realizado por Salazar et al., (2013). Evaluaron diferentes medios de cultivo *in vitro* suplementados con agua de coco y jugo de piña, demostrando ser igualmente favorables para el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis*. Obteniendo porcentajes de germinación de 95 y 96%, al adicionar estos nutrientes complejos.

Para los tratamientos que tienen fitohormonas como el BAP y ANA, adicionalmente en interacción con almidón, presentan efectos favorables y con porcentajes de germinación adecuados. Ya que Arditti (1992), informa que los porcentajes de germinación de orquídeas epifitas tropicales alcanzados sobre un medio asimbiótico son mayores a 50%. Además en la regeneración *in vitro* de *Oncidium sp* (Kalimuthu et al., 2007) adicionaron con 2.0 mg.L⁻¹ de BAP al medio MS obteniendo una reproducción satisfactoria. El efecto de ANA para la fase de germinación, probablemente no es favorable por que el ácido α -naftalenacético, una auxina sintética, se utiliza ampliamente para estimular la formación de raíces adventicias. (Ikuma y Thimann, 1963; Metzger, 1983; Karssen et al., 1989; Derkx y Karssen, 1993a; Yang et al., 1995), y por tanto es posible el que ANA no influya en la germinación de la orquídea *Prosthechea sp.*

Tabla 3. Análisis de varianza para del coeficiente de germinación

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Significancia
TRAT	25119,86	37	678,92	6,52	<0,0001	**
Error	7605,33	73	104,18			
Total	32725,19	110				

$$R^2 = 0,77$$

$$CV = 39,71$$

El análisis de varianza para el coeficiente de germinación presentó una diferencia significativa entre los tratamientos, obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,77 lo cual indica las variaciones por el efecto del modelo estadístico sobre los tratamientos estudiados, un coeficiente de variación (C.V.) de 39,71.

Efecto de almidón, jugo de piña y agua de coco en la germinación.

Tabla 4. Prueba de Fisher

ALMIDON	PIÑA	COCO	Medias		
1	0	1	65,67	A	
0	0	1	50,67	A	
0	1	0	31		B
1	0	0	29,69		B
0	0	0	18,71		B C
1	1	0	14,67		B C
1	1	1	12,67		C
0	1	1	12,67		C

En esta interacción entre almidón, jugo de piña y agua de coco, el mejor tratamiento (T3) para la fase de germinación, se obtiene un porcentaje del 65,67% que es obtenido cuando es adicionado almidón al tratamiento que contiene agua de coco en el medio de cultivo MS (Tabla 4.). Es notable que la interacción entre el agua de coco y el almidón generan un incremento favoreciendo la germinación debido a que esta fuente de almidón contiene glutamina que es especialmente necesaria para el crecimiento de embriones inmaduros, puesto que es una importante fuente de nitrógeno (Pierik, 1990).

Esto ratifica lo descrito por (Kitsuki et al., 2004) en el cual la adición de compuestos orgánicos en el medio de cultivo MS, se potencializa. Además

informaron que el medio de cultivo suplementado con agua de coco, resultó más eficaz para la germinación, a diferencia del medio de cultivo suplementado con jugo de piña, que resultó mejor para el desarrollo de *Ophrys* (Orchidaceae) igualmente Nongrum et al. (2007) y Abbas et al. (2011) encontraron que la adición del agua de coco al medio de cultivo tuvo un efecto benéfico en la germinación de *Coelogyne ovalis* y *Grammatophyllum scriptum* respectivamente. Lo mencionado anteriormente concuerda con lo obtenido en el presente estudio, dando como resultado mayor eficiencia en el uso de agua de coco, para la etapa de germinación de *Prosthechea sp.* En contraste Salazar y Cansino (2012) obtienen resultados distintos en el porcentaje de germinación en el medio de cultivo suplementado con jugo de piña para las especies de *Prosthechea vespa* y *Sobralia klotzschiana* siendo así el tratamiento con jugo de piña el mejor para esa investigación. Posiblemente debido a que todas las especies tienen diferentes necesidades nutricionales por tal motivo, se ve la necesidad de estudiar las condiciones para cada especie como lo afirma Ruiz et al., (2008), en donde Dutra et al., (2009); Basker et al., (2010); Kauth et al., (2011), implementaron diferentes medios de cultivos para la preservación de orquídeas.

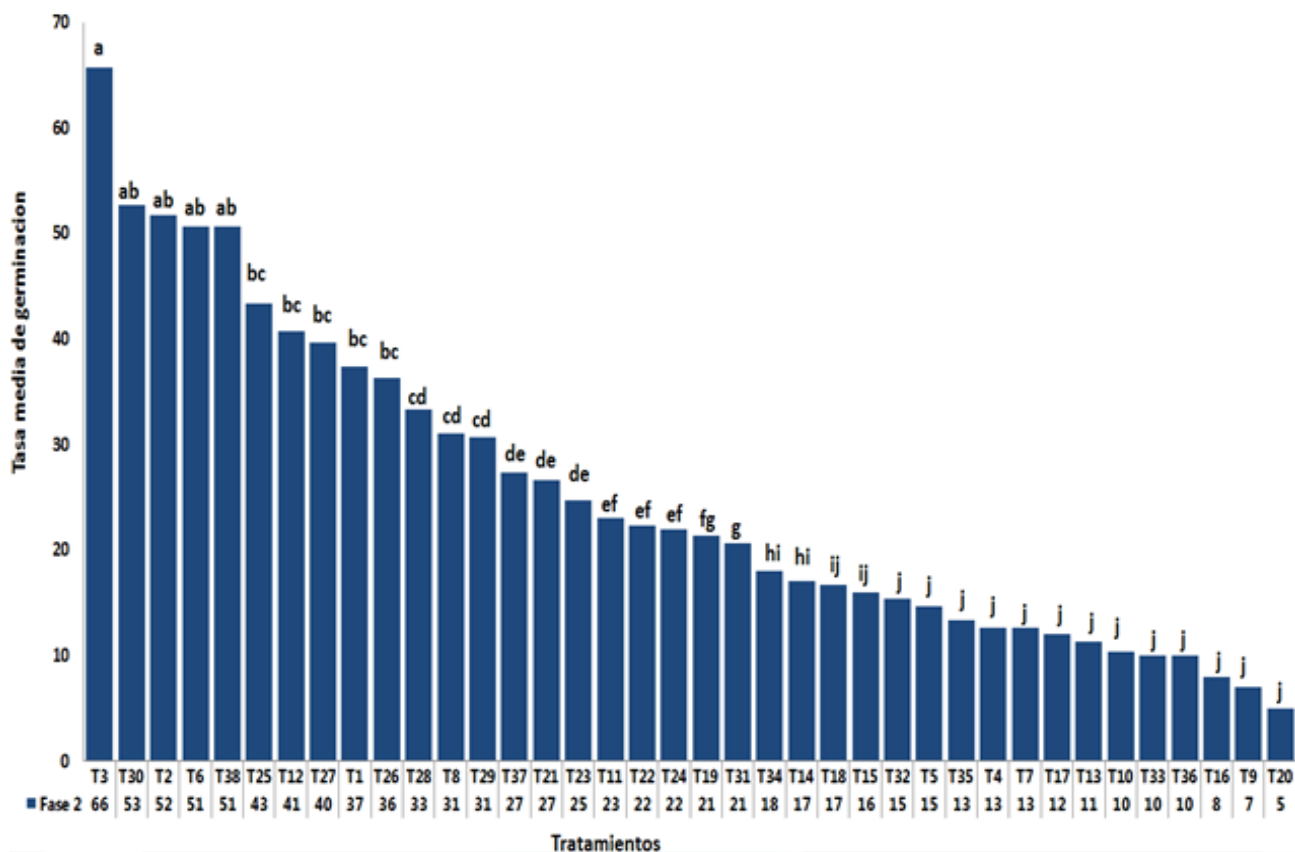
Efecto de la interacción de ANA, BAP y almidón en la germinación

