



## Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción in-vitro de orquídeas

### Modifications in cultivation media applied in preservation and in-vitro production of orchids

Juan Manuel Salgado<sup>1</sup>, Laura Peñaranda<sup>2</sup>

Recibo: 10.05.2018 Aceptado: 27.03.2019

Salgado, J. y Peñaranda, L. (2018). Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción in-vitro de orquídeas. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*. 6(1), 17-28.

#### Resumen

Las orquídeas son una familia de plantas con interés económico y científico dada su diversidad ornamental y aplicaciones en la medicina entre otras. Sin embargo, muchas especies de orquídeas están amenazadas y en peligro de extinción, debido a la transformación del hábitat y la extracción excesiva de especies con interés comercial. Aunado a esto, su propagación y conservación in vitro, resulta costosa, debido a la complejidad biológica. El presente estudio reporta información sobre un medio de cultivo versátil, enfocado en la conservación de germoplasma y producción in-vitro de orquídeas. Para ello se diseñó una formulación basada en la modificación del medio Murashige y Skoog (1962) con vitaminas Morel, agua de coco y carbón activado recurriendo a la combinación de experiencias exitosas de la bibliografía reportada. Se recolectaron en el eje cafetero, cápsulas de *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins y esterilizadas en el laboratorio. Los medios de cultivo fueron probados para la inducción de callo, proliferación de estructuras tipo protocormos, desarrollo y mantenimiento de plántulas. Se logró la germinación asimbiótica in-vitro de las semillas colectadas, se obtuvieron tres tipos de callos. Luego de 7 meses de cultivo, las plántulas alcanzaron entre 1,1. Se validó el protocolo de esterilización de las cápsulas así como el protocolo de preparación de medio, siembra y subcultivo, respecto a los resultados reportados en la literatura usando medios de cultivos convencionales. Los resultados muestran que las modificaciones realizadas en el medio de cultivo MS, permiten disminuir en 10% los costos del medio de cultivo y hacerlo versátil, permitiendo la micropropagación y mantenimiento de plántulas de *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins; presentes en el eje cafetero y el establecimiento de un banco de germoplasma con fines de conservación y producción de material vegetal de alta calidad derivado del cultivo in vitro.

**Palabras clave:** Orchidaceae, Germoplasma, germinación asimbiótica, Embriogénesis cigótica, Protocormos.

<sup>1</sup>Universidad Tecnológica de Pereira; Correo: [manuchem@utp.edu.co](mailto:manuchem@utp.edu.co); Colombia

<sup>2</sup>Tecnoparque-SENA Nodo Pereira; Correo: [lvpenaranda9@misena.edu.co](mailto:lvpenaranda9@misena.edu.co); Colombia

## Abstract

The orquidáceas are a family of plants with economic and scientific interest given their ornamental diversity and applications in medicine among others. However, many species of orchids are threatened and in danger of extinction, due to the transformation of the habitat and the excessive extraction of species with commercial interest. Added to this, its propagation and conservation in vitro, is expensive, due to the biological complexity. The present study reports information on a versatile culture medium, focused on the conservation of germplasm and in-vitro production of orchids. To this end, a formulation was designed based on the modification of the Murashige and Skoog (1962) medium with Morel vitamins, coconut water and activated carbon, using the combination of successful experiences from the reported literature. Capsules of *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins were collected in the coffee axis and sterilized in the laboratory. The culture media were tested for callus induction, proliferation of protocormos type structures, development and maintenance of seedlings. Asymmetric germination in-vitro of collected seeds was achieved, three types of callus were obtained. After 7 months of cultivation, the seedlings reached between 1.1. The sterilization protocol of the capsules was validated as well as the protocol of preparation of medium, sowing and subculture, with respect to the results reported in the literature using conventional culture media. The results show that the modifications made in the MS culture medium, allow to reduce the costs of the culture medium by 10% and make it versatile, allowing the micropropagation and maintenance of seedlings of *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins; present in the coffee axis and the establishment of a germplasm bank for the conservation and production of high quality plant material derived from in vitro culture.

**Keywords:** Orchidaceae, Germplasm, asymbiotic germination, zygotic embryogenesis, protocormos, *Prosthechea fragrans*

## Introducción

Las orquídeas juegan un papel importante en los sistemas tradicionales de medicina, ya que poseen gran cantidad de sustancias importantes (Bai, 2015; S. N. T. M. N. Banerjee, 2013; Pradhan, Regmi, Ranjit, & Pant, 2016; Pradhan, Tiruwa, Subedee, & Pant, 2014; Utami, Hariyanto, & Manuhara, 2017) tales como flavonoides, triterpenos y saponinas (Mencias & Salazar, 2018). Estas especies sobresalen por su flor, la cual es la parte más atractiva de la planta, y la que más varía en su tamaño, poseen tres sépalos y tres pétalos; de estos dos

son iguales y el otro es la parte más llamativa y se denomina labelo; cuya función es la tracción de los insectos polinizadores, el polen es producido en la columna, y en la punta vamos a encontrar la antera; el polen está empaquetado (entre 4 y 8 paquetes) en masas denominadas polínios (Mencias & Salazar, 2018). Aunque las semillas de orquídea son muy abundantes, las orquídeas silvestres son bastante raras, ya que sus semillas están desprovistas de endospermo y se hace difícil su germinación en condiciones naturales (S. N. T. M. N. Banerjee, 2013; T. M. S. A. N. Banerjee, 2016; Hariyanto, 2015), lo que permite la conservación de

