

MICROPROPAGACIÓN DE *Cattleya quadricolor*

ISABEL CRISTINA CADAVID CORREA

SANDRA SALAZAR ANDRADE

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2008

MICROPROPAGACIÓN DE *Cattleya quadricolor*

ISABEL CRISTINA CADAVID CORREA

SANDRA SALAZAR ANDRADE

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

Asesor: MSc. Cesar Augusto Hernández Rendón

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN
2008**

Nuestra naturaleza está en la acción. El reposo presagia la muerte.

(Séneca)

A nuestras familias, amigos y en especial a Dios por permitirnos alcanzar nuestras metas y hacer de nosotras las mujeres profesionales que hoy somos.

AGRADECIMIENTOS

CÉSAR AUGUSTO HERNÁNDEZ RENDÓN, por todo el apoyo que siempre nos brindó, por creer en este proyecto y guiarnos desde el inicio hasta el final de esta tesis, por hacernos creer en los cambios que se pueden alcanzar con la biotecnología y estar siempre atento a nuestras necesidades.

LUÍS FERNANDO RESTREPO B. Matemático Estadístico Especialista. Por su disposición y colaboración en el proyecto.

FRANCISCO VILLEGAS V, Primer Vicepresidente de La Sociedad de Colombiana de Orquideología. Por su colaboración con el material vegetal.

SIGIFREDO CÁRDENAS, Auxiliar del Laboratorio de Biotecnología. Por toda la ayuda prestada en el laboratorio de Biotecnología y por su atención a nuestras necesidades.

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, 24 de abril de 2008

TABLA DE CONTENIDO

	PÁG
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 LAS ORQUÍDEAS	4
2.1.1 Clasificación	6
2.1.2 Tipos de orquídeas	6
2.1.2.1 Orquídeas epífitas	6
2.1.2.2 Orquídeas semiterrestres	7
2.1.2.3 Orquídeas terrestres	7
2.1.3 Géneros más importantes	8
2.1.4 Características principales de las orquídeas	8
2.1.5 Plagas y enfermedades	11
2.1.5.1 Mancha foliar	11
2.1.5.2 Marchitamiento	11
2.1.5.3 Pudrición negra	11
2.1.5.4 Enfermedades bacterianas	11
2.1.5.5 Antracnosis	11
2.1.5.6 Mancha de las flores	12
2.2 GÉNERO <i>Cattleya</i>	12
2.2.1 <i>Cattleya quadricolor</i>	13

2.2.2	Características de la <i>Cattleya quadricolor</i>	15
2.2.2.1	Características de la planta	15
2.2.2.2	Características de la flor	15
2.3	FUNDAMENTOS DE LA GERMINACIÓN TRADICIONAL	
	E <i>IN VITRO</i>	16
2.3.1	Germinación simbiótica y asimbiótica de la semilla	16
2.3.2	Siembra de las semillas <i>in vitro</i>	17
2.3.2.1	Siembra a partir de cápsulas verdes	17
2.3.2.2	Siembra a partir de semillas secas	17
2.4	ANTECEDENTES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> CON ORQUÍDEAS	18
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1	LOCALIZACIÓN	21
3.2	ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL	21
3.3	TRATAMIENTO DE LA CÁPSULA	22
3.3.1	Desinfección de la cápsula	22
3.3.2	Apertura de la cápsula	22
3.4	MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN Y FORMACIÓN DE HOJA A PARTIR DE SEMILLA DE <i>C. quadricolor</i>	23
3.5	MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA RIZOGÉNESIS A PARTIR DE PROTOCORMOS DE <i>C. quadricolor</i>	24
3.6	DISEÑO ESTADÍSTICO	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1	EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN Y FORMACIÓN DE HOJA A PARTIR DE SEMILLA DE <i>C. quadricolor</i>	28

4.2 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN RADICULAR A PARTIR DE PROTOCORMOS DE <i>C. quadricolor</i>	35
5. CONCLUSIONES	44
6. RECOMENDACIONES	46
7. BIBLIOGRAFÍA	47
8. CIBERGRAFÍA	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación del porcentaje de germinabilidad de la semilla y del tamaño de la hoja en cm de *Cattleya quadricolor* con diferentes concentraciones finales del medio MS sin reguladores de crecimiento a los 30 y 60 días respectivamente.

Tabla 2. Distribución porcentual e intervalo de confiabilidad para la variable germinación de la semilla por tratamiento.

Tabla 3. Análisis descriptivo y comparativo entre los diferentes experimentos para la variable longitud de la hoja a los 60 días.

Tabla 4. Evaluación del promedio de la longitud radicular en cm de *Cattleya quadricolor* en el medio MS (1962) modificado, suplementado con agua de coco, jugo de piña y 0.5 mg/L de ANA a los 90 días.

Tabla 5. Análisis descriptivo y comparativo entre los diferentes experimentos para el desarrollo radicular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista general de una orquídea epífita.

Figura 2. Vista general de una orquídea semiterrestre del género *Paphiopedilum*.

Figura 3. Vista general de una orquídea terrestre del género *Phaius tankervilleae*.

Figura 4. Vista general *Cattleya quadricolor*.

Figura 5. Vista general *Cattleya quadricolor semialba*.

Figura 6. Cápsula de *Cattleya quadricolor* madura.

Figura 7. Cápsula abierta de *Cattleya quadricolor*.

Figura 8. (A). Semillas de *C. quadricolor* antes de ser sembradas en los diferentes medios de cultivo en los que se llevó a cabo la germinación. (B). Semilla germinada luego de 15 días de realizada la siembra en el medio MS completo sin la presencia de reguladores de crecimiento (Tratamiento 1).

Figura 9. Semillas de *C. quadricolor* germinadas a los 30 días en el medio MS completo sin la presencia de reguladores de crecimiento (Tratamiento 1). Se observan los cuerpos protocórmicos que posteriormente se llevaron a enraizamiento.

Figura 10. Protocormos de *C. quadricolor* desarrollados en el medio MS completo sin la presencia de reguladores de crecimiento (Tratamiento 1) a los 60 días después de realizada la siembra.

Figura 11. Semillas de *C. quadricolor* después de 30 días de realizada la siembra en el medio MS/2 y sin la presencia de reguladores de crecimiento (Tratamiento 2).

Figuras 12A y 12B. Presencia de raíces a los 15 días después del transplante de protocormos de *C. quadricolor* al medio MS modificado suplementado con agua de coco y sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 4).

Figuras 13A y 13B. Vitroplanta de *C. quadricolor* formada en el medio MS modificado suplementado con agua de coco y sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 4) a los 90 días de realizada la siembra de la semillas.

Figura 14. Proceso *in vitro* de la *C. quadricolor* desde la germinación de la semilla hasta la obtención de la planta completa a los 90 días de realizada la siembra de las semillas.

Figura 15. Vitroplanta de *C. quadricolor* en el medio MS modificado suplementado con agua de coco y sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 4) establecida *ex vitro* en corteza de pino pátula.

Figuras 16A y 16B. Raíces y vitroplantas de *C. quadricolor* desarrolladas en el medio MS modificado suplementado con agua de coco y 0.5 mg/L de ANA (Tratamiento 5) a los 90 días de realizada la siembra de las semillas.

Figura 17. Vitroplanta de *C. quadricolor* desarrollada en el medio MS modificado suplementado con jugo de piña y sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 6) a los 90 días de realizada la siembra de las semillas.

Figura 18. Vitroplanta de *C. quadricolor* totalmente seca en el medio MS modificado suplementado con jugo de piña y 0.5 mg/L de ANA (Tratamiento 7) luego de 90 días de realizada la siembra de las semillas.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de germinación de la semilla por tratamiento a los 30 días.

Gráfica 2. Promedio de longitud de la hoja por tratamiento a los 60 días.

Gráfica 3. Promedio de la longitud de la raíz en los tratamientos 4, 5, 6 y 7 a los 90 días después de realizada la siembra de las semillas.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Formulación para 500 ml de solución stock de MS (Murashige – Skoog, 1962) a una concentración 10X (Murashige *et al.*,1962).

ANEXO 2. Mediciones realizadas a las semillas germinadas y a la longitud de hoja en los tratamientos 1, 2 y 3 a los 30 y 60 días respectivamente luego de realizada siembra.

ANEXO 3. Procedimiento ANOVA para el análisis de la variable germinación

ANEXO 4. Procedimiento ANOVA para el análisis de la variable longitud de hoja.

ANEXO 5. Mediciones realizadas a la longitud de la raíz en los tratamientos 4, 5, 6 y 7 los 90 días luego de realizada siembra.

ANEXO 6. Procedimiento ANOVA para el análisis de la variable longitud de raíz.

RESUMEN

Se investigó la influencia del medio de cultivo MS (1962) a diferentes concentraciones finales para evaluar la formación del cuerpo protocórmico y la adición de agua de coco, jugo de piña y ANA para la formación de raíces. El material vegetal utilizado se obtuvo por donación de un coleccionista de orquídeas perteneciente a La Sociedad Colombiana de Orquideología. Las cápsulas de *Cattleya quadricolor* en estado de madurez se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2%, durante 3 minutos con dos gotas de Tween 20. Se obtuvo un porcentaje de germinación del 88% a los 30 días y una longitud promedio de hoja de 2.2608 cm en el cuerpo protocórmico a los 60 días al utilizar el medio MS (1962) completo y sin reguladores de crecimiento. Los cuerpos protocórmicos obtenidos fueron transferidos posteriormente al medio MS (1962) modificado suplementado con agua de coco en el cual se encontró el mejor promedio para la inducción de raíz a los 90 días de iniciado el cultivo. Las vitroplantas obtenidas se adaptaron bajo condiciones *ex vitro* utilizando como sustrato corteza de pino pátula, manteniéndolas a temperatura ambiente y protegidas de la luz solar.

Palabras claves: *Cattleya quadricolor*, estructuras protocórmicas, micropropagación *in vitro*, agua de coco, jugo de piña, ácido naftalenacético (ANA).

ABSTRACT

In this work was investigated the influence of the culture media MS (1962) at different concentrations to evaluate the final formation of the protocormic body and the addition of coconut water and pineapple juice with NAA to roots development. The plant material used was donated by a collector of orchids belonging to the Orchideology Colombian Society. *Cattleya quadricolor* capsules in a state of maturity were disinfected with sodium hypochlorite to 2%, for 3 minutes with two drops of Tween 20. The percentage of germination rate was 88 at 30 days and the average length of leaves in the protocormic body to 60 days was 2.2608 cm when using the MS (1962) media culture complete and without growth regulators. The protocormics bodies obtained were transferred to MS media (1962) supplemented with coconut water. In this media was found the best average for induction of root to 90 days of initiation of the crop. In the culture media MS (1962) supplemented with pineapple juice was not observed the roots induction efficiently. The vitroplantlets obtained were adapted under conditions *ex vitro* using as a substrate *patula pinus*, keeping them at environment temperature and protected from sunlight.