Tabla 5. Prueba de Fisher para la interacción entre ANA, BAP y almidón.

ALMIDON	ANA	BAP									
1	0,5	2	52,67	A							
1	2	2	50,67	A							
1	0	1	43,33	A	B						
0	0,5	0	40,67	A	B	C					
1	0,5	0	39,67	A	B	C	D				
1	0	2	36,33	A	B	C	D	E			
1	0	0	36,17		B	C	D	E			
1	0,5	0,5	33,33		B	C	D	E	F		
0	0	0	32,92		B	C	D	E	F		
1	0,5	1	30,67		B	C	D	E	F	G	
1	2	1	27,33		B	C	D	E	F	G	H
0	2	1	26,67			C	D	E	F	G	H
0	1	2	24,67			C	D	E	F	G	H
0	0	2	23				D	E	F	G	H

Continuación Tabla 5.									
0	2	2	22,33		D	E	F	G	H
1	0	0,5	22		D	E	F	G	H
0	2	0	21,33			E	F	G	H
1	1	0	20,67			E	F	G	H
1	1	2	18				F	G	H
0	0,5	1	17				F	G	H
0	1	1	16,67					G	H
0	0,5	2	16					G	H
1	1	0,5	15,33					G	H
1	2	0	13,33						H
0	1	0,5	12						H
0	0,5	0,5	11,33						H
0	0	1	10,33						H
1	1	1	10						H
1	2	0,5	10						H
0	1	0	8						H
0	0	0,5	7						H
0	2	0,5	5						H

Las interacciones de ambos reguladores de crecimiento (ANA y BAP) presentan relativamente el mismo porcentaje de semillas germinadas, la función más importante de BAP es la de estimular la división celular cuando actúa junto a una auxina, ambos compuestos deben estar en balance ya que una alta relación auxina- citoquinina estimula el crecimiento y proliferación de *Prosthechea sp.* Como lo presenta la tabla 5, en los tratamientos 30 y 38 se obtienen porcentajes de germinación de 52,67% y 50, 67% respectivamente. Cabe resaltar que estos tratamientos con mejor respuesta de germinación están suplementados con la fuente de almidón (fécula de maíz) y se evidencia una baja germinación en los tratamientos que están en ausencia de este componente, resultado que se presenta en T16, T9 y T20.



Grafica 1. Tasa media de germinación de *Prosthechea sp* con respecto a diferentes concentraciones de nutrientes complejos (almidón, jugo de piña, agua de coco) y hormonas sintéticas ANA y BAP.

Nota: Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Fisher LSD ($P \leq 0.05$).

En este estudio se encontró que el medio más adecuado para la iniciación de la germinación de la especie *Prosthechea sp*, fue el T3 medio MS+AC, ya que allí se evidencio el mayor porcentaje de germinación, con un 66% de la especie objeto de estudio.

Caso contrario sucede con los tratamientos que no contienen suplementos orgánicos, presentan un porcentaje bajo en la fase de germinación (T9) con 7% Medio M y S con BAP ($0,5\text{mg.L}^{-1}$), (T20) con 5% Medio M y S con ANA (2mg.L^{-1}) y BAP ($0,5\text{mg.L}^{-1}$)

Según lo anterior se obtuvo que los tratamientos con ausencia de almidón presentan un desarrollo bajo en la fase de germinación para *Prosthechea sp.* Bajo condiciones *in vitro*. Por tanto se puede afirmar que para nuestro experimento el uso de almidón genera mayor porcentaje de germinación. Ya que la fécula de maíz genera un aporte de vitaminas a la semilla, por su contenido de glutamina que es esencial para el crecimiento de embriones inmaduros por ser una importante fuente de nitrógeno (Pierik, 1990)

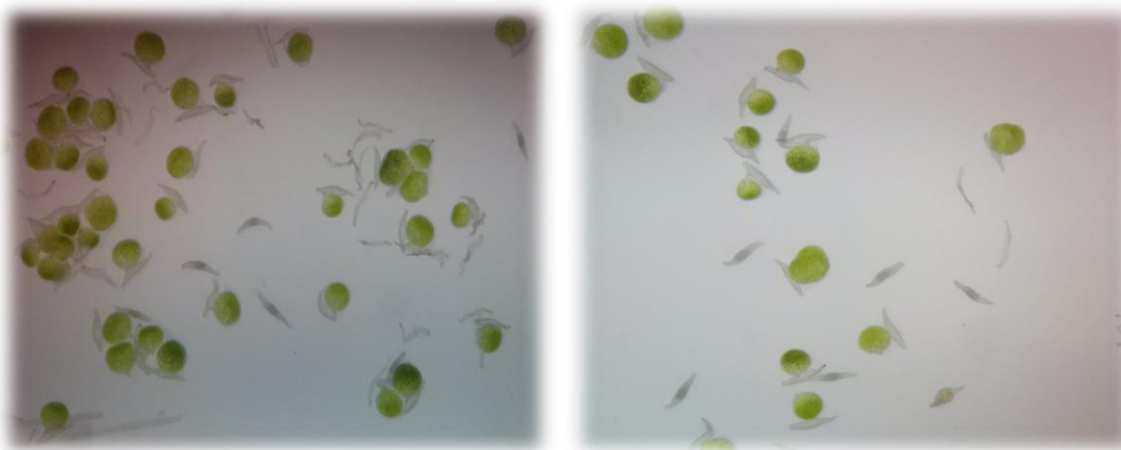


Figura 7. Germinación de semillas en T3. Medio M y S con almidón (10g.L-1), agua de coco (200mL/L)

Fuente: Deaza y Orjuela 2015

6.2 EFECTO DE NUTRIENTES COMPLEJOS (JUGO DE PIÑA , AGUA DE COCO Y ALMIDÓN), BAP Y ANA SOBRE LA FORMACION DE PROTOCORMOS.

Tabla 6. Análisis de varianza para del coeficiente de formación de Protocormos

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor	Significancia
TRAT	29439,10	37	795,65	7,61	<0,0001	**
Error	7737,33	74	104,56			
Total	37176,43	111				

$$R^2 = 0,79$$

$$CV = 38,12$$

El análisis de varianza para el coeficiente de formación de Protocormos presentó una alta diferencia significativa entre los tratamientos, obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,79 lo cual indica las variaciones por el efecto del modelo estadístico sobre los tratamientos estudiados, un coeficiente de variación (C.V.) de 38,12 %

Efecto del jugo de piña, agua de coco y almidón para la formación de Protocormos.