especies de orquídeas en peligro utilizando métodos in vitro. Esta situación muy similar al de otras especies de plantas y requiere superar los desafíos debido al poco material vegetal disponible (Ying Chena, 2015). Las técnicas de cultivo in vitro proporcionan un sistema práctico para la multiplicación de especies de interés (Bhutani, 2016; Fracchia & Sede, 2016; Hariyanto, 2015; Restanto, Santoso, Kriswanto, & Supardjono, 2016; Sameera, 2016; Vudala & Ribas, 2017). La recolección y almacenamiento de germoplasma de orquídeas permite una conservación ex situ segura (Merritt, Hay, Swarts, Sommerville, & Dixon, 2014). En 1984 en la Conferencia Mundial de Orquídeas de Miami se acordó que el banco de semillas de orquídeas tenía el potencial de hacer una contribución invaluable a la conservación (Pritchard, 2011). El interés mundial por la conservación de orquídeas coincide con tiempos prósperos para el cultivo in vitro. Existen muchas especies que están representadas por muy pocas poblaciones naturales y están amenazadas por la destrucción del hábitat en sus diferentes formas (Calderón Sáenz, 2006; Viji, 2013), muchas de ellas pertenecientes al género *Epidendrum* (sinónimo de *Prosthechea*) y registradas en el libro rojo de plantas de Colombia. El avance del conocimiento es la clave principal de las acciones relacionadas con la conservación y la exploración económica de los grandes bosques tropicales del mundo. La construcción de un escenario basado en información sobre biodiversidad puede tener como objetivo establecer un plan estratégico para el uso de especies de potencial económico, incluyendo orquídeas nativas (Oliveira; & Silva, 2016). Dentro de las metas del Plan de Acción para el Estudio y la Conservación de las Orquídeas de Colombia (Betancur, 2015), se establece como meta dentro de la primera línea de investigación, ampliar el conocimiento sobre la historia natural de las orquídeas (Pradhan et al., 2014); generar investigaciones sobre los diferentes tipos de reproducción y propagación de las orquídeas que exigen como resultado

publicaciones cuya responsabilidad recae en Universidades, instituciones de investigación, asociaciones de orquideología, jardines botánicos, empresa privada, Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias en un plazo no superior a 2024. También se debe garantizar la variabilidad genética de las especies de orquídeas nativas en bancos de germoplasma para su reproducción in vitro. Es importante incrementar el número de colecciones vivas de orquídeas, especialmente aquellas que hayan sido priorizadas o consideradas objeto de conservación. Se espera como resultado nuevas colecciones de germoplasma de especies nativas y también esta responsabilidad recae sobre los mismos entes enunciados anteriormente con plazo a 2025. Incluso existe una tercera línea de investigación que permite fomentar el cultivo a gran escala de orquídeas nativas; consiste en elaborar protocolos de propagación de orquídeas y sus micorrizas a través de métodos convencionales o in vitro estandarizados. Los resultados esperados corresponden a protocolos de propagación de plantas y micorrizas y es responsabilidad de los mismos entes citados en la primera línea de investigación (Betancur, 2015). Es así como los esfuerzos se dirigen al diseño de un medio versátil que permita la propagación de un gran número de géneros diferentes de la familia Orchidaceae con el fin de suministrar continuamente el material vegetal suficiente y satisfacer las necesidades de rotación propias de un banco de germoplasma. Buscando el éxito, este proceso debe ir acompañado de un protocolo de desinfección adecuado, siembra y subcultivo que garanticen toda la asepsia necesaria para desarrollar el cultivo in vitro de tejidos vegetales; en este caso la germinación asimbiótica de semillas de diferentes géneros (T. M. S. A. N. Banerjee, 2016; Bhutani, 2016; Chen, Goodale, Fan, & Gao, 2015; Gupta, 2016; Hariyanto, 2015; Vudala & Ribas, 2017; Ying Chena, 2015). Finalmente, se plantea el sistema de adaptación en campo para definir la última rotación de los tejidos vegetales en el banco de germoplasma, para ofrecer material vegetal de

alta calidad y capaz de sobrevivir con diferentes fuentes de carbono (Bhutani, 2016; Gupta, 2016).

## Materiales y métodos

### *Material Vegetal*

Se usaron cápsulas inmaduras de orquídeas epífitas de *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins, recolectadas en paisajes propios del eje cafetero, en áreas rurales del municipio de Pereira, Risaralda (Col), donde se presenta una precipitación media anual de 2750 mm y una altura sobre el nivel del mar que oscila entre 1250-1550 msnm, una temperatura media de 18,8 °C y una humedad relativa de 76,6 %. Las cápsulas fueron llevadas al laboratorio en bolsas de polietileno con cierre hermético, después fueron lavadas con detergente para luego sumergirlas en etanol al 70% durante 5 minutos. Posteriormente fueron lavadas con abundante agua y almacenadas en refrigerador a 6°C durante 24 horas.