Keywords: *Cattleya quadricolor*, protocormics structures, *in vitro* micropropagation, coconut water, pineapple juice, Naftalenacetic acid (NAA).

INTRODUCCIÓN

La orquídea, gracias a sus flores exóticas, hace parte de una de las plantas de mayor demanda entre las ornamentales, y es además, la flor más representativa y conocida en el territorio Colombiano. Sin embargo, a muchas especies se les ha restado importancia en su conservación y propagación como es el caso de *Cattleya quadricolor*, la cual, ha sufrido maltrato en su nicho ecológico e incluso se le ha confundido con otras especies del mismo género (Chadwick *et al.*, 2001), por las condiciones anteriormente mencionadas entre otras, se le considera como una especie en vía de extinción (Herrera *et al.*, 2007).

Se estima que en Colombia existen aproximadamente 3500 especies pertenecientes a 248 géneros, de los cuales se hayan amenazadas 240 especies de 34 géneros (Pacheco *et al.*, 2001).

Es importante resaltar la importancia de los métodos que se han desarrollado para la propagación masiva de orquídeas a partir de semilla, protocormos y otros tejidos vegetales, ya que estos permiten la obtención de vitroplantas para la conservación de las especies amenazadas o a las cuales se les este realizando algún tipo de hibridización para generación de nuevas especies.

Con la técnica del cultivo *in vitro* se han podido desarrollar y establecer diferentes protocolos para la micropropagación y obtención de vitroplantas de diferentes especies de orquídeas, a pesar de esto y luego de una extensiva revisión bibliográfica, no se encontraron estudios realizados con *Cattleya quadricolor*, por tal razón, se orientó la investigación al desarrollo de un protocolo con el cual se puedan alcanzar la obtención de vitroplantas a bajo costo y en menor tiempo.

Con base en lo expuesto, se realizó este trabajo mediante el cual se obtuvo la micropropagación *in vitro* de la *Cattleya quadricolor* contribuyendo de esta manera a su conservación como especie en vía de extinción.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

1. Estandarizar un protocolo para la micropropagación de *Cattleya quadricolor*, que permita a partir de semillas la obtención de plántulas, y de esta manera participar en la conservación de la biodiversidad de la flora Colombiana.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el desarrollo *in vitro* de la semilla de *Cattleya quadricolor* para la germinación de semilla y la aparición de primordios foliares (hojas) en el medio Murashige - Skoog (1962) a diferentes concentraciones, realizando la medición del porcentaje de germinación y el promedio del tamaño de la hoja a los 30 y 60 días después de realizado el cultivo.
- Evaluar el efecto del medio MS suplementado con agua de coco y jugo de piña para el desarrollo radicular de *Cattleya quadricolor*, mediante el promedio de longitud de la raíz a los 90 días después de germinada la semilla.
- Evaluar el efecto que tiene la adición de Ácido Naftalenacético en una concentración de 0.5 mg/L en el desarrollo radicular de *Cattleya quadricolor*, mediante el porcentaje de presencia o ausencia de la raíz a los 90 días después de germinada la semilla.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LAS ORQUÍDEAS

La familia de las Orquídeas es la más grande del reino vegetal, con cerca de 30000 especies diferentes, dentro de las cuales, existen variadas formas, condiciones de cultivo, climas, etc., no obstante si todas están agrupadas en una sola familia, es porque botánicamente tienen caracteres comunes entre sí. Es necesario conocer su vida silvestre, sus características botánicas, sus necesidades fisiológicas de luz, alimento, humedad, etc. (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003).

Las orquídeas tienen dos tipos básicos de crecimiento: monopoidal, en las que el nuevo crecimiento se produce a partir de una yema apical en sentido vertical, y simpoidal, en las que el nuevo crecimiento se produce a partir de una yema axilar en sentido horizontal, como es el caso de *Cattleya quadricolor* (Tirado *et al.*, 2005 & Sociedad Colombiana de Orquideología *op cit*).

Las orquídeas tienen la ventaja evolutiva por tener microspermas, ya que poseen gran cantidad de semillas en un ovario; oscilando entre 300.000 y 1'000.000. (Vendrame *et al.*, 2007). Se estima que una cápsula de *Cattleya* puede contener entre 200.000 y 600.000 semillas, estas sólo son aprovechables naturalmente si hay presencia de sacarosa, suministrada por el hongo (micorriza) en simbiosis. (Sociedad Colombiana de Orquideología *op cit*).

Las orquídeas constituyen una familia botánica altamente evolucionada, distribuida desde el nivel del mar hasta el páramo y cumbres andinas. La mayoría son epífitas, sin embargo, las hay semiacuáticas, semiterrestres, terrestres y rupícolas. Se calcula que en Colombia existen aproximadamente 3500 especies

pertenecientes a 248 géneros dentro de los cuales cerca de 240 especies de 34 géneros se hayan amenazadas (Ávila *et al.*, 2006).

La familia Orchidaceae es una de las más diversas, pero también una de las más vulnerables, principalmente por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha estado sujeta (Pacheco *et al.*, 2001). Es necesario hacer hincapié en la explotación irracional a la cual han sido sometidas todas las plantas de esta familia, unido a las exigencias medio ambientales de estas para su reproducción y desarrollo natural, lo cual lleva a que muchas se encuentren amenazadas o en peligro de extinción (Rodríguez *et al.*, 2005).

La primera referencia que se tiene de las orquídeas en la historia la hace Confucio (551 - 479 AC). El filósofo griego Theophrastes (350 - 283 AC) fue quién bautizó la familia 'Orquidáceas' del latín Orchis y este del griego OPXIS que significa testículo, debido a su semejanza con los pseudobulbos. En 1818 el inglés William Cattley recibe un material botánico de Brasil, entre el cual llegan unas plantas desconocidas para él, cuya flor hace furor en Londres y son clasificadas por el botánico inglés Jhon Lindley, como orquídeas y en honor a Mr. Cattley se crea el género *Cattleya* (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003).

A partir de ese momento se inicia una despiadada y grotesca colecta de plantas, que aún no ha terminado, la cual acompañada de la irracional tala de bosques que sufre el mundo, ha puesto a esta familia, como tantas otras botánicas, al borde de la extinción (Sociedad Colombiana de Orquideología *op cit*).

2.1.1 Clasificación (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003.)

Reino: Vegetal.
Phylum: Fanerógamas.
Subphylum: Angiospermas.
Clase: Monocotiledóneas.
Orden: Microspermas.
Familia: Orquidáceas.

2.1.2 Tipos de orquídeas

2.1.2.1 Orquídeas epífitas

Las orquídeas epífitas constituyen más del 90% del total de especies (Figura 1)., Son las más vistosas, cuelgan de árboles o de arbustos y son las que encontramos a la venta normalmente. Proceden de las regiones tropicales. Sus necesidades son escasas y obtienen el agua de la humedad del aire con raíces aéreas, no son parásitas (articulos.infojardin.com, 2007).



Figura 1. Vista general de una orquídea epífita.

2.1.2.2 Orquídeas semiterrestres

Las orquídeas semiterrestres crecen sobre un colchón de hojas en descomposición en el suelo o sobre piedras recubiertas de musgo (Figura 2). Se incluyen los géneros *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Selenipedium* y *Cypripedium* (articulos.infojardin.com, 2007).



Figura 2. Vista general de una orquídea semiterrestre del género *Paphiopedilum* (Artículos.infojardin.com, 2007).

2.1.2.3 Orquídeas terrestres

Las Orquídeas terrestres tienen sus raíces en tierra. Incluye los géneros *Phaius tankervilleae*, *Bletilla striata*, *Calanthe vestita*, *Chloraea*, *Cranichis*, *Cyclopogon*, etc.



Figura 3. Vista general de una orquídea terrestre del género *Phaius tankervilleae* (Artículos.infojardin.com, 2007).

2.1.3 Géneros más importantes (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003.)

- *Cattleya*: *Cattleya. quadricolor*, *C. trianae*, *C. warscewiczii*, *C. aurea*, *C. mendelii*, *C. violacea*, *C. mossiae*, *C. guttata*, entre otras son las especies más destacadas en este género.
- *Phalaenopsis*.
- *Vanda*.
- *Dendrobium*.
- *Phaphiopedilum*.
- *Cymbidium*.
- *Oncidium*.
- *Mitoniopsis*.

2.1.4 Características principales de las orquídeas (Gómez *et al.*, 2008.)

Las orquídeas presentan varios rasgos diferenciales que las distinguen de otras plantas. Destaca especialmente la morfología del sistema radicular y de la flor:

- **Raíz:**

Las orquídeas carecen de raíz principal. El conjunto del sistema radical está formado por raíces secundarias que se originan a partir del tallo. Aunque varían en grosor, las raíces de las orquídeas monocotiledóneas son finas y fibrosas.

Una característica observable en la mayoría de las especies, es la presencia de velamen, que corresponde a la capa exterior de células, especialmente delgada, que han perdido su protoplasto al igual que la célula de la raíz. El velamen es un tejido esponjoso que rodea la raíz, y a pesar de que la función de este aún no está muy clara, se ha demostrado que las especies con raíces aéreas absorben agua y nutrientes a través de este tejido. En 1940, el fisiólogo Went, sugirió que la gran

importancia del velamen reside en su capacidad para capturar y retener la primera capa de agua (relativamente rica en minerales) que alcanzan las raíces cuando llueve.

- **Pseudobulbos:**

Son las dos protuberancias que se observan en la base de las hojas de las orquídeas epifitas. Uno de ellos, el más antiguo, pertenece a la estación anterior, el otro, más nuevo, pervivirá durante la estación en reposo. Entre ambos pseudobulbos se sitúa el rizoma.

- **Flores:**

Normalmente las flores de las orquídeas muestran simetría bilateral. Están constituidas por seis tépalos dispuestos en dos filas de tres. Uno de ellos, denominado labelo, se halla situado en la fila interior y es distinto a todos los demás, tanto en morfología como en color. Cuando la flor se desarrolla y sufre la resupinación (giro), el labelo queda en posición anterior. De acuerdo con las distintas especies que existen, también podemos encontrar distintos tipos de androceo (parte masculina de la flor) y gineceo (parte femenina de la flor).

El polen está aglutinado en una masa o polinio, una por cada lóculo de la antera; los polinios están unidos a un cuerpo adhesivo, denominado retináculo, mediante un pequeño filamento llamado caudícula.

Los estambres y el pistilo están soldados en una estructura llamada columna y entre ambos se sitúa un tejido estéril llamado rostelo.

Pese a la gran variedad de flores en la familia, todas tienen su diagrama floral idéntico así:

3 pétalos: 1 labelo
 2 pétalos

3 sépalos

Órganos sexuales fusionados formando una columna

Ovario infero

Los pétalos y los sépalos suelen ser semejantes, con excepción del labelo que es el más llamativo de todos. Los sépalos de aspecto petaloide pueden llegar a ser la parte llamativa de la flor (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003).