Tabla 7. Prueba de Fisher

ALMIDON	PIÑA	COCO	Medias			
1	0	1	73,67	A		
0	0	1	69	A		
0	1	0	30,67	B		
1	0	0	28,54	B		
1	1	1	27,33	B	C	
0	0	0	20,46	B	C	D
0	1	1	13,67		C	D
1	1	0	9,67			D

La formación de protocormos se desarrolla notablemente en los tratamientos que contienen agua de coco, pero si hay interacción con la fuente de almidón se observa un mayor porcentaje para esta etapa, obteniendo así un 73,67% en el T3 (Tabla 7). Sin embargo el tratamiento que contiene agua de coco solamente, también presenta un buen porcentaje (69%) en la formación de los protocormos de la orquídea *Prosthechea sp.* De acuerdo a Kitsaki et al. (2004) quien afirma que el desarrollo de protocormos es notable en medios que contienen suplementos orgánicos, en un estudio realizado en el híbrido *Phalaenopsis*. Resultado que coincide con esta investigación en donde la mejor respuesta se presentan en los tratamientos con suplementos orgánicos. Igualmente, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los de Hicks (2007) quien encontró que el agua de coco puede promover la regeneración espontánea de protocormos *in vitro* del género *Oncidium* (Orchidaceae).

Stewart y kane (2006) encontraron que el medio de cultivo enriquecido con agua de coco era más adecuado para la germinación y formación de protocormos de *Ophrys*, al igual Kitsaki et al., (2004), informan que el medio de cultivo suplementado con agua de coco, resultó más eficaz para la germinación y

formación de protocormos, a diferencia del medio de cultivo suplementado con jugo de piña, que resultó mejor para el desarrollo para esa misma especie (*Ophrys*).

La formación de los protocormos de *Prosthechea sp.*, en general, es mejor en el medio de cultivo MS+AL+AC, encontrando diferencias significativas (Tabla 7), (grafica2), la fuente de almidón (fécula de maíz) potencializa el efecto del complejo orgánico agua de coco sobre la formación de protocormos de la especie objeto de estudio. Probablemente por el aporte de glutamina que brinda el almidón, dando así “nitrógeno orgánico” (McKee *et al.*, 2003; Pedroza-Manrique, *et al.* 2010).

Los tratamientos suplementados con jugo de piña presentaron porcentajes de formación de protocormos del 30,67%, resultados inferiores a los tratamientos que contienen agua de coco.



Figura 8: Tratamiento suplementado con 10g.L de almidón y Agua de coco

Fuente: Deaza y Orjuela 2016

Efecto de la interacción de ANA, BAP y almidón en la formación de protocormos.

Tabla 8. Prueba de Fisher.

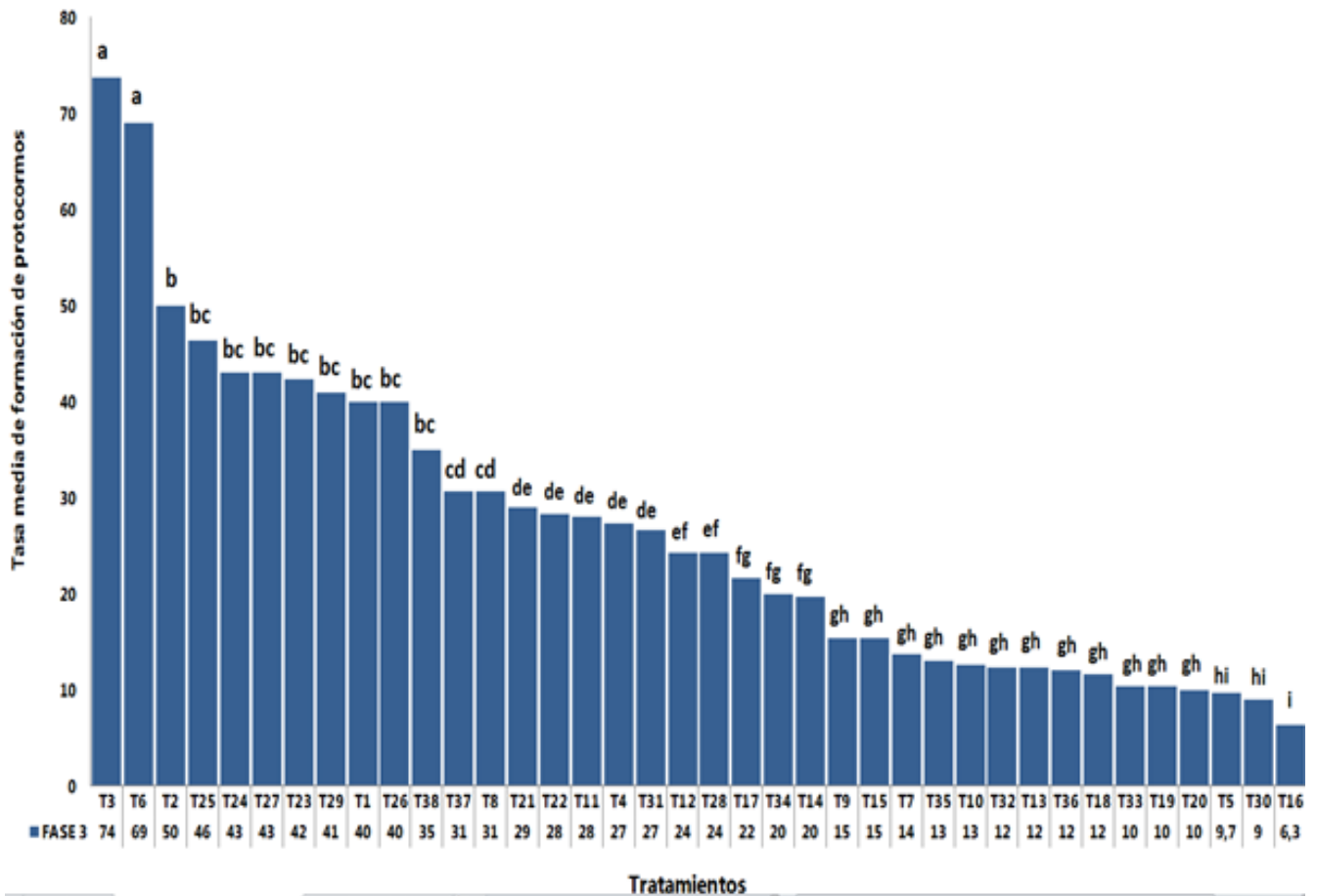
ALMIDON	ANA	BAP	Medias		
1	0	1	46,33	A	
1	0,5	0	43	A	B
1	0	0,5	43	A	B
0	1	2	42,33	A	B
1	0,5	1	41	A	B
1	0	0	40,17	A	B
1	0	2	40	A	B C
0	0	0	38,33	A	B C