### *Esterilización Superficial de las Cápsulas*

De acuerdo con estas observaciones, se realizó el siguiente protocolo de desinfección sobre cápsulas inmaduras: 2 Inmersiones en hipoclorito de sodio al 2,5%; concentración cercana a algunas publicadas en la literatura donde llegan a ser hasta del 4% (Bhutani, 2016); durante 5 minutos y enjuagues con abundante agua destilada desionizada estéril (ADDE) durante 2 minutos realizando la segunda parte en cabina de flujo laminar. Cabe resaltar la importancia de una etapa apropiada en la cual la cápsula debe ser cosechada (Gupta, 2016), de ahí que se hable de cápsulas inmaduras. En las referencias se encuentra que las cápsulas de semilla pueden ser cosechadas a los 75 días después de la polinización cruzada (Suh, 2016)

### *Apertura de Cápsulas y Siembra de Semillas*

Exposición de la semilla: se sostiene por la base y se realizan cortes longitudinales con bisturí quirúrgico a lo largo de las uniones

(Utami et al., 2017). Luego desde uno de los extremos se desprende la superficie de la cápsula sosteniéndola con firmeza de uno de los extremos. Se procede a desprender con una pinza las semillas que caen por efecto de la gravedad sobre la superficie del medio de cultivo. La estructura y el tamaño de la semilla se encuentran entre las características más llamativas de las orquídeas. Las semillas de orquídeas son muy pequeñas (0.05-6.0 mm de largo y 0.01-0.9 mm de diámetro), extremadamente ligeras, y se producen en gran cantidad (50-4,000,000 por cápsula) (Gupta, 2016). Una vez extraídas las semillas se tomó una muestra para observación obteniendo imágenes en microscopio compuesto marca Carl Zeiss Axio Scope A1. Para la siembra, se dispuso en la cabina de flujo laminar, lotes de 20 frascos con 25 ml de medio previamente esterilizados. Cada frasco fue flameado antes y después de destapar. Para esta etapa fue necesario el uso de una pinza dura para la firme sujeción de la cápsula y una piza blanda para la desagregación y liberación de semillas.

### *Germinación de semillas, Crecimiento y Desarrollo de Protocormos*

Para esta etapa del cultivo al igual que las demás, fue usado el medio MS (1962) suplementado con la composición de sacarosa 30 g/l, vitaminas Morel (1974), agua de coco al 10% (v/v), carbón activado 2g/l y 12 g/l de agar (Juan Carlos Bedoya-Pérez, 2016; Suh, 2016; Ying Chena, 2015).

utilizadas correspondieron a la potencia mínima del sistema (1,20 W/g) durante 100 min de secado con intervalos de pesada de muestras de 10 min.

En la Figura 1 se presenta un esquema de la secuencia de tratamientos realizados en el presente trabajo y en la Tabla 1 se detalla el diseño experimental donde se indican las codificaciones de las muestras y los tratamientos incluidos en cada experimento.



Composición 500 ml de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)			
Macronutrientes (sólido)		Vitaminas Morel (1 ± 0.8 ml)	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (g)	0,827 ± 0,001	Ácido Pantoténico(g)	0,054 ± 0,001
KNO <sub>3</sub> (g)	0,951 ± 0,001	Ácido Nicotínico (g)	0,056 ± 0,001
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (g)	0,222 ± 0,001	Piridoxina (g)	0,051 ± 0,001
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0,085 ± 0,001	Tiamina (g)	0,051 ± 0,001
Solución Stock Micronutrientes		Biotina (g)	0,00055 ± 0,001
Sln E (ml)	2,5 ± 0,030	Myoinositol (g)	5,002 ± 0,001
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (g)	0,623 ± 0,001	Otros componentes	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,252 ± 0,001	Sacarosa (g)	15,006 ± 0,001
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (g)	0,248 ± 0,001	Aguade Coco (ml)	50 ± 2
KI (g)	0,832 ± 0,001	Carbón Activado(g)	1 ± 0,001
Sln F (ml)	2,5 ± 0,030	Agar (g)	6,000 ± 0,001
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O(g)	0,378 ± 0,001	Condiciones del medio	
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O (g)	2,26 ± 0,001	pH	5,8 ± 0,001
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (g)	0,868 ± 0,001	Ajuste pH	HCl/NaOH 0,1N
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (g)	0,255 ± 0,001	Esterilización	86kPa, 120°C
Sln G (ml)	2,5 ± 0,030	Tiempo	15 minutos
EDTA (g)	3,77 ± 0,001	Volumen de medio por frasco	25 ml
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (g)	2,78 ± 0,001		

Tabla 1. Se presentan los valores medios y su respectiva desviación estándar así como detalles de la suplementación y otras condiciones referentes a la preparación del medio de cultivo.

Luego se procedió con la adición de agar en caliente, una vez la solución alcanzó los 65°C y finalmente el carbón activado. Este procedimiento fue acompañado por agitación constante en plancha de calentamiento. El medio se sirvió en caliente y esterilizó inmediatamente. Luego de enfriado se dispuso en la cabina de flujo laminar o en contenedores estériles dispuesto para su almacenamiento hasta el momento de la siembra incluso 2 semanas después de su preparación conservando intactas sus características.