- **Fruto y semilla:**

El fruto de las orquídeas es una cápsula. Las semillas son muy numerosas y diminutas, tanto así que el viento se encarga de dispersarlas como si fuesen esporas. El albumen (sustancia de reserva) está prácticamente ausente en las semillas de las orquídeas. La polinización se produce por medio de insectos o aves, de manera altamente específica.

Existe una gran diversidad de semillas. En general son extremadamente pequeñas (0.3 - 0.5 mm), y se producen en cantidades muy grandes, que van desde varios miles hasta algunos millones en cada cápsula.

La semilla consta de una testa gruesa, que encierra un embrión formado por unas doscientas células. La cubierta tiene un aspecto exterior característico en forma de red.

2.1.5 Plagas y enfermedades (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003.)

Cuando las plantas están débiles, mal nutridas y mal cuidadas se convierten en el lugar propicio para el desarrollo de cualquier plaga o enfermedad. Estas son algunas de las que se pueden observar durante el crecimiento de la planta:

2.1.5.1 Mancha foliar: se presenta en plantas con exceso de sombra. El primer síntoma que se presenta es una mancha amarilla, hundida en el revés. Al progresar la mancha crece y se hace de color más oscuro pasándose del púrpura al negro.

2.1.5.2 Marchitamiento: en los primeros estados del desarrollo de la enfermedad, las hojas se tornan amarillas, los pseudobulbos se juntan y tuercen; las hojas más viejas son atacadas primero. El amarillento de las hojas empieza por los bordes y avanza hacia el centro.

2.1.5.3 Pudrición negra: afecta todo tipo de orquídeas. La más alta incidencia es observada en época húmeda. El hongo puede atacar cualquier parte de la planta causando la desintegración de los tejidos.

2.1.5.4 Enfermedades bacterianas: la más grave es la pudrición acuosa y hedionda, que progresa con gran rapidez en las plantas más jóvenes y lentamente en las maduras.

2.1.5.5 Antracnosis: esta enfermedad ataca cualquier parte de la planta, pero es más frecuente en las hojas y principalmente en las plantas débiles. El primer síntoma es la aparición de manchas amarillas, ligeramente deprimidas, de forma redondeada e irregular; al progresar la enfermedad las manchas crecen y se tornan de color pardo. Si no se controla la enfermedad cubre toda la planta y la mata

2.1.5.6 Mancha de las flores: la enfermedad se reconoce porque las flores aparecen salpicadas de pequeños puntos oscuros, que se acentúan y crecen con la edad de la flor, en algunos casos es posible observar un halo rojizo en las manchas y con una lupa pueden verse algunas vellosidades en la mancha (conidias del hongo).

2.2 GÉNERO *Cattleya*

El género de orquídeas mas conocido entre los aficionados y cultivadores comerciales es el de las *Cattleyas*. Este está compuesto por unas 50 especies, son epífitas y originarias de altas pendientes de Centro y Sur América (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003).

Las regiones donde son más abundantes las *Cattleyas* están situadas en las laderas de las montañas a alturas que varían entre los 600 y 1500 msnm (Arango, 1972).

Entre las *Cattleyas* se distinguen dos grupos: el primero que producen una sola hoja o labiata, que emerge de cada pseudobulbo y es aquí, donde se encuentran las flores más grandes. La altura promedio va desde 30.48 cm hasta los 45.72 cm, y su envoltura puede contener de uno a seis brotes, mientras las flores vienen de todos los colores, desde blanco hasta amarillo, rosado, azul, verde, lavanda y rojo. (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003 *op cit*).

El segundo, el de las bifoliadas son flores más pequeñas, de segmentos más angostos pero con un número mayor de flores en cada rama, tienen dos hojas emergiendo de cada pseudobulbo. En contraste con las labiadas, sus pétalos y sépalos algunas veces tienen marcas distintivas (Sociedad Colombiana de Orquideología *op cit*).

2.2.1 *Cattleya quadricolor*

Apareció por primera vez en 1848 cuando el botánico John Lindley vino a Colombia y envió a Inglaterra al cultivador de orquídeas Rucker una muestra de dicha planta, pero no tuvo relevancia. Por tal motivo esta se convirtió en una orquídea olvidada (Chadwick, 2001).

Años más tarde en 1873, Linden y André, en la publicación Belga “L’Illustration Horticole”, describen una nueva *Cattleya* de Colombia que llaman *Cattleya chocoensis*, la cual es la misma *C. quadricolor*, por ello siempre ha habido la confusión de su nombre, pero se ha establecido que la manera correcta de nombrarla es *C. quadricolor* (Chadwick *op cit*).

Esta especie crece bajo algunas condiciones inusuales para una *Cattleya*: áreas húmedas y pantanosas en las montañas, sobre árboles pequeños, donde a menudo son bañadas por densas nieblas (Chadwick *op cit*). Necesitan aire puro circulante para evitar enfermedades y plagas que la afectan y es necesario que cuenten con humedad ambiental del 70 al 80 % de humedad relativa, y entre 14 y 18 °C de temperatura ambiente (articulos.infojardin.com, 2007).

A diferencia de *C. trianae* y muchas otras especies de *Cattleya* de grandes flores, *C. quadricolor* es claramente una planta diferente, debido a sus distintivas flores medio abiertas, es simple distinguir una planta de *C. quadricolor* en un invernadero lleno de *C. trianae*. Como especie de *Cattleya*, la *quadricolor* tiene los colores usuales del grupo de flores grandes (Chadwick *op cit*).

La *C. quadricolor* es notable por sus flores de anchos pétalos, y se ajusta a muchos clones, los pétalos realmente se tocan o traslapan (Figura 4). El gran problema con *C. quadricolor* es que sus flores están siempre abriéndose, pero realmente nunca abren. A pesar de que tienen cuatro maravillosos colores que

hacen las flores de *C. trianae* tan apetecidas y populares, *C. quadricolor* permanece como un hijastro entre las especies de *Cattleya*. Sin embargo, cuando lo vemos en el más amplio sentido, *C. quadricolor* puede ser la más sabia de todas las especies de *Cattleya* de flores grandes. Sus flores medio abiertas en forma de campana tienen un importante mecanismo de supervivencia. Ellas atraen a insectos polinizadores como las avispas (Chadwick, 2001).

La *C. quadricolor* es vigorosa y tiene una gran resistencia a la pudrición de raíces. Usualmente saca un nuevo brote a finales de Febrero o principios de Marzo en los EE.UU., y completa el crecimiento a principios del verano. Normalmente hace un segundo crecimiento tan pronto como el primero se completa, y descansará hasta finales de Octubre antes de formar los botones en la vaina. La *C. quadricolor* florece a mediados de Diciembre justo antes de que *C. trianae* entre en floración.



Figura 4. Vista general *Cattleya quadricolor* (George, 2006).

Durante su período de crecimiento activo, debe recibir bastante sol, aire y riego (Chadwick *op cit*).

La *C. quadricolor* puede tolerar un sustrato más húmedo que las otras especies de *Cattleya*, y puede recibir riegos extras durante su período de crecimiento. Sin embargo, el sustrato nunca debe dejarse excesivamente húmedo o empapado

porque puede matar las raíces de la planta. La *C. quadricolor* debe replantarse justo después de florecer, tan pronto como las nuevas raíces aparezcan en el pseudobulbo líder (Chadwick, 2001).

2.2.2 Características de la *Cattleya quadricolor*

2.2.2.1 Características de la planta

Tamaño medio, unifoliada. Tiene entre 21.5 - 22.5 cm de altura comprendida en un único pseudobulbo y una hoja verde oscura de 30 cm que tiene flexibilidad. Los pseudobulbos descansan antes de producir las flores (Denson, 2007).

2.2.2.2 Características de la flor

Tiene un tamaño de flor de 17.5 cm. Son muy fragantes y se producen solo de dos a cuatro flores en un tallo.

La flor no abre completamente y tiene forma de campana, sus pétalos y sépalos son muy exuberantes. El color principal de la flor es blanco, rosado, amarillo y morado, aunque se encuentra una variedad solo blanca con amarillo conocida como semialba (Figura 5) (Denson *op cit*).



Figura 5. Vista general de la *Cattleya quadricolor semialba* (Séller, 2007).

2.3 FUNDAMENTOS DE LA GERMINACIÓN TRADICIONAL E *IN VITRO*.

2.3.1 Germinación simbiótica y asimbiótica de la semilla

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).

- **Germinación simbiótica.**

Las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo micorriza apropiada. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que espera alimento al protocormo hasta que este produzca hojas y se vuelva autotrófico.

Utiliza como medio de siembra avena en polvo con una pequeña cantidad de extracto de levadura (McKendrick, 2000).

- **Germinación asimbiótica.**

Se usa usualmente para la propagación de orquídeas tropicales. El medio utilizado consiste en nutrientes orgánicos e inorgánicos e igualmente azúcares en cantidades disponibles suficientes (McKendrick, 2000).

2.3.2 Siembra de las semillas *in vitro*.

2.3.2.1 Siembra a partir de cápsulas verdes

Mediante la germinación *in vitro*, se reproducen semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan. Hay dos tipos básicos de germinación *in vitro*: simbiótica y no simbiótica (McKendrick, *op cit*).

Se le llama cápsula verde a aquella que ha madurado aproximadamente un 80% del tiempo normal.

Es el método de siembra más fácil, porque la semilla dentro de la cápsula verde está libre de gérmenes. Esta debe cepillarse y lavarse por fuera con solución de hipoclorito antes de introducirla a la cámara de flujo laminar. Dentro esta se abre la cápsula longitudinalmente con una cuchilla o instrumento de extremo agudo; se toman los cúmulos de semilla, se llevan al frasco de siembra y se distribuyen sobre la superficie del agar (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2003).

2.3.2.2 Siembra a partir de semillas secas

Una vez abierta la cápsula, las semillas dejan de ser estériles y requieren un proceso de esterilización. Las semillas se agitan dentro de una solución de hipoclorito de sodio con una gota de Tween 20 para humedecerlas, luego se lava con agua destilada y se les siembra en el medio de cultivo determinado.

Las semillas se pueden conservar durante meses en el refrigerador y luego ser utilizadas (McKendrick, 2000).

2.4 ANTECEDENTES DE CULTIVO *IN VITRO* CON ORQUÍDEAS

Existen numerosas investigaciones del cultivo *in vitro* de orquídeas, sin embargo estos se han llevado a cabo con otras especies y además se ha partido de otro tipo de material vegetal para poder ser realizados, como protocormos, meristemos, hojas, pétalos y pseudobulbos entre otros. A continuación se presentan algunas investigaciones realizadas para el cultivo *in vitro* de diferentes especies de orquídeas.