1	2	2	35	A	B	C	D			
1	2	1	30,67	A	B	C	D	E		
0	2	1	29		B	C	D	E		
0	2	2	28,33		B	C	D	E		
0	0	2	28		B	C	D	E		
1	1	0	26,67		B	C	D	E		
1	0,5	0,5	24,33			C	D	E	F	
0	0,5	0	24,33			C	D	E	F	
0	1	0,5	21,67				D	E	F	G
1	1	2	20				D	E	F	G
0	0,5	1	19,67				D	E	F	G
0	0	0,5	15,33					E	F	G
0	0,5	2	15,33					E	F	G
1	2	0	13					E	F	G
0	0	1	12,67					E	F	G
1	1	0,5	12,33					E	F	G
0	0,5	0,5	12,33					E	F	G
1	2	0,5	12					E	F	G
0	1	1	11,67					E	F	G
1	1	1	10,33					E	F	G
0	2	0	10,33					E	F	G
0	2	0,5	10					E	F	G
1	0,5	2	9						F	G
0	1	0	6,33							G

Es claro que la adición de Almidón (fécula de maíz), en interacción con las hormonas BAP y ANA genera un efecto positivo para la formación de protocormos obteniendo resultados en porcentajes del 46,33% (T25), 43% (T27) y 43%(T24).



Figura 9: Tratamiento suplementado con 10 g.L⁻¹ de almidón y 1mg.L⁻¹ de BAP
Fuente: Deaza y Orjuela, 2016



Grafica 2. Tasa media de formación de Protocormos de *Prosthechea sp* con respecto a diferentes concentraciones de nutrientes complejos (almidón, jugo de piña, agua de coco) y hormonas sintéticas ANA y BAP.

Nota: Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Fisher LSD ($P \leq 0.05$).

Se encontró que el medio más adecuado para la formación de protocormos de *Prosthechea sp* fue el medio el T3. MS+ AC, ya que allí se encontró el mayor porcentaje con un 73.67% de protocormos formados de la especie objeto de estudio.

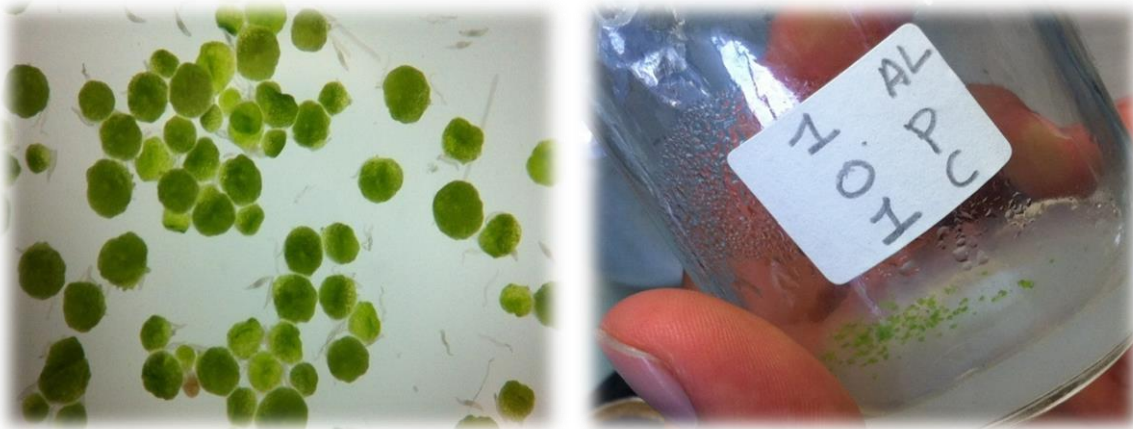


Figura 10. Tratamiento suplementado con almidón y agua de coco

Fuente: Deaza y Orjuela 2016

Para este experimento la adición de agua de coco al medio con almidón fue muy favorable para formación de protocormos de *Prosthechea sp.*

En esta investigación se encontró que el efecto del medio de cultivo MS, se potencializa utilizando aditivos orgánicos en el medio de cultivo. (Kitsuki et al., 2004), informaron que el medio de cultivo suplementado con agua de coco, resultó más eficaz para la germinación y formación de protocormos, a diferencia del medio de cultivo suplementado con jugo de piña, que resultó mejor para el desarrollo de *Ophrys* (Orchidaceae). Resultados similares los que hallaron Stewart y Kane (2006) con la formación de protocormos de *Habenariamacroceratitis* (Orchidaceae).

6.3 EFECTO DE NUTRIENTES COMPLEJOS (JUGO DE PIÑA, AGUA DE COCO Y ALMIDÓN), BAP Y ANA SOBRE EL DESARROLLO DE RIZOIDES.

Tabla 9. Análisis de varianza para del coeficiente de desarrollo de rizoides

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor	significancia
TRAT	26118,67	36	725,52	8,43	<0,0001	**
Error	6114,00	71	86,11			
Total	32232,67	117				

$$R^2 = 0,81$$

$$CV = 35,54$$

El análisis de varianza para el coeficiente de desarrollo de rizoides presentó una alta diferencia significativa entre los tratamientos, obteniendo un coeficiente de

determinación (R^2) de 0,81 lo cual indica las variaciones por el efecto del modelo estadístico sobre los tratamientos estudiados, un coeficiente de variación (C.V.) de 35,54 %.

Efecto de jugo piña y agua de coco y almidón en la formación de Rizoides

Tabla 10. Prueba de Fisher.

ALMIDON	PIÑA	COCO	Medias		
0	0	1	69,67	A	
1	0	1	36,33		B
0	1	0	34,33		B
1	0	0	33		B
1	1	1	18,33		B C
0	0	0	18,02		C
1	1	0	14		C
0	1	1	13,33		C

Para la fase de desarrollo de rizoides se evaluó a partir de la semana nueve hasta la semana doce en esta interacción entre almidón, jugo de piña y agua de coco el mejor porcentaje se obtiene en el tratamiento (T6) donde se adiciona agua de coco al medio de cultivo MS para la fase de desarrollo de Rizoides de *Prosthechea* sp. (Tabla 10).

Coello et al., (2010) resaltan la importancia y crecimiento de rizoides en orquídeas, sin embargo cabe considerar, que a pesar de la dificultad en el análisis de su composición y la poca información en la literatura acerca de los efectos que tienen los componentes orgánicos, como el agua de coco y el jugo de piña, estos son ricos en energía, vitaminas, aminoácidos y fitohormonas (Kurosaki et al., 2004; Yang y Arditti, 2008; Yong et al., 2009

En el presente estudio los tratamientos sin componentes orgánicos muestran un porcentaje más bajo en la formación de rizoides (tabla 11), esto coincide con lo descrito por Rodríguez et al. (2000), en *Phaphiopedillum caudatum*, donde se observaron los mejores resultados al agregar al medio de cultivo agua de coco, esto manifiesta lo dicho por(Nongrum et al., 2007 y Abbas et al.,2011), quienes afirmaron que la adición de componentes orgánicos al medio de cultivo ejerce un efecto benéfico en el desarrollo de tejidos celulares, formando plántulas de *Coelogyne ovalis* y *Grammatophyllum scriptum*.