Todos los procedimientos de preparación de soluciones stock y medios de cultivo se hicieron con material volumétrico y los pesos se tomaron en una balanza Æ ADAM. El pH se midió en un pH-metro marca JENWAY 3520 a  $5.8 \pm 0.001$  antes de esterilizar y el pH se ajustó con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N según el caso. Los detalles del procedimiento se consultaron en las referencias bibliográficas (Barbery

Knautd, 2011; Sameera, 2016; Suh, 2016). Los frascos de la siembra fueron dispuestos en la sala de cultivo a temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C y un fotoperiodo de 12:12 horas luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^2$ . Se rotaron periódicamente para una exposición homogénea a la fuente de luz durante un periodo de 120 días, momento en el cual toda el área superficial del medio de cultivo se encuentra ocupada por material vegetal. Los protocormos de 140 días de crecimiento fueron subcultivados en medio MS (1962) con iguales características al proceso de germinación de semilla; incluidos los suplementos. Después de comenzado el proceso, se preparó medio estéril que fue distribuido en lotes de 20 frascos cada uno. Y dispuestos en la cabina de flujo laminar para la siembra. Una vez sembrados, los frascos fueron dispuestos en la sala de cultivo a 25°C y un fotoperiodo de 12:12 luz/oscuridad.

Se usaron como blancos el medio sin semillas para verificar la contaminación y medio de cultivo sin endospermo de coco y con semilla para verificar la germinación sin obtener resultados positivos en ninguno de ellos. Incluso las plántulas subcultivadas en medio sin endospermo de coco murieron luego de 45 días de cultivo sin manifestar crecimiento alguno. El porcentaje de supervivencia se calculó con base en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\# \text{ Frascos con tejidos libres de contaminación}}{\text{Total de frascos sembrados}} \times 100$$

#### *Aclimatación.*

En cuanto a las especies epifitas, las plántulas con mejores raíces y apariencia en general fueron separadas de su frasco, algunas de ellas con 210 días y otras con 240 días de crecimiento. Dichas plántulas fueron transferidas a frascos de vidrio con fibra de coco finamente triturada ocupando el 40% del frasco. Los frascos fueron tapados con una película de polietileno para mantener una humedad alta. Las plántulas fueron regadas con agua de grifo 2 veces al día y mantenidas a la sombra con luz natural y en condiciones de invernadero. Con respecto a las especies

terrestres, las plántulas fueron transferidas a recipientes de barro con un soporte sólido natural con alto contenido de materia orgánica, cubierta natural de jardín y cascarilla de arroz.

#### *Análisis Estadístico*

Mediante el Análisis Estadístico Descriptivo realizado se tuvo en cuenta los parámetros de la desviación estándar y la media para establecer el comportamiento de variables tales como el porcentaje de supervivencia. Estos procedimientos se realizaron por medio de Microsoft Excel.

## Discusión

#### *Caracterización de las Semillas*

El tamaño de las cápsulas oscila entre 4.5-5.5 cm de largo y 1.0-2.0 cm de ancho. Las semillas fueron expuestas y desagregadas con facilidad con el uso de una pinza blanda cuando las cápsulas tenían menos de 48 horas de almacenamiento. Después de este periodo de almacenamiento, el interior de la cápsula presentaba alta humedad en comparación con una cápsula abierta el día de la recolección.

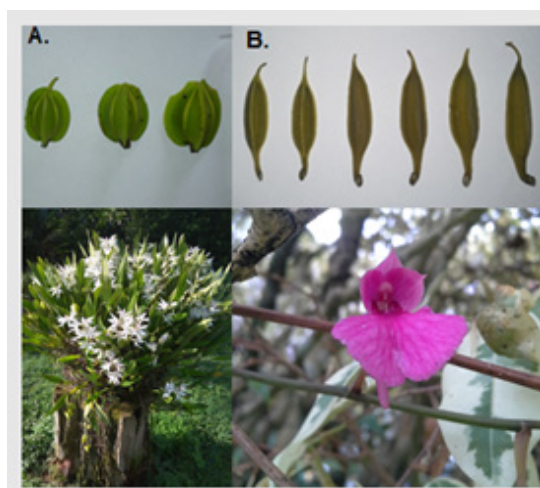


Figura 1. Cápsulas de orquídeas recolectadas en paisajes propios del eje cafetero. Las cápsulas de la Fotografía (A) tienen un tamaño entre 5.5-6.0 cm y corresponden a *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins, las cápsulas de la Fotografía (B) 4.5-5.5 cm referenciadas con Q.A. Elaboración propia.

Las imágenes obtenidas de cuerpos alargados en forma de huso (Figura 2) como las representaciones hechas por Arditti confirman la presencia de semillas de orquídeas (Tim Wing Yam, 2009).

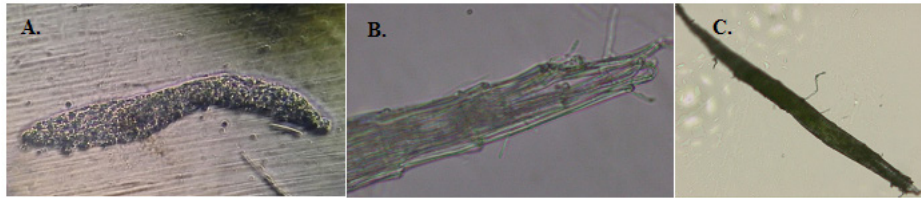


Figura 2. Fotografías de semilla de orquídeas recolectadas y observadas a través de microscopía. La parte A corresponde con las semillas de referencia (Q.A) mientras que La parte B y C corresponde a semillas de *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins. Elaboración propia.