En cuanto a trabajos realizados de cultivo *in vitro* a partir de semilla, Vendrame *et al.*, (2007) evaluaron la germinación de semillas maduras de híbridos de *Dendrobium*. Las semillas se sembraron en el medio MS (1962) a la mitad de su concentración final con la adición de 58.5 mM de sacarosa, observando la germinación de las semillas entre las 6 - 16 semanas. Posteriormente se realizaron el transplante de las semillas germinadas al mismo medio con la adición de Coco Gro-Brinck como sustrato.

Sheelavantmath *et al.*, (2000) realizaron el cultivo *in vitro* a partir de semillas de *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr, las cuales fueron sembradas en medio Knudson C (1946) obteniendo cuerpos protocórmicos (PLB) con la adición de agua de coco al 10 % v/v. A las cuatro semanas, se desarrollaron los rizomas que posteriormente fueron usados como explantes en el medio MS (1962) y en medio Knudson C (1946), suplementados con 2 % de sacarosa, 0.8 % agar, 0.1 % carbón, citoquininas (BA y Kin) y ANA a diferentes concentraciones respectivamente. Los explantes desarrollaron múltiples brotes, los cuales fueron posteriormente transplantados al medio MS (1962) suplementado con 0.1 % de carbón activado.

Adicionalmente, Kishor *et al.*, (2006) realizaron cultivos *in vitro* a partir de semilla en el medio Vacin y Went (Vacin - Went, 1949), con 2 % w/v de sacarosa y 15 %

v/v de agua de coco, ANA, BAP y KN; con el fin de germinar la semilla. Las semillas germinadas fueron transplantadas en el medio Knudson C (1946) y MS/2 (1962), cada uno de ellos suplementado con ANA, BAP y Kin. Se observó hojas y raíz a los 150 días.

Para el caso de cultivo *in vitro* a partir de protocormo, Tirado *et al.*, (2005) utilizaron el medio MS (1962) a la mitad de su concentración final suplementado con TDZ (Thidiazuron) y diferentes concentraciones de sacarosa. Utilizaron el sistema de inmersión temporal (RITA[®]) y la especie *Phalaenopsis* (Orchidaceae).

Para el cultivo *in vitro* a partir de brotes, Martín *et al.*, (2006) utilizaron explantes de híbridos de *Dendrobium*, en medio MS/2 (1962) suplementado con diferentes concentraciones de BA, Kin ó combinación de BA con ANA. Para la inducción de raíz utilizaron MS/2 (1962) suplementado con carbón activado, sacarosa a un pH de 5.5. Lograron determinar que el ANA no incrementó la inducción de brotes.

Huang *et al.*, (2001) utilizan brotes de *Paphiopedilum* transplantados al medio Huang (Huang 1988) para incrementar el número de explantes. El medio inicial utilizado fue MS (1962) suplementado con vitaminas MT (Murashige - Tucker, 1969), BA, ANA y agua de coco. Observaron que las auxinas no tienen un efecto benéfico para la formación de brotes.

A partir de meristemos, Arditti *et al.*, (1993) utilizaron el medio de iniciación de Vacin y Went (1949), y el de Lindemann (1970). Posteriormente los explantes se subcultivaron en el medio de mantenimiento con 5 a 10% v/v de agua de coco para aumentar la velocidad de proliferación de brotes.

Con la ejecución de este trabajo, se logró estandarizar un protocolo que permitió la obtención de vitroplantas de *C. quadricolor* a partir de la siembra de semillas, brindando de esta manera la posibilidad de crear mercado a nivel local, nacional e

internacional y además conservar una de las especies más importantes de la familia Orchidaceae que actualmente se encuentra en vía de extinción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

La apertura de la cápsula de *Cattleya quadricolor*, siembra de las semillas y establecimiento del cultivo *in vitro*, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT Medellín, Colombia, a 1.420 msnm con una temperatura ambiente promedio de 25°C.

3.2 ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron cápsulas de la variedad *Cattleya quadricolor* de las cuales se extrajeron las semillas que posteriormente se sembraron bajo condiciones estériles. Este material fue proporcionado por el Dr. Francisco Villegas, 1er Vicepresidente de La Sociedad Colombiana de Orquideología y cultivador tradicional de *Cattleya quadricolor* (Figura 6).

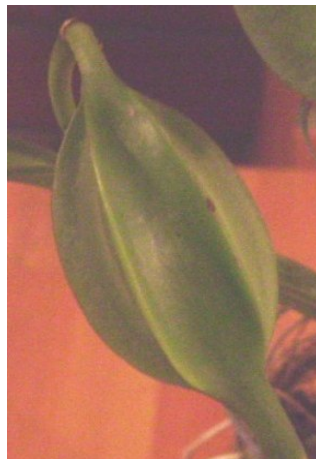


Figura 6. Cápsula de *Cattleya quadricolor* madura.

3.3 TRATAMIENTO DE LA CÁPSULA

3.3.1 Desinfección de la cápsula.

La cápsula de *Cattleya quadricolor* en estado de madurez (antes de que se presente el fenómeno de la dehiscencia), fue lavada mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 3 minutos con dos gotas de Tween 20 (Sigma[®]), posteriormente se realizaron dos enjuagues para eliminar el exceso de detergente con agua destilada estéril de acuerdo con la metodología propuesta por Lo *et al*, (2004a).

3.3.2 Apertura de la cápsula.

La cápsula se abrió longitudinalmente con la ayuda de un bisturí previamente desinfectado dentro de la cámara de flujo laminar (CABINA FLOW[®]), se extrajeron las semillas y se sembraron en los diferentes medios de cultivo distribuyéndolas homogéneamente con la ayuda de una asa de aro (Figura 7).

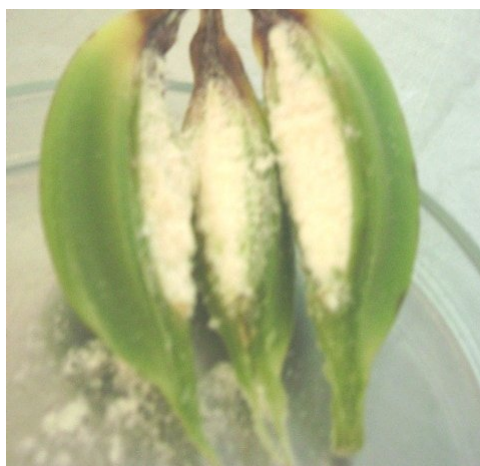


Figura 7. Cápsula abierta de *Cattleya quadricolor*.

3.4 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN Y FORMACIÓN DE HOJA A PARTIR DE SEMILLA DE *C. quadricolor*

Se evaluó el desarrollo germinativo de las semillas y la presencia de hojas a los 30 y 60 días respectivamente mediante la realización de los siguientes experimentos:

Experimento 1:

Efecto del medio Murashige Skoog (1962) completo y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Se sembraron las semillas de *C. quadricolor* en el medio MS (1962) completo (Anexo 1), suplementado con sacarosa (30 g/L), phytigel (2 g/L), con un pH de 5.5 y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Experimento 2:

Efecto del medio Murashige Skoog (1962) a la mitad de la concentración final y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Se sembraron las semillas en el medio Murashige Skoog (1962) a la mitad de su concentración final (MS/2), suplementado con sacarosa (30 g/L), phytigel (2 g/L), con un pH de 5.5 y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Experimento 3:

Efecto del medio Murashige Skoog (1962) a la cuarta parte de la concentración final y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Se sembraron las semillas en el medio Murashige Skoog (1962) con la cuarta parte de su concentración final (MS/4) suplementado con sacarosa (30 g/L), phytigel (2 g/L), con un pH de 5.5 y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Una vez realizados los ensayos anteriormente mencionados, se procedió a evaluar en cada uno el porcentaje de semilla germinada a los 30 días y el promedio del tamaño de la hoja en cm a los 60 días.

3.5 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA RIZOGÉNESIS A PARTIR DE PROTOCORMOS DE *C. quadricolor*

Se evaluó el desarrollo radicular a los 90 días de los protocormos obtenidos a los 60 días mediante la realización de los siguientes experimentos:

Experimento 4:

Efecto del medio MS (1962) modificado suplementado con agua de coco y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Se sembraron protocormos individualizados en el medio MS (1962) modificado (0.033 g/L de mioinositol) y suplementado con agua de coco en una concentración del 10% v/v (100 ml de agua de coco en 1 L de medio de cultivo), sacarosa (30 g/L), phytigel (2 g/L) a un pH de 5.5 y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

El agua de coco se obtuvo de cocos maduros de aproximadamente 1.2 kg comprados en el mercado local. El agua extraída fue refrigerada en una nevera convencional Philips Polarix®. Se almacenó durante 8 horas a 4 °C, posteriormente se filtró utilizando una bomba de filtración BÜCHI® y se adicionó al medio de cultivo.

Experimento 5:

Efecto del medio MS (1962) modificado suplementado con agua de coco y Ácido Naftalenacético (ANA).

Se sembraron protocormos individualizados en el medio MS (1962) modificado (0.033 g/L de mioinositol) y suplementado con agua de coco en una concentración del 10% v/v (100 ml de agua de coco en 1 L de medio de cultivo), sacarosa (30 g/L), phytigel (2 g/L) a un pH de 5.5 y con la presencia de ANA en una concentración de 0.5 mg/L.

Experimento 6:

Efecto del medio MS (1962) modificado suplementado con jugo de piña y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Se sembraron protocormos individualizados en el medio MS (1962) modificado (0.033 g/L de mioinositol) y suplementado con jugo de piña en una concentración del 10% v/v (100 ml de jugo de piña en 1 L de medio de cultivo), sacarosa (30 g/L), phytigel (2 g/L) a un pH de 5.5 y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

De una piña madura, se pesaron 300 g y se mezclaron con 0.5 L de agua destilada en una licuadora Oster® convencional. El jugo obtenido se filtró utilizando

un tamiz de 0.5 μ con el propósito de retirar el bagazo y el líquido se adicionó al medio de cultivo.

Experimento 7:

Efecto del medio MS (1962) modificado suplementado con jugo de piña y Ácido Naftalenacético (ANA).

Se sembraron protocormos individualizados en el medio MS (1962) modificado (0.033 g/L de mioinositol) y suplementado con jugo de piña en una concentración del 10% v/v (100 ml de agua de coco en 1 L de medio de cultivo), sacarosa (30 g/L), phytigel (2 g/L) a un pH de 5.5 y con la presencia de ANA en una concentración de 0.5 mg/L.

Una vez realizados los ensayos anteriormente mencionados, se procedió a evaluar en cada uno el promedio de la longitud de la raíz en cm a los 90 días.