De igual manera Shina et al. (2004), obtuvieron los mayores tamaños de brotes, al agregar 10% de agua de coco.

El desarrollo de rizoides de híbridos de *Phalaenopsis*, en general presentó el mejor desarrollo en el medio de cultivo MS+AC, encontrando diferencias significativas, resultado que no coincide con lo descrito por (Salazar y Cancino, 2012), donde el mejor porcentaje en desarrolló de rizoides en el medio de cultivo suplementado con jugo de piña para las especies de *Prosthechea vespa* y *Sobralia klotzscheana*, posiblemente debido a que todas las especies tienen diferentes necesidades nutricionales, por tal motivo, se ve la necesidad de estudiar las condiciones para cada especie como lo afirma Ruiz et al., (2008), en donde Dutra et al., (2009); Basker et al., (2010); Kauth et al., (2011), implementaron diferentes medios de cultivos para la preservación de orquídeas.



Figura 11: Tratamiento con medio de cultivo MS suplementado con agua de coco.

Fuente: Deaza y Orjuela, 2016

Efecto de la interacción de Almidón, ANA y BAP en la formación de rizoides

Tabla 11. Prueba de Fisher.

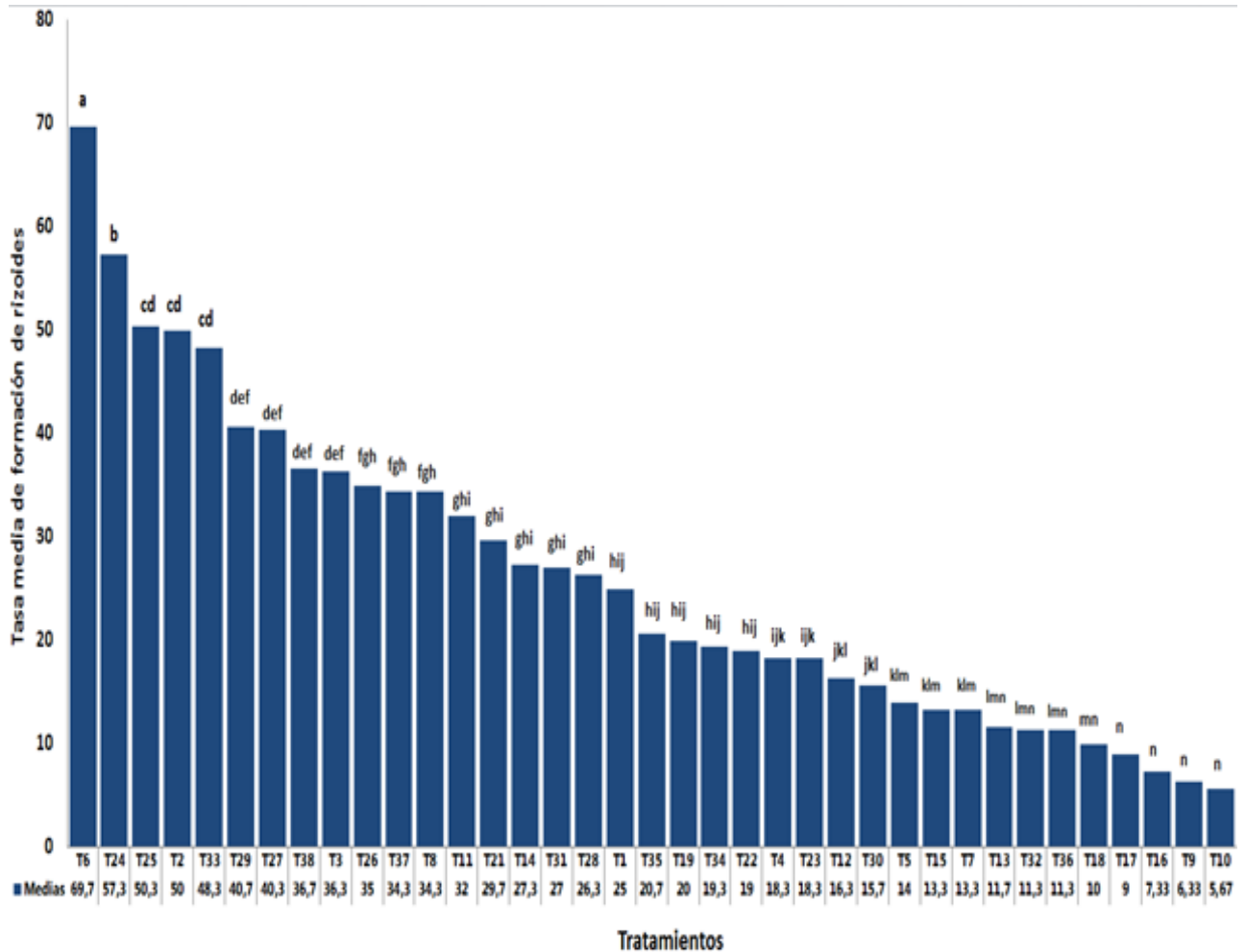
ALMIDON	ANA	BAP	Medias	
1	0	0,5	57,33	A
1	0	1	50,33	B C
1	1	1	48,33	B C D
1	0,5	1	40,67	C D E
1	0,5	0	40,33	C D E F
1	2	2	36,67	C D E F
0	0	0	35,58	D E F
1	0	2	35	D E F
1	2	1	34,33	D E F

0	0	2	32	E F G
0	2	1	29,67	E F G H
1	0	0	29,67	E F G H
0	0,5	1	27,33	E F G H I
1	1	0	27	E F G H I J
1	0,5	0,5	26,33	E F G H I J
1	2	0	20,67	F G H I J K
0	2	0	20	F G H I J K
1	1	2	19,33	F G H I J K
0	2	2	19	F G H I J K
0	1	2	18,33	G H I J K
0	0,5	0	16,33	H I J K
1	0,5	2	15,67	H I J K
0	0,5	2	13,33	I J K
0	0,5	0,5	11,67	J K
1	2	0,5	11,33	J K
1	1	0,5	11,33	J K
0	1	1	10	K
0	1	0,5	9	K
0	1	0	7,33	K
0	0	0,5	6,33	K
0	0	1	5,67	K

En esta interacción la mejor tasa media para desarrollo de rizoides fue mejor en tratamiento (T24) donde se adiciona almidón y BAP (tabla 11).

De acuerdo con Krikorian (1991), el BAP es la citoquinina sintética que más se utiliza actualmente en el cultivo de tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro*, y según Rozell (1983), si es adicionada al medio de cultivo en concentraciones de 0.03 a 3,0 mg.L⁻¹, estimula los procesos de multiplicación celular (Krikorian, A. D. 1991).