### Germinación de Semillas

En cuanto a la respuesta de los tejidos al medio de cultivo empleado, todas las especies objeto de cultivo in vitro tuvieron éxito, con determinadas particularidades en cada caso, pero en todas ellas el resultado fue la embriogénesis cigótica por germinación asimbiótica de semilla. Luego de 8 meses de trabajo desde la siembra, con tres subcultivos en determinados casos; el material multiplicado es abundante.

El porcentaje de supervivencia en la siembra inicial; medido como el número de frascos libres de contaminación con evidencia de desarrollo en los tejidos vegetales, registró los siguientes valores: 25% para las cápsulas de *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins. y 58% para las cápsulas de referencia Q.A. Fue evidente la actividad fotosintética con la aparición de

tejidos verdes luego del primer mes en la sala de cultivo, y como tal, la germinación de las semillas, seguida por el rápido desarrollo de los protocormos en *Prosthechea fragrans*

(Sw.) W.E.Higgins, más lento en la referencia Q.A. Luego de 60 días los protocormos de *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins han colonizado casi por completo la superficie del medio hasta que después de 90 días el crecimiento es principalmente vertical y alcanzaron su máximo desarrollo hacia los 120 días de cultivo (Imagen A, B y C, Figura 3). Germinaron algunas semillas de la referencia Q.A., dejando gran parte del área superficial del medio disponible por lo que se cuentan algunos protocormos. Este factor influyó en la necesidad de subcultivo considerablemente (Imagen E, Figura 3).

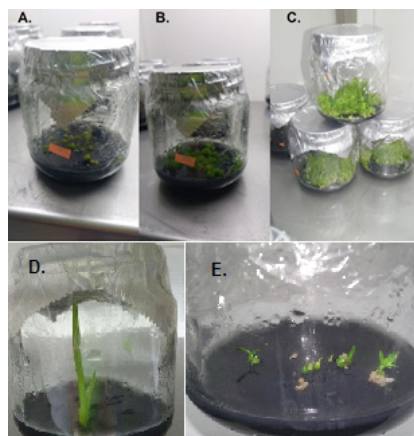


Figura 3. Germinación de 3 orquídeas recolectadas. Las imágenes A,B y C corresponden a *Prosthechea fragrans* (Sw.) W.E.Higgins., y E corresponde a la orquídea referenciada como Q.A. Elaboración propia.

### *Efectos del Medio de Cultivo en el Desarrollo de los Tejidos*

Con respecto a la tabla 1, es importante señalar que el orden de adición de los componentes fue el siguiente: sacarosa, macronutrientes, solución E (Sln E), solución F (Sln F) y solución G (Sln G), Vitaminas más y el agua de coco. Se debe aforar y medir el pH. Ajustado con NaOH 0,1 N en algunas ocasiones cuando el pH estaba por debajo de 5,8 para favorecer la solidificación del agar. Debido a que el agua de coco puede alterar el pH, es necesario ajustar el pH luego de añadirla.

#### *Subcultivo*

Para describir mejor los resultados obtenidos en el cultivo desarrollado presentamos la Figura 4 con la que se orienta sobre las diferentes variantes presentadas en los tejidos y las líneas celulares definidas.

La Figura 4 explica el proceso de cultivo *in vitro* en 10 pasos hasta que los tejidos abandonan la sala de cultivo. El paso 1 corresponde a la esterilización superficial de la cápsula y 2 considera la extracción de la semilla. El paso 3 considera la siembra de la semilla en el medio propuesto y 4 su disposición en la sala de cultivo con las condiciones previamente descritas. El paso 5 describe la primera evidencia de éxito con la germinación asimbiótica con la presencia de tejidos verdes producto de la actividad fotosintética hasta llegar al paso 6 donde se da la conversión en protocormos de germinación; luego llegamos al paso 7 donde aparece el proceso de organogénesis y tenemos las primeras plántulas de orquídeas. El paso 8 constituye el primer recambio de medio y la propagación masiva comienza al distribuir los tejidos de un recipiente (hasta 300 plántulas) varios considerando una distribución adecuada de 7 plántulas por frasco. Luego de un tiempo, las plántulas continúan con la

organogénesis y desarrollan un sistema radical y progresivamente van ganando tamaño en un proceso de desarrollo como se muestra en el paso 9. Finalmente las plántulas con mejor apariencia comienzan el paso 10 donde deben ser aclimatadas para su establecimiento en campo. A pesar de ser tejidos derivados de la misma cápsula, presentan diferente desarrollo resultando en tejidos muy diferentes. No obstante, el desarrollo descrito anteriormente no es el único. También se obtuvieron plántulas a partir del cultivo y repique de callos. De esta manera se describen dos formas de obtener plántulas: por embriogénesis cigótica directa o a través de repique y cultivo de callos que desarrollaron organogénesis y se transformaron en plántulas completas (Figura 5).

Los resultados obtenidos permiten demostrar que bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo, tres líneas de diferentes de callo se pueden llegar a diferenciar fácilmente por su color: verde, café y blanco. Todos ellos aparecen en lugares específicos en relación a otros tejidos. Normalmente están orientados hacia el polo basal de los tallos con hojas. Los callos color café aparecen aislados y con diámetros de hasta 0,5 cm. no desarrollan ningún tipo de organogénesis. Los callos verdes son los más grandes y se transforman fácilmente en grupos de plántulas (ver Figura 5). Los callos blancos también se transformaron en plántulas pero a una tasa menor en comparación con los callos verdes.