3.6 DISEÑO ESTADÍSTICO

Se empleó un diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado, efecto fijo balanceado con 50 replicaciones por tratamiento, donde se tuvo como variables respuesta porcentaje de germinación, longitud de hoja y longitud de raíz. Se empleó la transformación arcoseno para la variable porcentaje de germinación con el objetivo de convalidar los supuestos estadísticos asociados con el diseño de clasificación experimental. Para contrastar el efecto de los diferentes tratamientos, se utilizó la prueba de Tukey con base en un nivel de significancia estadística del 5%. Adicionalmente se realizó un análisis descriptivo de carácter unidimensional para la variable longitud tanto de raíz como de hoja, con el objetivo de establecer la media aritmética, la desviación típica y el coeficiente de variación. Para la variable germinabilidad se estableció la distribución de frecuencia por

tratamiento complementado con el análisis inferencial, teniendo en cuenta un 95% de confiabilidad. Se procesó en el paquete estadístico SAS versión 8.2

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN Y FORMACIÓN DE HOJA A PARTIR DE SEMILLAS DE *C. quadricolor*

Se realizaron tres ensayos diferentes con el propósito de obtener la inducción de la germinación y la formación de hojas a partir de semillas de *C. quadricolor*, utilizando el medio MS (1962) completo, a la mitad (MS/2) y a la cuarta parte (MS/4) de su concentración final sin la presencia de reguladores de crecimiento.

El proceso de germinación de la semilla y la aparición de hojas se evaluó a los 30 y 60 días respectivamente.

La germinación de las semillas de orquídeas, según Arditti (1967) y Pierik (1990) se puede describir 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.
- Formación de una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células, y sobre aquel se puede distinguir un meristemo del vástago.
- Luego se diferencian los órganos (meristemo del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comenzando un período de crecimiento intenso.
- Si el protocormo está expuesto a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo se desarrollan las hojas.

En el tratamiento 1 (MS completo) se observó que la semilla una vez extraída de la cápsula y en el momento de la siembra en el medio de cultivo, presentó una coloración amarilla (Figura 8A), tornándose a un color verde a los 15 días (Figura

8B), acompañado este cambio de un engrosamiento de la semilla, lo cual es una manifestación de la iniciación del proceso de germinación, lo que igualmente fue observado en el trabajo realizado por Vendrame (2007) y Kishor (2006). Posteriormente, a los 30 días se observó la aparición de protocormos (Figura 9) a partir de los cuales a los 45 días, se inició la aparición de los brotes foliares, proceso que se manifestó de una forma directa, es decir, sin observarse la formación de callo. A los 60 días ya se tenían hojas emergentes de un rizoma grueso y los protocormos totalmente desarrollados fueron trasplantados a otros medios para inducir el enraizamiento (Figura 10).

En este tratamiento se observó un porcentaje de germinación de la semilla del 88% a los 30 días y un promedio de longitud de la hoja de 2.2608 cm a los 60 días como se observa en la Tabla 1.

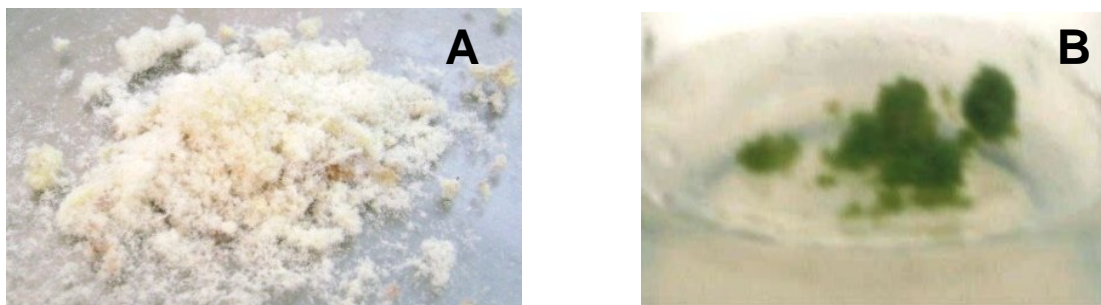


Figura 8. (A). Semillas de *C. quadricolor* antes de ser sembradas en los diferentes medios de cultivo en los que se llevó a cabo la germinación. (B). Semillas de *C. quadricolor* germinadas luego de 15 días de realizada la siembra en el medio MS completo sin la presencia de reguladores de crecimiento (Tratamiento 1).



Figura 9. Semillas de *C. quadricolor* germinadas a los 30 días en el medio MS completo sin la presencia de reguladores de crecimiento (Tratamiento 1). Se observan los cuerpos protocórmicos que posteriormente se llevaron a enraizamiento.



Figura 10. Protocormos de *C. quadricolor* desarrollados en el medio MS completo sin la presencia de reguladores de crecimiento (Tratamiento 1) a los 60 días después de realizada la siembra.

Tabla 1. Evaluación del porcentaje de germinabilidad de la semilla y del tamaño de la hoja en cm de *Cattleya quadricolor* con diferentes concentraciones finales del medio MS, y sin reguladores de crecimiento a los 30 y 60 días respectivamente.

Tratamientos	Porcentaje de semilla germinada a los 30 días	Promedio longitud de hoja en cm a los 60 días.
1. MS completo	88	2.2608
2. MS/2	64	0.9766
3. MS/4	54	0.5704

El tratamiento 2 (MS/2) mostró un comportamiento similar al tratamiento 1, sin embargo en el tratamiento 2, el engrosamiento de las semillas y la coloración verdosa se manifestó en una menor proporción, lo cual está íntimamente relacionado con la disminución de la germinación (Figura 11), observando a los 30 días una germinación equivalente al 64%, y un promedio de longitud de la hoja a los 60 días de 0.9766 cm (Tabla 1), valores inferiores a lo encontrado en el tratamiento 1.



Figura 11. Semillas de *C. quadricolor* después de 30 días de realizada la siembra en el medio MS/2 y sin la presencia de reguladores de crecimiento (Tratamiento 2).

En el tratamiento 3 (MS/4) se observó un porcentaje de germinación a los 30 días y un promedio de longitud de la hoja a los 60 días mucho menor comparado con los tratamientos 1 y 2, equivalente al 54% y al 0.5704 cm respectivamente

(Tabla1), lo cual esta directamente relacionado con la presencia de callo en este tratamiento.

Las mediciones realizadas a los tratamientos 1, 2 y 3 se muestran en el Anexo 2.

Con base en estos resultados se observó que el porcentaje de germinación y aparición de hojas a los 30 y 60 días respectivamente, fue mayor en el tratamiento 1 seguido del tratamiento 2 y por último del tratamiento 3, lo cual indica que para el proceso de germinación y formación de hoja, la semilla de *C. quadricolor* requiere de las sales basales y vitaminas del medio de cultivo MS (1962) completo, y que posiblemente no sea necesaria la utilización de hormonas de crecimiento tal y como lo reportan los estudios realizados por Ávila (2006), Yamazaki (2006) y Vendrame (2007), lo cual disminuye de alguna manera los costos de producción permitiendo entregarle al consumidor una especie en vía de extinción sana y a menor costo.

En estudios realizados por Ávila *et al.*, (2006), encontraron que el medio MS (1962) completo sin reguladores de crecimiento, es un medio óptimo para que se produzca la germinación del 100% de las semillas entre los 30 y los 45 días después de la siembra, tal como se observó en este trabajo; sin embargo, estos autores reportan igualmente que el tiempo y el porcentaje de germinación tiene relación directa con la especie o variedad de orquídea con la que se trabaje.

Lo *et al.*, (2004b), evaluaron el medio MS (1962) completo para la inducción de germinación de la semilla, encontrando la aparición de estructuras protocórmicas verdes y blancas a los 84 días después de realizada la siembra y de cuerpos protocórmicos a los 112 días. Además, establecen que el medio MS completo y el MS/2 de su concentración final, son efectivos para la germinación de semillas de cápsulas de diferente tiempo de maduración.

En estudios realizados por Vendrame *et al.*, (2007), utilizando el medio MS/2 (1962) de su concentración, observaron la germinación de las semillas entre los 45 y los 90 días después de realizada la siembra, con un porcentaje de germinación del 48%, siendo estos resultados bastante diferentes a los encontrados en el tratamiento 2 de este trabajo, que sin haber sido el mejor, se observó un porcentaje de germinación del 64% a los 30 días.

Tirado *et al.*, (2005), utilizaron el medio MS (1962) a la mitad de su concentración con 5 mg/L de Thidiazuron (TDZ) para la germinación de semillas de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). Con este medio de cultivo, obtuvieron una tasa de germinación de las semillas del 80%. Luego de determinar el mejor medio para la propagación *in vitro* de la orquídea tratada, observaron que un tercio de los protocormos obtenidos presentaron signos de vitrificación.

En este trabajo se observó que al utilizar el medio MS (1962) a la mitad de su concentración final (Tratamiento 2) y sin la presencia de reguladores de crecimiento, se obtuvo un porcentaje de germinación del 64% pero sin presentarse el fenómeno de vitrificación, lo cual está directamente relacionado con altas concentraciones de citoquininas como el TDZ.

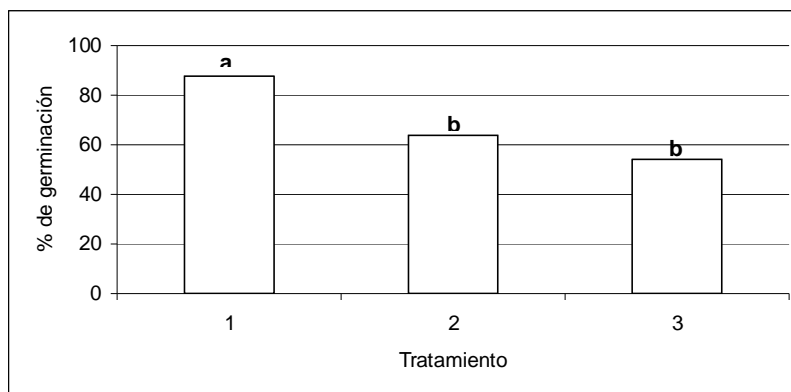
De acuerdo con los análisis estadísticos basados en $\bar{X} \pm \text{Std}$, Cv y la Prueba de Comparación de Tukey (Tabla 2 y Gráfica 1), se pudo establecer para el tratamiento uno con base en un 95% de confiabilidad, que el porcentaje de germinabilidad de la semilla oscila entre (79 - 97%) para el tratamiento 1, para el tratamiento 2 entre el (51 - 77 %), y para el tratamiento 3 entre (40 - 68%). Lo anterior implica que desde el punto de vista inferencial, el tratamiento uno fue el que mejor comportamiento presentó al evaluar los límites de confiabilidad, mientras que el tratamiento tres, presentó el menor porcentaje efectivo de potencial de germinabilidad.

Al efectuar el análisis de varianza con base en los datos del Anexo 3 para la variable germinabilidad, se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento uno con respecto a los demás tratamientos sometidos a experimentación.

Tabla 2. Distribución porcentual e intervalo de confiabilidad para la variable germinación de la semilla por tratamiento.