Además las auxinas favorecen el crecimiento vertical o apical, por lo que estas raíces pudieron haber respondido al alargamiento por la presencia del ANA en el medio. Caso similar se observó en *Phaiustan kervillae* Rchb.f. Donde la mayor extensión de las raíces se dio en presencia de 0,1 mg/L⁻¹ de ANA (Sultana et al., 2012).



Gráfica 3. Tasa media de desarrollo de rizoides de *Prosthechea sp* con respecto a diferentes concentraciones de nutrientes complejos (almidón, jugo de piña, agua de coco) y hormonas sintéticas ANA y BAP.

Nota: Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Fisher LSD ($P \leq 0.05$).

Para este estudio se encontró que el medio más adecuado para la formación de rizoides de la especie *Prosthechea sp*, fue el T 6 medio MS+AC, ya que allí se encontró el mayor porcentaje para esta etapa con un 69.7% de la especie objeto de estudio.

La mejor tasa media que se obtiene es para el tratamiento donde se adiciona agua de coco al medio de cultivo MS para producción de Rizoides para *Prosthechea sp*.

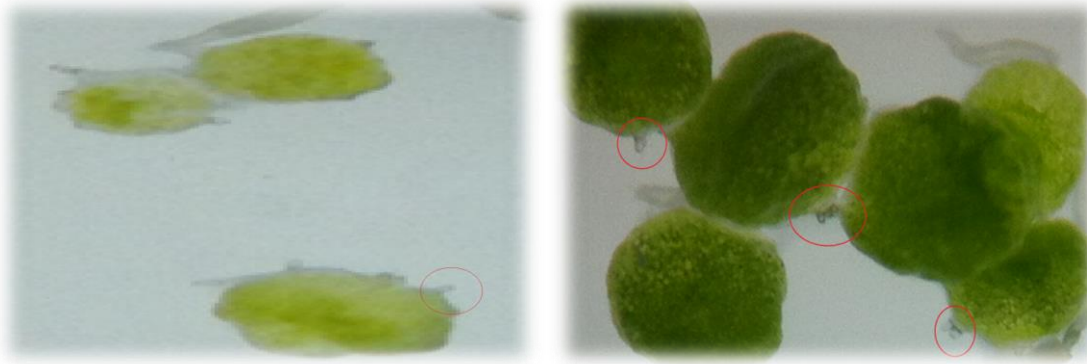


Figura 12.Desarrollo de rizoides. T6 Medio M y S con agua de coco (200mL/L).
Fuente: Deaza y Orjuela; circulo indica el desarrollo de rizoides.

Los tratamientos que no contienen suplementos orgánicos presentan una tasa media de desarrollo de rizoides muy baja (T16) M S con ANA $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (T9) MS con BAP $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y (T10) MS con BAP $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Según Romay et al.,(2006) los medios de cultivo con adición de almidón, posiblemente aumentan la dureza del medio, lo que impide la difusión de los nutrientes. También ayuda la absorción de agua y algunos nutrientes que potenciaban la dureza de los protocormos y rizoides

Para el tratamiento (T16) presenta un porcentaje en desarrollo de rizoides de 7,33%, muy bajo en comparación a los tratamientos suplementados con componentes orgánicos, debido probablemente a que esta fitohormona en concentraciones de $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ejerce un efecto negativo en el desarrollo de rizoides como lo afirma Salisbury y Ross (2000), las auxinas o cualquier tipo de regulador son funcionales cuando se encuentran en pequeñas cantidades, y que en altas concentraciones no es favorable por que en lugar de inducir una respuesta específica por parte del tejido vegetal, produce toxicidad en el mismo.

Diversos estudios han demostrado que las auxinas estimulan la rizogénesis en el cultivo de tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro* (Cañas, 1993;Álvarez y Sagawa, 1965) señalan que los efectos de las auxinas en el cultivo de orquídeas bajo condiciones *in vitro* incluyen la formación y elongación de la raíz. Resultado que no concuerda con nuestro estudio, como lo muestra la grafica3 en el (T16), debido a que la concentración de ANA es alta, es posible que para la especie *Prosthechea sp.* Se deben utilizar concentraciones más bajas que $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, incluso más bajas que $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de esta auxina.

De acuerdo con Krikorian (1991), el BAP es la citoquinina sintética que más se utiliza actualmente en el cultivo de tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro*, y

según Rozell (1983), si es adicionada al medio de cultivo en concentraciones de 0,03 a 3,0 mg.L⁻¹, estimula los procesos de multiplicación celular, razón por la cual los tratamientos en los que se implementó su uso en ausencia de ANA mostraron buenos resultados en cuanto al desarrollo de los rizoides de *Prosthechea sp.*

Li-Ru et ál., (2002) Saiprasad y Raghuv eer, (2003) en un cultivó de *Epidendrum radicans* y *Dendrobium formosum* enriquecido con la citoquinina BAP, demuestran que se logra un adecuado desarrollo de rizoides para estas especies .

7. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo suplementado con agua de coco, resultó más eficaz para las fases de germinación, formación de protocormos y desarrollo de rizoides.
- Los tratamientos suplementados con la fuente de almidón (fécula de maíz), son potencializados por el aporte de carbohidratos hierro y nitrógeno orgánico que contiene la glutamina.
- El almidón juega un papel importante en las fases de germinación y formación de protocormos, ya que los mejores resultados se obtienen en los tratamientos que son suplementados con este compuesto.
- El medio MS suplementado con agua de coco tuvo una mayor eficacia en la germinación, formación de protocormos y rizoides de *Prosthechea sp.* demostrando que la adición de compuestos orgánicos en los medios de cultivo *in vitro* es de suma importancia para obtener grandes volúmenes de material vegetal.
- La citoquinina BAP en concentraciones de $0,5 \text{ ml.L}^{-1}$ y 1 ml.L^{-1} , en interacción con la fuente de almidón estimulan el desarrollo de rizoides, como se muestra en el estudio. Obteniendo porcentajes de 57,33 y 50,33% respectivamente.

8. RECOMENDACIONES

- ✓ Para próximos estudios de cultivo *in vitro* de *Prosthechea sp.*, es necesario evaluar el tiempo de germinación
- ✓ Es necesario evaluar el efecto de maduración de las capsulas sobre la germinación y posterior desarrollo de la orquídea *Prosthechea sp.*
- ✓ Se recomienda utilizar el medio Murashige y Skoog + Almidón+ Agua de coco donde presentó la mejor germinación y formación de protocormos para *Prosthechea sp.*
- ✓ Realizar trabajos con otros compuestos orgánicos para la propagación *in vitro* de *Prosthechea sp.*
- ✓ Tanto para los medios de germinación, formación de protocormos y desarrollo de rizoides necesario aumentar el tiempo de incubación (>10 semanas) así podremos determinar los efectos a largo plazo que puedan tener estos reguladores en semillas de *Prosthechea sp*
- ✓ Para próximos trabajos se debe realizar un análisis de costos del proceso de propagación *in vitro*, efectivos que se hallan desarrollado.