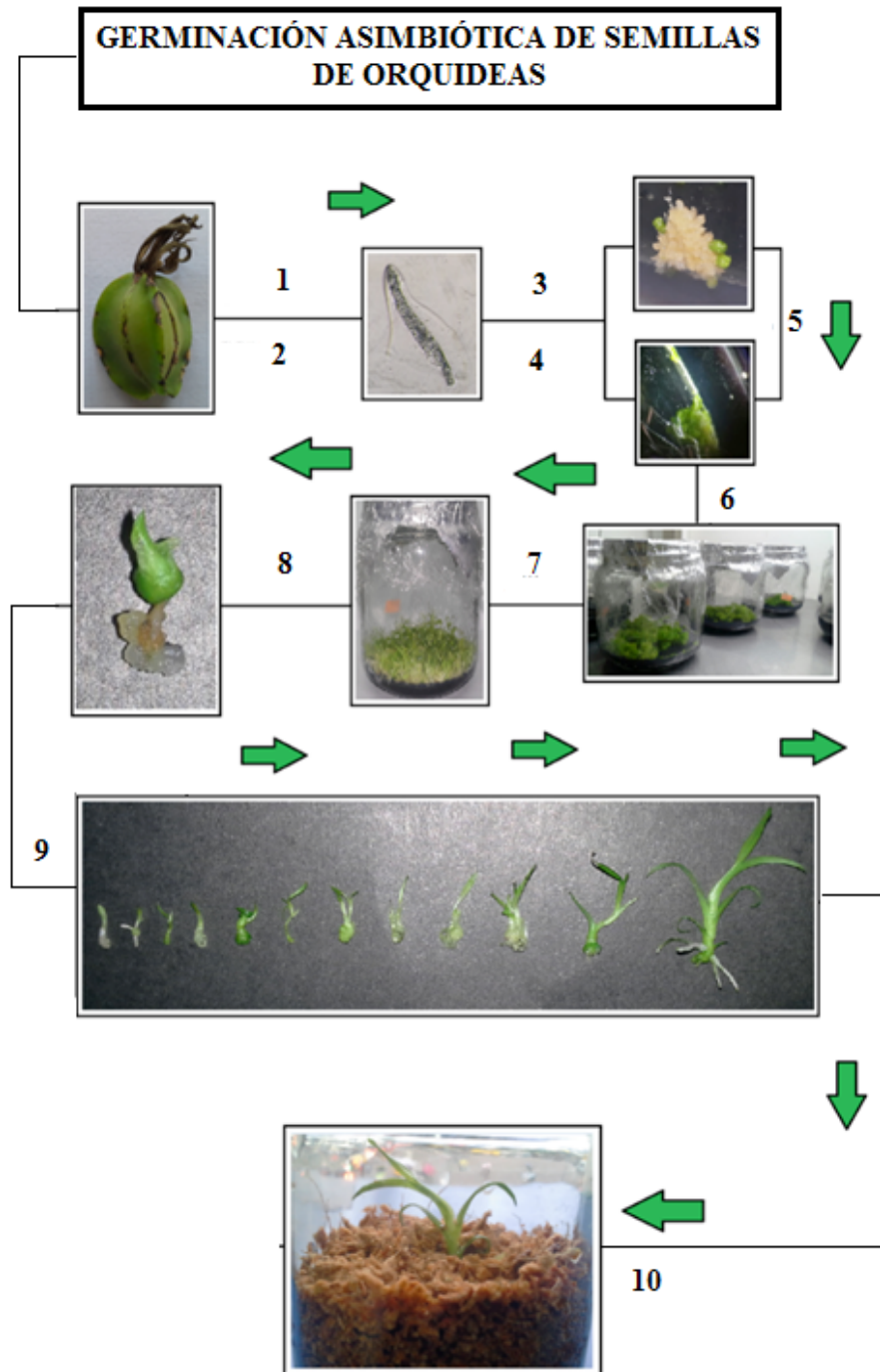


Figura 4. Descripción de las diferentes etapas de la germinación asimbiótica. Elaboración propia

Los resultados obtenidos permiten demostrar que bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo, tres líneas de diferentes de callo se pueden llegar a diferenciar fácilmente por su color: verde, café y blanco. Todos ellos aparecen en lugares específicos en relación a otros tejidos. Normalmente están orientados hacia el polo basal de los tallos con

hojas. Los callos color café aparecen aislados y con diámetros de hasta 0,5 cm. no desarrollan ningún tipo de organogénesis. Los callos verdes son los más grandes y se transforman fácilmente en grupos de plántulas (ver Figura 5). Los callos blancos también se transformaron en plántulas pero a una tasa menor en comparación con los callos verdes.