Tratamientos	% de Germinación	% de no Germinación	Límite Inferior	Límite Superior
1	88 a	12	0.79	0.97
2	64 b	36	0.51	0.77
3	54 b	46	0.40	0.68

Letras distintas muestran diferencia estadística



Gráfica 1. Porcentaje de germinación de la semilla por tratamiento a los 30 días.

Al observar el análisis descriptivo exploratorio (Tabla 3, Gráfica 2 y Anexo 4), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos realizados ($P < 0.05$) para la variable longitud de la hoja a los 60 días; de igual forma se pudo detectar que el tratamiento dos fue el más homogéneo ya que presentó el menor coeficiente de variación. El tratamiento 1 alcanzó el más alto promedio con 2.26

cm, siendo este el mejor para la variable longitud de la hoja, el cual presentó un patrón de comportamiento intermedio en su variabilidad.

Tabla 3. Análisis descriptivo y comparativo entre los diferentes experimentos para la variable longitud de la hoja a los 60 días.

Tratamientos	$\bar{X} \pm St_d$	Cv
1	2.26 ± 0.52 a	23.22
2	0.97 ± 0.18 b	19.20
3	0.57 ± 0.16 c	31.86

Letras distintas muestran diferencia estadística



Gráfica 2. Promedio de longitud de la hoja por tratamiento a los 60 días.

4.2 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA INDUCCIÓN RADICULAR A PARTIR DE PROTOCORMOS DE *C. quadricolor*

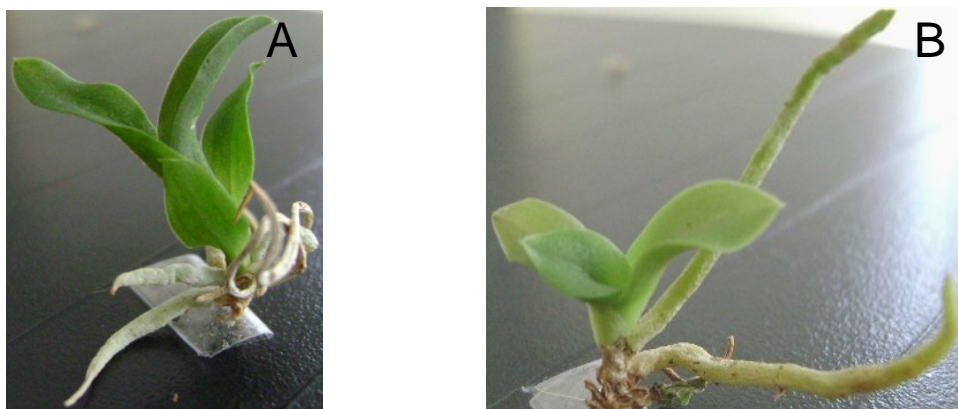
Los protocormos obtenidos en el tratamiento 1 el cual se consideró como el mejor, fueron transferidos a los tratamientos 4, 5, 6 y 7 con el propósito de inducir el enraizamiento, utilizando el medio MS (1962) suplementado con agua de coco,

jugo de piña y ANA como regulador de crecimiento evaluando el promedio de la longitud de la raíz a los 90 días.

En el tratamiento 4 (Medio MS + Agua de coco) los protocormos se adaptaron fácilmente al nuevo medio; el rizoma comenzó a desarrollar raíces a los 15 días de realizado el transplante (Figuras 12A y 12B). Después de 60 días de realizada la siembra, las raíces presentaron un desarrollo completo con velamen, buena longitud y espesor; de igual manera como se reportó en los estudios realizados por Vendrame (2007) y Arditti (1993), las hojas del protocormo en el momento de realizar el transplante se prolongaron aún más y se logró distinguir y diferenciar la presencia de una vitroplanta completa a los 90 días contados a partir de la siembra de la semilla (Figuras 13A y 13B).

En este tratamiento se observó un promedio de longitud de la raíz a los 90 días de 5.1372 cm, como se observa en la Tabla 4.

En la figura 14 se observa el proceso *in vitro* de la *C. quadricolor* desde el momento de la siembra de la semilla hasta la formación de la vitroplanta a los 90 días.



Figuras 12A y 12B. Presencia de raíces a los 15 días después del transplante de protocormos de *C. quadricolor* al medio MS modificado suplementado con agua de coco y sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 4).



Figuras 13A y 13B. Vitropianta de *C. quadricolor* formada en el medio MS modificado suplementado con agua de coco y sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 4) a los 90 días de realizada la siembra de la semillas.



Figura 14. Proceso *in vitro* de la *C. quadricolor* desde la germinación de la semilla hasta la obtención de la planta completa a los 90 días de realizada la siembra de las semillas.

Tabla 4. Evaluación del promedio de la longitud radicular en cm de *Cattleya quadricolor* en el medio MS (1962) modificado, suplementado con agua de coco, jugo de piña y 0.5 mg/L de ANA a los 90 días.

Tratamientos	Promedio de la longitud de la raíz en cm a los 90 días.
4. MS modificado sin reguladores de crecimiento + agua de coco	5.1372
5. MS modificado + 0.5 mg/L ANA + agua de coco	2.964
6. MS modificado sin reguladores de crecimiento + jugo de piña	1.8454
7. MS modificado + 0.5 mg/L ANA + jugo de piña	1.188

Las vitroplantas obtenidas en el tratamiento 4 fueron llevadas a condiciones *ex vitro* en potes comunitarios (Figura 15), a los cuales se les adicionó como sustrato corteza de pino pátula, y se mantuvieron a temperatura ambiente protegidas de la luz solar con un sarán al 70%, tal y como lo propone la Sociedad Colombiana de Orquideología (2003).



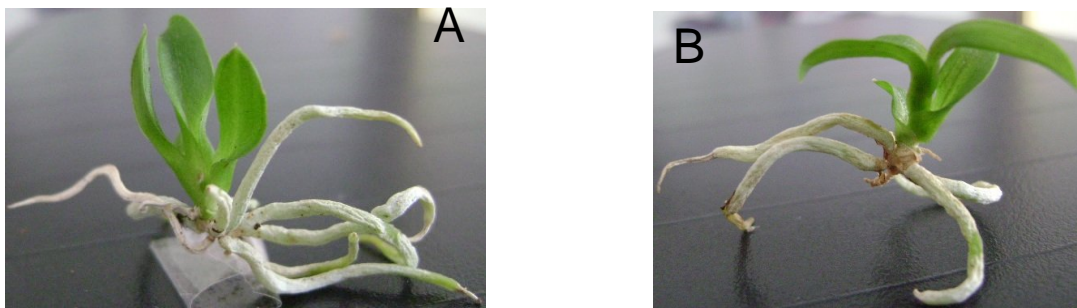
Figura 15. Vitroplanta de *C. quadricolor* en el medio MS modificado suplementado con agua de coco y sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 4) establecida *ex vitro* en corteza de pino pátula.

En el tratamiento 5 (Medio MS + Agua de coco + ANA) se observó un comportamiento similar al presentado en el tratamiento 4, es decir, ambos manifestaron prolongación de las hojas y conservaron la tonalidad verde inicial (Figuras 16A y 16B); sin embargo, las raíces desarrolladas en el tratamiento 5 presentaron un promedio inferior comparado con el tratamiento 4 en cuanto a la longitud de la raíz a los 90 días con un valor de 2.964 cm (Tabla 4).

Los protocormos que fueron establecidos para enraizamiento en el tratamiento 6 (Medio MS + Jugo de piña) sufrieron secamiento de las hojas y de las raíces (Figura 17). No hubo presencia de nuevos brotes como estructuras protocórmicas, ni de nuevas hojas. Las raíces que aparecieron fueron delgadas, de color café, de escasa longitud y manifestaron desecación. Se observó igualmente pudrición del rizoma lo cual posiblemente se deba a una acción inhibitoria del jugo de piña para

la absorción de los nutrientes del medio de cultivo, es decir, es una sustancia antagónica para el buen desarrollo del protocormo y de la raíz en esta especie comparado con el agua de coco.

En este tratamiento (6), se obtuvo un promedio de longitud de la raíz de 1.8454 cm como se observa en la Tabla 4, siendo menor al compararlo con los tratamientos 4 y 5 anteriormente descritos.



Figuras 16A y 16B. Raíces y vitroplantas de *C. quadricolor* desarrolladas en el medio MS modificado suplementado con agua de coco y 0.5 mg/L de ANA (Tratamiento 5) a los 90 días de realizada la siembra de las semillas.



Figura 17. Vitroplanta de *C. quadricolor* desarrollada en el medio MS modificado suplementado con jugo de piña y sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 6) a los 90 días de realizada la siembra de las semillas.

En el tratamiento 7 (Medio MS + Jugo de piña + ANA), se observó que los protocormos manifestaron una baja respuesta para el desarrollo foliar, radicular y una disminución en la presencia de nuevos brotes. Las hojas provenientes de los protocormos obtenidos, comenzaron a tornarse de un color amarillo al cabo de los

90 días tal y como se observa en la figura 18. Algunas de las vitroplantas obtenidas presentaron secamiento total de la hoja, siendo este más fuerte comparado con el que se observó en el tratamiento 6.

En este tratamiento se observó un promedio de longitud de raíz luego de 90 días de 1.1188 cm, valor que es mucho menor al compararlo con los tratamientos 4, 5 y 6 (Tabla 4).

Las mediciones realizadas a los tratamientos 4, 5, 6 y 7 se muestran en el Anexo 5.



Figura 18. Vitroplanta de *C. quadricolor* totalmente seca en el medio MS modificado suplementado con jugo de piña y 0.5 mg/L de ANA (Tratamiento 7) luego de 90 días de realizada la siembra de las semillas.

Con base en estos resultados se observó que el promedio de longitud de raíz a los 90 días fue mayor en el tratamiento 4 seguido del tratamiento 5, 6 y finalmente del tratamiento 7, lo que da a entender que para el desarrollo radicular y la obtención de vitroplantas vigorosas de *C. quadricolor*, es más conveniente suplementar el medio de cultivo MS (1962) modificado con agua de coco al 10% y que no es necesaria la adición de la auxina ANA para inducir la formación de raíz tal y como lo reportan Ávila (2006) y Lo (2004 a y b).

Con base en este resultado se presume que el agua de coco actúa como una sustancia sinergista estimulando el crecimiento de raíces e incrementando la longitud de las hojas, una vez se comienza a formar el protocormo.

Arditti *et al.*, (1993), utilizaron el medio MS (1962) suplementado con agua de coco y ANA. Observaron que ambas sustancias estimularon el crecimiento de raíces e incrementaron la longitud de las hojas en el protocormo. Sin embargo, en este trabajo se encontró que al estar presentes simultáneamente tanto el agua de coco como el ANA en el medio de cultivo (Tratamiento 5), se observó una disminución en el promedio de longitud de la raíz a los 90 días (2.964 cm), comparado con el tratamiento 4 (5.1372 cm) en el cual no se tenía la presencia de la auxina, lo cual posiblemente se deba a que no exista sinergismo completo entre las dos sustancias en esta especie.