9. BIBLIOGRAFIA

- A.C.O. (Asociación Costarricense de Orquideología). 2005. Preguntas frecuentes sobre orquideología (en línea). C.R. Consultado 30 Ag. 2005.
- Abbas, B., Heningtyas, F., Amriati, B. 2011. *In vitro* seeds germination and plantlets development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl.(Orchidaceae). *International Research Journal of Plant Science*. 2 (5): 154-159.
- Álvarez, M., Sagawa, Y. 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). *Caryologia*, 18: 251-261.
- Amador, D. 1999. Reguladores del crecimiento utilizados en cultivo de tejidos vegetales: términos y conceptos fundamentales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 12 p.
- Arditti, J. 2008. Micropropagation of orchids, 2nd edn. Blackwell, Cambridge.
- Arditti, J. y Ghani A. K. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* 145(3):367 - 421.
- Arias HL, Santibañes SR, Dendooven L, Ayora TT, Gutierrez MFA (2006) Efecto de agua de coco y homogenizados de jitomate y plátano sobre el crecimiento de la orquídea *Guariantheskinneri* cultivada in vitro.
- Arteca R. N. 1996. Plant Growth Substances Principles and Applications. Editorial Chapman & Hall. New York pp332.
- Ascon-Bieto, J. & M. Talon. 2001. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Edit. Interamericana. Mc Graw-Hill. Madrid
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, L. & Salgado Garciglia, R. (2009). In vitro propagation of the endangered orchid *Laeliaspeciosa*. *Plant Cell*

Tissue and Organ Culture, 99, 335-343.

Azcon-Bieto J y Talon M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. McGRAW HILL- Iberoamericana España. Madrid. 651 págs.

BARLOW, H. W. B. & HÁNCOE, C. R., y LACAS, H. 1. —1961— Proc. 4th Inst. Conf. Plant Growth Regulation. Iowa State University Press, Amer.

Baskets. & Bai, N. (2006). Micropropagation of *Coelogyne stricta* (D. Don) Schltr. via pseudobulb segment culture. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 6(1), 31-35.

BILLARD, C. E., DALZOTTO, C.A.; LALLANA, V.H. (2012) a. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de orquídeas. Resúmenes, p. 79. In: 3er. Congreso de Orquideología, Conservación y Bromeliáceas. Montecarlos, Misiones 18, 19, 20, 21 de julio de 2012.

Caldas, L. S., Haridasan, P., & Ferreira, M. E. (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. *Brasília: EMBRAPA/CNPq*, v. 1. 87-132.

Cañas, B. M. 1993. Metodologías *in vitro* de vegetales. Bucaramanga: UIS.

Cavalcante, M.P., L. Willadino, A.G. Dias y S.D.V.M. Tenório (2001). Propagación de orquídea *Gongora quinquenervis* por semadura *in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras.* 36: 1319-1324.

Chen, F.; Lin, S.; y Wang, J. 2002. Advances in the micropropagation and breeding of orchid. *Fujian Nonglin Daxue Xuebao*. p. 31.

Clements, M. A. 1987. The symbiotic method of orchid seed germination progress on Australasian epiphytes. En: Proceedings of the World Orchid Hiroshima Symposium, Nishiki Print Company. p. 65 - 68.

CONCEPTOS BÁSICOS DE PROPAGACIÓN VEGETAL.
<http://ww2.educarchile.cl>.

Contreras. D., Gil, A y L. Gutierrez. 2016. Establecimiento *in vitro* de protocormos de *Prosthechea* sp. bajo diferentes concentraciones. Facultad de ciencias agropecuarias, Universidad De Cundinamarca, Fusagasuga.

COYAMA, N. —1962— Forest. Exp. Sta. Ball., 145, Tokyo

Curtis, J. T. 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *Am. J. Bot.* 26:390-399

Damon, A., G.E. Aguilar., L. Rivera. y V. Nikolaeva (2004). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 10: 195

DE LA NOVAL. B.M.; ORIA. A.; CASADESUS. L.; GOMEZ. M. Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorrizas orquideales en especies de orquídeas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas - Universidad de la Habana, La Habana, Cuba, 4 pag, 1998.

Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J., Gil-Vásquez, I. & Colinas-León, M. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo serie horticultura, 14(3), 347-353

Hicks, A. J. (2007). Orchid seed germination media, a compendium of formulations. The Orchid Seed Bank Project, Chandler, USA. 210 p.

Hrusa, Co. W. —1975— Act. Horticulturae, 56: 251-261. Plant Growth Regulation. Iowa State University Press, Amer.

Hurtado, D., Merino, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México: Trillas. 232 p.

Kende H., Zeevaart J. 1997. The Five "Classical" plant hormones. The plant cell. Vol 9, 1197.

Kishor, R.; Valli, K.S.; Sharma, G.J.; (2006). Hybridization and *in vitro* culture of and orchid hybrid. Ascocenda 'Kangla'. Scientia Horticulturae. Vol 108. p. 66-73.

Kitsaki, C., Zygourakis., Ziobora, M., Chintziest, S. 2004. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys species* (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*. 23:284-290.

Krikorian, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W., Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, pp. 96-125.

Latha, P. G. y Seeni, S. 1994. Multiplication of the endangered Indian pitcher plant (*Nepenthes khasiana*) through enhanced axillary branching *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38(1):69 – 71

Lindemann EGP, Guncke JE, Davidson WO (1970) Meristem culture of *Cattleya*. *Amer. Orch. Bull.*, 39, 1002- 1004.

Luan VQ, Thien NQ, Khiem DV, Nhut DT (2006) *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. Nong Lam

- University Ho Chi Minh City, October 20-21. 175 – 177 pp.
- Mahendran, G. & Narmatha, B. (2012). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 135, 40-44.
- Martin KP (2003) Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipseamalabarica* (Reichb. F.) J.D. Hook., and endangered orchid. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39: 322-326.
- Martin, K.P. 2003. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipseamalabarica* (Reich .f.) J.D.
- Martin-Gordo, D. A., Cárdenas-González, O., & Constantino-Pacheco, J. (2012) Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación *in vitro*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 3 (2): 49-62.
- McKee T, McKee J. 2003. *Bioquímica: la base molecular de la vida*. McGraw-Hill. Madrid.
- Montaldi E. 1995. *Principios de fisiología vegetal*. Ediciones DUR. La plata.
- Murthy, H. N. y Pyati, A. N. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37(2):223 – 226
- Nayak, N. R.; Chand, P. K.; Rath, S. P.; y Patnaik, S. N. 1998. Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. seed-derived rhizomes *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34(3):185 – 188
- Nongrum, L., Kumaria, S., Tandon, P. (2007). The influence of *in vitro* media on asymbiotic germination, plantlet development and ex vitro establishment of *Coelogyne ovalis* Lindl. And *Coelogyne nitida* (Wall. Ex Don) Lindl. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 73(4):205-207.
- Otero, J. T.; Mosquera-Espinosa, A. T.; y Flanagan, N. S. 2013. Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. En: *Fourth Scientific Conference on Andean Orchids*. *Lankesteriana* 13(1-2):57 - 63.
- Park, S.; Yeung, E.; Chakrabarty, D.; y Paek, K. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis hybrid* using thin-section culture. *Plant Cell Rep.* 21(1):46-51.
- Pedroza Jaime Alonso Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro* [Publicación periódica]. - Bogotá : [s.n.], 2009. - 1 : Vol. 11.
- Pedroza-Manrique J y Mican-Gutierrez Y. 2006. Asymbiotic germination of

Odontoglossum gloriosum RCHB.F. (orchidaceae) under in vitro conditions. *In vitro cellular & development biology*.42 (6): 543-547.