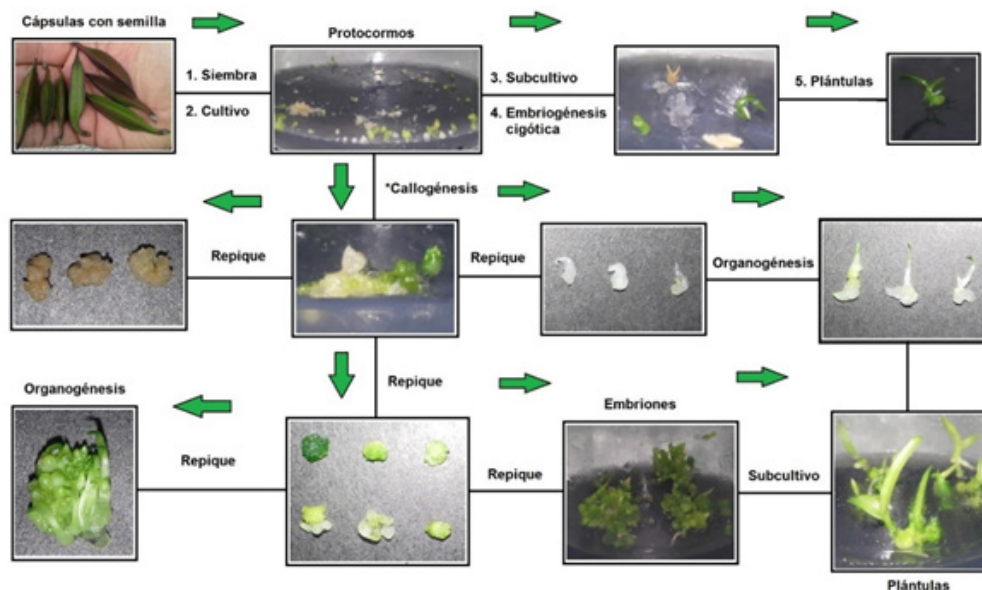


Figura 5. Líneas celulares y tejidos obtenidos en el cultivo in vitro de semillas de orquídeas. Elaboración propia.

En cuanto al rendimiento del cultivo, el porcentaje de supervivencia promedio fue del 86%. El comportamiento de esta variable se ilustra en la Figura 6.

Avanzado en subcultivos, el rendimiento mejora con los ajustes hechos en la manipulación

de tejidos, específicamente en el procedimiento de extracción del frasco de origen como se ilustra en la Figura 7. Se observa en la secuencia como se invierte en frasco para que los tejidos se extraigan a favor de la gravedad y evitando el ingreso de contaminación por la boca del frasco de cultivo.

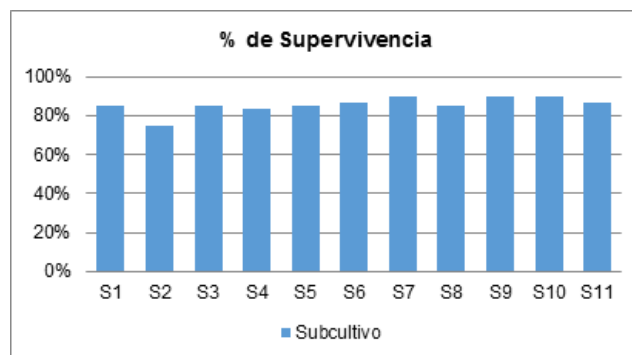


Figura 6. Comportamiento del % de supervivencia con base en el número de frascos libres de contaminación durante el cultivo en relación al número total de frascos subcultivados. Elaboración propia

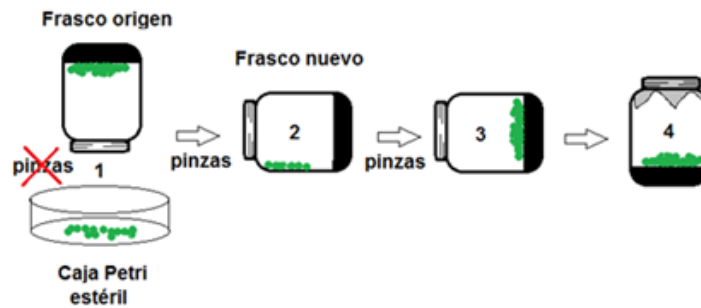


Figura 7. Ajustes realizados en el procedimiento de subcultivo para mejorar el rendimiento en función del número de frascos libres de contaminación al final del proceso. Elaboración propia.

## Conclusiones

El presente trabajo ha descrito la modificación eficiente del medio de cultivo MS (1962) y la suplementación efectiva de la regulación del crecimiento, con el fin de desarrollar un medio versátil que permita soportar el mayor número posible de especies para la creación de un banco de germoplasma. Así mismo, se estableció con éxito el protocolo confiable para la germinación el desarrollo y crecimiento de semillas de orquídeas de diferentes géneros contrario a lo expuesto en otras investigaciones donde afirman que los métodos de germinación asimbiótica in vitro tienen que ser desarrollados especie por especie puesto que las condiciones del cultivo de tejido en cada caso son en gran parte específicas de la especie (Ying Chena, 2015). La adopción de esta técnica in vitro de germinación asimbiótica de semillas puede servir para satisfacer la demanda de la industria de la floricultura, así como para fines de conservación.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) por su asistencia técnica y científica y en especial a Tecnoparque-SENA Nodo Pereira, organismo que además acompañó todo el proceso como principal fuente de financiación.