En estudios realizados por Ávila *et al.*, (2006), encontraron que la adición de reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas, no siempre favorece la estimulación del desarrollo de vitroplantas, debido a que se puede presentar la aparición y aumento del desarrollo de callogénesis, lo cual está directamente relacionado con una disminución del crecimiento principalmente a nivel del rizoma.

Lo *et al.*, (2004b), realizaron el trasplante de cuerpos protocórmicos al medio MS (1962), suplementado con agua de coco. Observaron que el efecto del agua de coco en estas estructuras fue bastante benéfico, promoviendo el crecimiento de hojas y el número de raíces en un 97%, lo cual es muy similar a lo obtenido en este trabajo.

Martín *et al.*, (2006), realizaron estudios con *Dendrobium* suplementando el medio de cultivo con diferentes concentraciones de BA, ANA y carbón activado. Observaron que los cuerpos protocórmicos en presencia de BA manifestaron la inducción de brotes, mientras que el medio suplementado con ANA no aumentó la proliferación de estos. Sin embargo, los protocormos alcanzaron a desarrollar raíces al adicionar ANA al medio de cultivo, encontrando que estas presentaron un

crecimiento lento y baja longitud, tal y como se encontró en el tratamiento 5 de este trabajo.

Es importante destacar tal y como lo hace Arditti (1993), que el efecto del agua de coco varía dependiendo del híbrido utilizado, pero lo que sí es claro, es que incrementa la proliferación del protocormo y estimula el desarrollo del explante.

En estudios realizados por Huang *et al.*, (2001), encontraron que la adición de agua de coco al medio de cultivo, estimuló tanto la formación de raíces como el de brotes después de 45 días de cultivo, y que la presencia de ANA no presentó ningún efecto benéfico para la formación de brotes; sin embargo, estimuló el crecimiento de raíces, tal y como se observó en el tratamiento 5 de este trabajo.

Kishor *et al.*, (2006), comprobaron la efectividad de suplementar el medio de cultivo con agua de coco. Los resultados de estos tratamientos mostraron una longitud de la raíz de 1.7 cm muy inferior a la longitud encontrada en el tratamiento 4 de este trabajo, el cual presentó un valor de 5.1372 cm.

Peixe *et al.*, (2007), explican que la razón por la cual el agua de coco es exitosa cuando actúa como suplemento de medios de cultivo, es porque posee en su composición zeatina. En los últimos años, diferentes investigaciones han revelado que esta sustancia cuenta con un efecto importante en la micropropagación de diferentes especies *in vitro*, entre ellas, las orquídeas induciendo convenientemente el desarrollo de los cuerpos protocórmicos.

De acuerdo con los análisis estadísticos basados en $\bar{X} \pm \text{Std}$, Cv y en la Prueba de comparación de Tukey (Tabla 5, Gráfica 3 y Anexo 6), se logró establecer, que se presentaron diferencias estadísticas en el efecto promedio de los tratamientos ($P < 0.05$) donde se determinó que el tratamiento 4 fue el de mejor comportamiento promedio con 5.13 cm, y el tratamiento 7 fue el de menor comportamiento

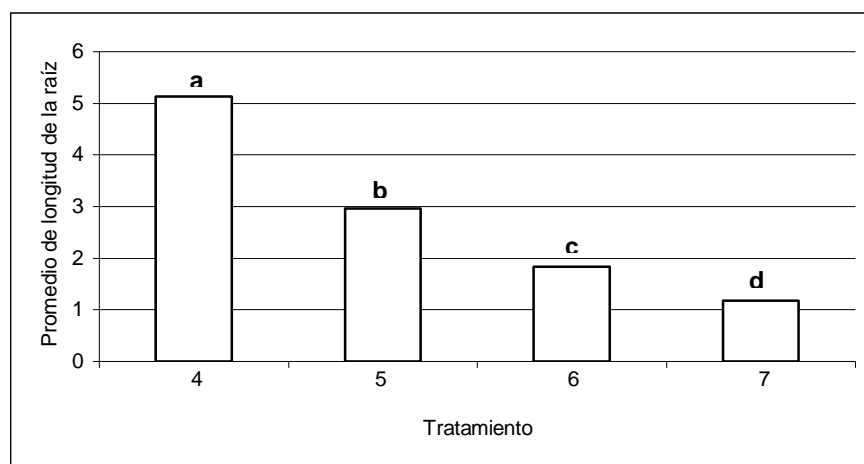
promedio con 1.18 cm para la inducción radicular a los 90 días de cultivo; adicionalmente se observó que el tratamiento 7 presentó diferencias entre sus repeticiones, con un coeficiente de varianza del 36.74%.

Por el contrario, el tratamiento 4 fue el de mejor comportamiento en cuanto a la variabilidad, al presentar mayor homogeneidad en las distintas repeticiones efectuadas.

Tabla 5. Análisis descriptivo y comparativo entre los diferentes experimentos para el desarrollo radicular.

Tratamientos	$\bar{X} \pm \text{Std}$	Cv
4	5.13 ± 0.67 a	13.22
5	2.96 ± 0.4 b	14.89
6	1.84 ± 0.25 c	13.80
7	1.18 ± 0.43 d	36.74

Letras distintas muestran diferencia estadística



Gráfica 3. Promedio de la longitud de la raíz en los tratamientos 4, 5, 6 y 7 a los 90 días después de realizada la siembra de las semillas.

5. CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar un protocolo para la micropropagación de *Cattleya quadricolor*, el cual permitió a partir de semillas la obtención de vitroplantas a los 90 días de iniciada la siembra.
- Se estableció que el medio MS (1962) completo en sus concentraciones y sin reguladores de crecimiento, es el mejor tratamiento para la germinación de semillas y obtención de protocormos de *Cattleya quadricolor* a los 30 y 60 días respectivamente.
- Se logró establecer que el tratamiento 4 (MS modificado + Agua de coco 10%) fue el más adecuado para la inducción del enraizamiento después de 90 días de realizada la siembra de las semillas.
- Se estableció que la adición de jugo de piña al medio de cultivo, tiene un efecto negativo en la inducción de vitroplantas de la especie *Cattleya quadricolor*, causando secamiento de las raíces y de las hojas en el cuerpo protocórmico.
- Existen diferencias en las vitroplantas obtenidas al adicionar ANA al medio de cultivo para estimular el desarrollo radicular. Se estableció que no existe la necesidad de adicionar reguladores de crecimiento para la obtención de vitroplantas de esta especie, lo cual hace más económico este sistema biotecnológico de propagación comparado con otros trabajos reportados.

- Se adaptaron vitroplantas bajo condiciones *ex vitro* utilizando como sustrato corteza de pino pátula con excelente rendimiento, lo cual significa que el sistema de micropropagación *in vitro* es eficiente para la obtención de especies de orquídeas en vía de extinción.

6. RECOMENDACIONES

- Evaluar en otros trabajos el medio de cultivo MS (1962) suplementado con diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas, que posiblemente permitan obtener mayor porcentaje de germinabilidad y crecimiento foliar al obtenido en este estudio.
- Evaluar otras auxinas diferentes a las utilizadas en este estudio para la inducción de raíz.
- Utilizar el sistema de propagación *in vitro* como herramienta biotecnológica para la obtención de orquídeas que se encuentren en vía de extinción en nuestro país.

7. BIBLIOGRAFÍA

Arango, C. 1972. Orquídeas Ornamentales de Colombia, *Cattleyas Colombianas*. Editorial Colina. Colombia. p. 25-28

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review*. Vol. 33 (1). p. 1-97.

Arditti, J. 1993. Micropropagation of Orchid. John Willey & Sons Inc. New York. p. 1-23.

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

Chadwick, A. 2001. *Cattleya quadricolor*, Stepchild of the Mountain Marshes. *Orchids, The American Orchid Society Magazine*. Vol. Diciembre 2001.

Gómez, N.; Retamal, P.; Durán J.M. 2008. Las orquídeas. Cultivo hidropónico. Departamento de Producción Vegetal. *Fitotecnia*. UP Madrid Ciudad Universitaria.

Huang, L.C.; Lin, C.J.; Kuo C.I.; Huang, B.L.; Murashige, T. 2001. *Phaphiopedilum* cloning *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. Vol 91. p. 111-121.

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

Lo, S.F.; Nalawade, S.M.; Kuo, C.L.; Chen, C.L.; Tsay, H.S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of

plants of *Dendrobium* Makino - A medicinally important orchid. *In vitro Cellular & Developmental Biology*. Vol 40. p. 528-535.

Lo, S.F.; Nalawade, S.M.; Mulabagal, V.; Matthew S.; Chen, C.L.; Kuo, C.L.; Tsay H.S. 2004. *In vitro* propagation by asymbiotic seed germination and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity studies of tissue culture raised plants of three medicinally important species of *Dendrobium*. *Pharmaceutical Society of Japan*. Vol 27. p. 731-735.

Martin, K.P.; Madassery, J. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae*. Vol 108. p. 95-99.

McKendrick, S. 2000. *In vitro* germination of orchids: a manual. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. Vol 15. p. 473- 497.

Pacheco, R.; Galindo, D. 2001. Banco de germoplasma de orquídeas por medio de la micropropagación. *Pérez Arbelaezia*. Vol. 5. p. 79-83

Peixe, A.; Raposo, A.; Lourenço, R.; Cardoso, H.; Mecedo, E. 2007. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*. Vol 113. p. 1-7.

Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

Rodríguez, L.; González, P.; Díaz, A.; Fajardo, E.; et al.;. 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. Cuba. ISBN 959-250-156-4.

Sheelavantmath, S.S.; Murthy, H.N.; Pyati A.N.; Ashok K. y Ravishankar B.V 2000. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. Through rhizome section culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol 6. p. 151-154

Sociedad Colombiana de Orquideología. 2003. Manual de cultivo de orquídeas. Editorial SCO.

Tirado, J.M.; Naranjo, E.J.; Atehortúa L. 2005. *In vitro* propagation of *Phalaenopsis* (Orchidaceae) from protocorms, using the temporary immersion system "RITA". *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol 7. p. 25-31

Vendrame, W.; Carvalho, V.S.; Dias, J.M. 2007. *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Scientia Horticulturae*. Vol 2746. p. 1-6

Yamazaki, J.; Miyoshi, K. 2006. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata*. En: *Oxford Journals*. Vol 98. p. 1197-1206

8. CIBERGRAFÍA

ANÓNIMO. Orquídeas (tipos de orquídeas). Acceso: 29 Septiembre de 2007
<http://www.articulos.infojardin.com/orquideas/orquideas-tipos-orquideas>.