Pedroza-Manrique J, Fernandez-Lizarazo C y Suarez-Silva A. 2005. Evaluation of the Effect of Three Growth Regulators in the Germination of *Comparettiafalcata* Seeds under *In vitro* Conditions.*In Vitro Cellular&DevelopmentalBiologyPlant*. 41 (6): 838-843.

Pérez Ponce, J.N. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Volumen 1. 1988

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Editorial Mundi Prensa. Madrid.

Purves W., Sadova D., Orians G., Heller C..2002. Vida La Ciencia De La Vida. Sexta Edición. Editorial Medica Panamericana. New York .pp 1133.

RAMOS AMAYA, J. 2012.Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. universidad nacional abierta y a distancia (unad). Bogota

Rey, H. Y. &Mroginski, L. A. 1996.Regeneration of plants from callus tissue of *Aeschynomene* spp. (Leguminosae).*PlantCell, Tissue and Organ Culture* 45: 185-190.

Rincon J y Chavez N 2006. Glosario de biotecnología. primera edición. Universidad Autonoma de Aguascalientes. Mexico

Rodriguez J, Gomez A, Pasqual M, Rodriguez F Y Aparecida F. 2009. Concentrações de sais do meioKnudson C e de ácido giberélico no crescimento in vitro deplântulas de orquídea. *Ciencia rural, Santa María*. 39 (3): 772-777.

Rodriguez J, Gomez A, Pasqual M, Rodriguez F Y Aparecida F. 2009. Concentrações de sais do meioKnudson C e de ácido giberélico no crescimento in vitro deplântulas de orquídea. *Ciencia rural, Santa María*. 39 (3): 772-777.

Rodriguez, F. 2000. Germinación y desarrollo *in vitro* de *Paphiopedilumextaminodium* y *P. caudatum*, especies en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias. UNAM. pp.56.

Rodriguez, F. 2000. Germinación y desarrollo in vitro de *Paphiopedilum extaminodium* y *P. caudatum*, especies en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias. UNAM. pp.56.

Rojas G. M., Ramirez H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas: fisiología, tecnología, experimentación. Limusa 2 ed.,pp263.

Salazar, S., Cancino, G. 2012.Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14 (1): 53-59

Salisbury F y Ross C. 1994. Fisiología vegetal. Grupo editorial iberoamericana S.A. México D.F. 759 págs. Salisbury F. 1994. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana. Mexico. pp759.

SARABIA OCHOA, M. E. et al. Callus Growth and Plant Regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 10(1): 13-18, 2010.

SELENA L. A. 1999. Propagación in Vitro de orquídeas a partir de semilla sexual. Universidad de Caldas – A. A. – Manizales – Colombia

Serna, A.L. (1999). Propagación in vitro de orquídeas a partir de semilla sexual. FIT TECNIA No. 034 Genética. Diciembre, Universidad de Caldas, A.A. 275. Manizales, Colombia.

Shimasaki, K y Uemoto, S. 1991. Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures in vitro. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 25(1):49 – 52

Smith R. 2012. *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. Londres, UK. Academic Press Elsevier. 208 p.

SUÁREZ QUIJADA, I. et al. Propagación in vitro y aclimatización de *Euchilemaria* (Ames) Withner (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1-2): 388-393, 2007.

Sultana, N., Jahan, T., Baraj, T., Akhter, M. & Ara, N. (2012). Tissue culture propagation of tropical orchid (*Pathustankervilliae*) plant. *Journal of Innovation & Development Strategy (JIDS)*, 6(1), 81-85.

Taiz, L., Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. 2 ed. Sunderland: Sinanuer Associates, Inc. 560 p.

Tanimoto Eiichi. 2005. Regulation of Root Growth by Plant Hormones- Roles for Auxin and Gibberellin. *Critical Reviews In Plant Sciences* (24)249-265.

Taylor, D. L.; Bruns, T. D.; Szaro, T. M.; y Hodges, S. A. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectrispicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *Am. J. Bot.* 90(8):1168 - 1179.

Tuong, L., Takamura, T. & Tanaka, M. (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*, 166, 1443-1449.

Yong J, Ge L, Ng Y y Tan S. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* (14): 5144-5164.

COELLO, C. Y. et al. Plant growth regulators optimization for in vitro cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.

Higgins. *Gayana Botánica*, 67(1): 19-26, 2010

SUÁREZ QUIJADA, I. et al. Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1-2): 388-393, 2007.

PÉREZ MOLPHE BALCH, E. M. et al. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 180 pp., 1999.

Salazar M, Amaya N, Barrientos F. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Cucuta*.

Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W., Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, pp. 96-125.

KALIMUTHU, K; SENTHILKUMAR, R; VIJAYAKUMAR, S. 2007. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). *African Journal of Biotechnology* 6(10): 1171–1174.

Ikuma, H. and K.V. Thimann, 1963. "Action of Kinetin on photosensitive germination of lettuce seed as compared with that of gibberellic acid". *Plant Cell Physiol.*, 4: 113-128

Yang, Y.Y.; A. Nagatani, Y.J. Zhao, B.J. Kang, R.E. Kendrick y Y. Kamiya, 1995. "Effects of gibberellins on seed germination of phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*". *Plant Cell Physiol.*, 36: 1205-1211.

Derx M.P.M. y C.M. Karssen, 1993a. "Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellins-stimulated germination in *Arabidopsis thaliana*: studies with gibberellins-deficient and insensitive mutants". *Physiol. Plant*, 89: 360-368.

Metzger, J.D., 1983. "Role of endogenous plant growth regulators in seed dormancy of *Avena fatua*. II. Gibberellins". *Plant Physiol.*, 73: 791-795.

Krikorian, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W., Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, pp. 96-125.

Rozell, J. F. 1983. Influence of Azotobacteraceae and triacontanol on orchid protocorm and seedlings growth. Denton. Thesis (Master of Science). North Texas State University. Department of Biology.

Ruíz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H. Azpíroz, R. 2008.

In vitro germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr

(Orchidaceae) s. Python Revista Internacional De Botánica Experimental.

McKee T, McKee J. 2003. Bioquímica: la base molecular de la vida. McGraw-Hill. Madrid.