## Referencias

- Bai, N. P. D. B. L. N. (2015). Asymbiotic seed germination and mass multiplication of *Taprobanea spathulata* (L.) Christenson (Asparagales: Orchidaceae): a medicinally important epiphytic orchid. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 2(4), 16. <http://revista.rebibio.net>
- Banerjee, S. N. T. M. N. (2013). Asymbiotic seed germination and seedling development of *Vanda testacea* (Lindl.) Reichb. F.: An in vitro approach for optimization of cultural requirements for a medicinally important rare orchid. *International Journal of Current Research*, 5(4), 6. <http://www.journalcra.com>
- Banerjee, T. M. S. A. N. (2016). Role Of Plant Growth Regulators On Asymbiotic Seed Germination And Seedling Development Of *Vanda Coerulea* Griff. Ex Lindl. An Endangered Orchid. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 6(3), 6. <http://www.cibtech.org/jls.htm>

Barbery Knaut, R. M. B., Ingrid. (2011). *Manual para el Cultivo in vitro de la orquídea Cattleya nobilior* "Flor símbolo de Concepción". Santa Cruz, Bolivia: Centro para la Participación y el Desarrollo Humano Sostenible CEPAD - Bolivia.

- Betancur, J. S., Helena; Toro-González, Laura; Valencia, Janice. (2015). Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia. Bogotá D.C. Colombia.: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible; Universidad Nacional de Colombia.
- Bhutani, S. K. K. K. (2016). Asymbiotic seed germination and multiplication of an endangered orchid – *Paphiopedilum venustum* (Wall. ex Sims.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 85(2), 11. doi: 10.5586/asbp.3494
- Calderón Sáenz, E. (2006). Libro Rojo de Plantas de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
- Chen, Y., Goodale, U. M., Fan, X.-L., & Gao, J.-Y. (2015). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*, 3, 367-378. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.01.002>
- Fracchia, S. A.-R., Adriana; Rothen, Carolina, & Sede, S. (2016). Associated fungi, symbiotic germination and in vitro seedling development of the rare Andean terrestrial orchid *Chloraea riojana*. *Flora*, 224, 106-111. doi: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.07.008>
- Gupta, A. (2016). Asymbiotic Seed Germination in Orchids: Role of Organic Additives. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*, 3(5), 5. doi: 10.17148/IARJSET.2016.3530
- Hariyanto, E. S. W. U. H. P. T. S. S. (2015). Asymbiotic Seed Germination and in vitro Seedling Development of *Paphiopedilum liemianum* Fowlie, an Endangered Terrestrial Orchid in Northern Sumatra, Indonesia. *Journal of Plant Sciences*, 10(1), 10. doi: 10.3923/jps.2015.25.34
- Jualang Azlan, G., David, D., Marbawi, H., & Jawan, R. (2014). Asymbiotic seed germination and seedling development of *Vanda dearei* (Vol. 43).
- Juan Carlos Bedoya-Pérez, C. Y. S.-J., Sandra Milena Bermudez-Gómez, Sara Ramirez Restrepo. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo in vitro de *Aloysia tryphilla*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 9. doi: 10.18684/BSAA(14)38-46
- Mencias Méndez, H. F. & Salazar Ponce, T. F. (2018). Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea*. *Ingeniería En Biotecnología De Los Recursos Naturales*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito, Ecuador. 41 pp. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15932/1/UPS-QT13094.pdf>
- Merritt, D. J., Hay, F. R., Swarts, N. D., Sommerville, K. D., & Dixon, K. W. (2014). Ex Situ Conservation and Cryopreservation of Orchid Germplasm. *International Journal of Plant Sciences*, 175(1), 46-58. doi: 10.1086/673370
- Oliveira, F. J. d. F. L. J. M. F. d., & Silva, G. d. f. N. d. (2016). Orchid diversity at a residual plateau on Caroebe, Roraima. *CAMPINAS-SP*, 22(3), 5.
- Pradhan, S., Regmi, T., Ranjit, M., & Pant, B. (2016). Production of virus-free orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. by various tissue culture techniques. *Heliyon*, 2(10), e00176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00176>
- Pradhan, S., Tiruwa, B., Subedee, B. R., & Pant, B. (2014). In vitro germination and propagation of a threatened medicinal orchid, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. through artificial seed. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(12), 971-976.



doi: <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0369>

Pritchard, P. T. S. H. W. (2011). Orchid Seed Stores For Sustainable Use: A Model For Future Seed-Banking Activities. *LANKESTERIANA*, 11(3), 5.

Restanto, D. P., Santoso, B., Kriswanto, B., & Supardjono, S. (2016). The Application of Chitosan for Protocorm Like Bodies (PLB) Induction of Orchid (*Dendrobium* sp) In Vitro. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 462-468. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.164>

Sameera, P. R., C.K.; Srinivas T.R.; Riaz, Mahmood; Prashantha, K.M. (2016). In vitro seed germination of *Dendrobium macrostachyum*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(4), 8.

Suh, Y. S. H. J. K. L. S. Y. N. K. Y. P. G. U. (2016). Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives. *J Plant Biotechnol*, 43, 8. doi: <http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2016.43.1.138>

Tim Wing Yam, J. A. (2009). History of orchid propagation: A mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 3(1), 56. doi: <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0066-3>

Utami, E. S. W., Hariyanto, S., & Manuhara, Y. S. W. (2017). In vitro propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 406-410. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.011>

Vij, Y. N. H. B. S. A. N. R. S. P. (2013). Contributions to the Orchid flora of Manipur (India) – 1. *Pleione*, 7(2), 7.

Vudala, S. M., & Ribas, L. L. F. (2017). Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, 108, 1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.008>

Ying Chena, b., c, Uromi Manage Goodale a,b,d, Xu-Li Fan a,b, Jiang-Yun Gao. (2015). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*, 3, 12.