DENSON JHON A (2007). Cattleya Orchid Source, Cattleya Orchid Species.
Acceso: 2 Julio de 2007
http://www.geocities.com/cattleyasource/cattleya_species_pages/Cattleya_quadricolor_species_photo.html

GEORGE JEAN CLAUDE (2006). Orchidorama. Acceso: 24 Abril de 2007
<http://www.orchidorama.free.fr/04-juilletd%E9cembre/Cattleya%20chocoensis04>.

HERRERA ALEXANDER. Asociación On Line de Colombianos en España:
Acceso: 19 septiembre 2007
<http://www.groups.msn.com/k0horta24qr8mi/colombiaecologica>.

SÉLLER CARLOS. *Cattleya chocoensis*. Acceso: 19 Agosto de 2007
<http://www.mombu.com/orquideas/orquideas/t-cattleya-chocoensis-99284.html>

ANEXOS

ANEXO 1. Formulación para 500 ml de solución stock de MS (Murashige – Skoog, 1962) a una concentración 10X (Murashige *et al.*,1962).

REACTIVO	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.30
Mioinositol	100
Ácido Nicotínico	0.5
Piridoxina – HCl	0.5
Tiamina – HCl	0.5
Glicina	2.0
Agua destilada para ajustar volumen	

ANEXO 2. Mediciones realizadas a las semillas germinadas y a la longitud de hoja en los tratamientos 1, 2 y 3 a los 30 y 60 días respectivamente luego de realizada siembra.

En las columnas germinación, 0 a semillas que no germinaron y 1 a semillas germinadas en las 50 replicaciones realizadas.

TRATAMIENTO 1(MS completo sin reguladores de crecimiento)			TRATAMIENTO 1(MS completo sin reguladores de crecimiento)		
Muestra	Germinación	Longitud (cm)	Muestra	Germinación	Longitud (cm)
1	1	2,5	26	1	3,1
2	1	2	27	0	3
3	1	2,6	28	0	2,9
4	1	1,8	29	0	2,85
5	1	1,8	30	1	2,73
6	1	1,45	31	1	2,65
7	1	1,5	32	1	2,6
8	1	1,65	33	1	2,7
9	1	1,43	34	1	3
10	1	2,7	35	1	2,5
11	1	2,4	36	1	2,9
12	1	2,3	37	1	2,8
13	1	2,5	38	1	2,55
14	1	2	39	1	2,4
15	1	2	40	1	1,9
16	1	1,5	41	1	1,73
17	1	3	42	1	2,1
18	1	2,3	43	0	2,35
19	1	1,5	44	1	2
20	1	2	45	0	2,05
21	1	2	46	1	2,7
22	1	1,5	47	1	3
23	0	1,25	48	1	2,5
24	1	1,3	49	1	2,6
25	1	1,9	50	1	2,55

TRATAMIENTO 2 (MS/2 sin reguladores de crecimiento)			TRATAMIENTO 2 (MS/2 sin reguladores de crecimiento)		
Muestra	Germinación	Longitud (cm)	Muestra	Germinación	Longitud (cm)
1	1	1,2	26	0	0,85
2	1	1	27	0	0,9
3	1	1,1	28	0	0,7
4	1	1	29	1	0,5
5	0	0,85	30	1	0,65
6	0	1	31	1	1
7	0	1,5	32	1	1
8	1	1,25	33	1	1,2
9	1	1	34	1	0,9
10	1	1,3	35	1	0,95
11	1	0,9	36	1	0,95
12	0	1,1	37	0	0,9
13	0	0,95	38	1	0,9
14	1	0,7	39	1	1
15	1	1,1	40	0	1
16	1	1,2	41	0	1
17	1	0,85	42	1	0,85
18	0	0,9	43	1	0,8
19	0	1	44	0	1,1
20	0	1,2	45	1	1,3
21	1	1,2	46	1	1
22	0	1,1	47	1	0,85
23	1	1	48	0	0,7
24	0	1	49	1	0,73
25	1	1	50	1	0,7

TRATAMIENTO 3 (MS/4 sin reguladores de crecimiento)			TRATAMIENTO 3 (MS/4 sin reguladores de crecimiento)		
Muestra	Germinación	Longitud (cm)	Muestra	Germinación	Longitud (cm)
1	0	0,7	26	0	0,25
2	0	0,85	27	0	0,7
3	0	0,5	28	0	0,5
4	1	1	29	0	0,55
5	1	0,5	30	1	0,6
6	1	0,55	31	1	0,6
7	0	0,5	32	1	0,6
8	1	0,6	33	1	0,35
9	0	0,3	34	0	0,7
10	1	0,25	35	0	0,35
11	0	0,7	36	0	0,4
12	0	0,35	37	1	0,5
13	0	0,5	38	0	0,55
14	1	0,55	39	1	0,45
15	1	0,67	40	0	0,35
16	1	0,6	41	1	0,8
17	1	0,65	42	1	0,7
18	0	0,8	43	0	0,65
19	0	0,75	44	1	0,5
20	0	0,4	45	0	0,55
21	0	1	46	1	0,6
22	1	0,95	47	1	0,6
23	1	0,8	48	1	0,55
24	1	0,5	49	1	0,5
25	1	0,25	50	1	0,4

ANEXO 3. Procedimiento ANOVA para el análisis de la variable germinación.

Fuente	DF	Sumatoria de cuadrados	Media cuadrada	Valor F	Pr>F
Modelo	2	0.81813820	0.40906910	7.68	0.0007
Error	147	7.82947540	0.05326174		
Total Corregido	149	8.64761360			
		ANOVA SS			
Experimento	2	77.86033733	38.93016867	339.20	<.0001
	R cuadrado	Cv	Raiz MSE	Media Germinación	
	0.094609	21.71989	0.230785	1.062552	

ANEXO 4. Procedimiento ANOVA para el análisis de la variable longitud de hoja.

Fuente	DF	Sumatoria de cuadrados	Media cuadrada	Valor F	Pr>F
Modelo	2	77.86033733	38.93016867	339.20	<.0001
Error	147	16.87148200	0.11477199		
Total Corregido	149	94.73181933			
		ANOVA SS			
Experimento	2	77.86033733	38.93016867	339.20	<.0001
	R cuadrado	Cv	Raiz MSE	Media Longitud	
	0.821903	26.69101	0.338780	1.269267	

ANEXO 5. Mediciones realizadas a la longitud de la raíz en los tratamientos 4, 5, 6 y 7 los 90 días luego de realizada siembra.

TRATAMIENTO 4 (MS modificado suplementado con agua de coco y sin reguladores de crecimiento)		TRATAMIENTO 4 (MS modificado suplementado con agua de coco y sin reguladores de crecimiento)	
Muestra	Longitud (cm)	Muestra	Longitud (cm)
1	5	26	6,1
2	5,6	27	5,3
3	6	28	5,4
4	5,5	29	5
5	4,7	30	4,6
6	5	31	5
7	6	32	5,2
8	5	33	6,1
9	4,1	34	6
10	3	35	5,8
11	4,3	36	5,8
12	4	37	5
13	4,6	38	5,86
14	5,6	39	5,3
15	6	40	5,5
16	6,1	41	4,7
17	5,3	42	4,1
18	5	43	5,3
19	5,5	44	6,1
20	4,6	45	5,3
21	4,8	46	5
22	5	47	5,1
23	4,9	48	4,8
24	4,1	49	4,7
25	6	50	4,1

TRATAMIENTO 5 (MS modificado suplementado con agua de coco y 0.5 mg/L de ANA)	
Muestra	Longitud (cm)
1	2,5
2	3
3	2,3
4	2,5
5	2,3
6	2,6
7	3
8	2,5
9	2,5
10	3
11	2,5
12	3
13	3,1
14	3,2
15	3
16	2,9
17	2,5
18	2,6
19	3
20	3
21	2,9
22	2,5
23	2,4
24	2,6
25	2,8

TRATAMIENTO 5 (MS modificado suplementado con agua de coco y 0.5 mg/L de ANA)	
Muestra	Longitud (cm)
26	3
27	3,1
28	2,3
29	3,5
30	3,7
31	2,5
32	2,9
33	3,6
34	3,4
35	4
36	3,2
37	3,3
38	3,1
39	2,6
40	2,8
41	3,5
42	3,6
43	2,9
44	3
45	2,6
46	3,5
47	3,3
48	2,9
49	3,8
50	3,9

TRATAMIENTO 6 (MS modificado suplementado con jugo de piña y sin reguladores de crecimiento)	
Muestra	Longitud (cm)
1	2,3
2	1,8
3	1,9
4	2,3
5	1,6
6	1,3
7	2
8	2,5
9	1,5
10	2
11	2
12	1,8
13	1,5
14	1,65
15	1,7
16	2,3
17	2
18	2,3
19	2,1
20	1,6
21	1,9
22	2,1
23	2
24	1,9
25	1,7

TRATAMIENTO 6 (MS modificado suplementado con jugo de piña y sin reguladores de crecimiento)	
Muestra	Longitud (cm)
26	1,85
27	1,9
28	1,65
29	1,9
30	1,98
31	1,65
32	1,7
33	1,56
34	1,8
35	1,55
36	2,1
37	1,95
38	1,88
39	1,73
40	1,5
41	1,6
42	2
43	2,1
44	1,8
45	1,55
46	1,9
47	1,65
48	1,54
49	1,68
50	2

TRATAMIENTO 7 (MS modificado suplementado con jugo de piña y 0.5 mg/L de ANA)	
Muestra	Longitud (cm)
1	1,2
2	1,3
3	1
4	0,8
5	1,2
6	1,8
7	2,3
8	1,98
9	1,9
10	0,5
11	1
12	1,6
13	0,93
14	1,5
15	0,2
16	2
17	1
18	1,8
19	0,9
20	0,5
21	0,9
22	1
23	0,6
24	1,33
25	1,6

TRATAMIENTO 7 (MS modificado suplementado con jugo de piña y 0.5 mg/L de ANA)	
Muestra	Longitud (cm)
26	1,23
27	1,63
28	1
29	1,52
30	0,88
31	0,96
32	1
33	1
34	1,1
35	1,13
36	1,05
37	1,33
38	1,05
39	1,3
40	0,9
41	0,8
42	0,3
43	1
44	1,12
45	1,15
46	1,2
47	1,19
48	1,88
49	1,45
50	1,39

ANEXO 6. Procedimiento ANOVA para el análisis de la variable longitud de raíz.

Fuente	DF	Sumatoria de cuadrados	Media cuadrada	Valor F	Pr>F
Modelo	3	449.9068	149.9689	657.73	< 0.0001
Error	196	44.68985	0.228009		
Total Corregido	199	494.5966			
Experimento	3	449.9068	149.9689	657.73	< 0.0001
	R cuadrado	Cv	Raiz MSE	Media Longitud	
	0.90964	17	0.4775	2.78365	