

**EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE DOS ESPECIES DEL
GÉNERO *Epidendrum* (ORCHIDACEAE), CUNDINAMARCA, COLOMBIA**



**TRABAJO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
BIÓLOGO APLICADO**

DIANA PAOLA DELGADO CASTRO

**DIRECTORA
DIANA CONSTANZA GÓMEZ GUTIÉRREZ M.SC.**

**CODIRECTOR
ERICSSON DAVID COY BARRERA PH. D.**

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA APLICADA**

**CAJICÁ, CUNDINAMARCA
NOVIEMBRE 2019**

CONTENIDO

Agradecimientos y dedicatoria.....	3
1. CAPÍTULO I: UNA REVISIÓN DE LOS EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO SOBRE LAS ORQUÍDEAS Y SU AMBIENTE Y MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE SUS ESPECIES	
1.1 Cambio Climático y efectos en el ecosistema tropical.....	4
1.2 Bosques tropicales.....	6
1.3 Las orquídeas, su historia y distribución.....	8
1.3.1 Morfología y características botánicas de la familia Orchidaceae.....	11
1.4 El género <i>Epidendrum</i>	13
1.5 La importancia de las orquídeas y su conservación.....	16
1.5.1 Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas.....	17
1.6 BIBLIOGRAFÍA.....	19
2. CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Epidendrum</i> (ORCHIDACEAE), CUNDINAMARCA, COLOMBIA	
2.1 Resumen.....	26
3. Introducción.....	27
4. Metodología	29
4.1 Área de estudio.....	29
4.2 Recolección de material vegetal.....	29
4.3 Medios de cultivo.....	30
4.4 Cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>Epidendrum</i>	30
4.4.1 Desinfección y siembra de cápsulas.....	30
4.4.2 Desinfección y siembra de semillas.....	30
4.5 Evaluación de viabilidad de semillas.....	30
4.5.1 Método de Cloruro de Tetrazolio.....	31
4.5.2 Método de Carmín de índigo.....	31
4.6 Evaluación de germinación de semillas.....	31
4.7 Identificación de las etapas de desarrollo.....	31
4.8 Análisis estadístico.....	32
5. Resultados y discusión.....	32
6. Conclusiones.....	41
7. Recomendaciones.....	42
8. BIBLIOGRAFÍA.....	42

Agradecimientos

Al grupo INQUIBIO, por abrirme sus puertas, brindarme su apoyo y disposición para el término de este trabajo.

A Wendy Medina Serrato por todo el apoyo, confianza y disposición para la elaboración de esta investigación.

Dedicatoria

A Dios por brindarme la salud, la fuerza y la gracia por permitirme estudiar esta hermosa carrera.

A mi familia, por su paciencia, comprensión, apoyo y amor, pero sobre todo a mi hija Isabella por ser el motor y la inspiración de mi vida.

A mi directora y codirector por darme la oportunidad de trabajar a su lado y sobre todo por su guía, apoyo y paciencia, que tuvieron en este proceso.

1. CAPÍTULO I: UNA REVISIÓN DE LOS EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO SOBRE LAS ORQUÍDEAS Y SU AMBIENTE Y MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE SUS ESPECIES

Todas las especies sobre la tierra se han visto afectadas por los efectos del cambio climático, pero es esencial conocer que es, como es y qué consecuencias implican para los ecosistemas de nuestro país, de esta forma podemos abarcar las futuras consecuencias para las orquídeas, que son fuente importante de los hábitats de Colombia. En la presente revisión analizaremos que es el cambio climático y cómo afecta el planeta en general, luego hablaremos sobre el principal hábitat de las orquídeas y como se han visto sometidas a la presión antropogénica y finalmente analizaremos el origen de las orquídeas, su importancia y como estas se han visto afectadas por el cambio climático y las afectaciones a su principal ecosistema y cuáles son los principales métodos para su conservación.

1.1 Cambio Climático y efectos en el ecosistema tropical

El Planeta Tierra está pasando por cambios climáticos muy fuertes que han transcurrido en un espacio de cientos de años, como la era de hielo o el calentamiento global, eventos que moldean la dinámica del planeta. Estos acontecimientos toman cientos o miles de años en pasar de uno al otro, pero en el periodo actual estamos acelerando la era de uno de estos factores, como lo es el calentamiento global, además de empeorar debido a malas prácticas como la deforestación desmedida con fines de agricultura y ganadería, la tala ilegal de árboles y los incendios, que están llevando a la fauna y flora del planeta a la extinción, debido a que estos no tienen el tiempo suficiente para adaptarse al nuevo ambiente (Motoa F, 2016).

El cambio climático tiene registro de haber empezado aproximadamente hace dos siglos, como una consecuencia de la revolución industrial (1760 - 1840), donde las innovaciones tecnológicas provocaron un crecimiento exponencial en la calidad de vida de los seres humanos; pero este progreso generó impactos en el planeta, aumentando los gases de efecto invernadero (Barros, 2005; González, 1993). En el tiempo actual, muchos científicos han estudiado los efectos que genera el calentamiento global sobre las especies, sobre todo las más vulnerables como las plantas, que podemos encontrar en uno de los ecosistemas más importantes como lo son los bosques tropicales.

Otros de los factores que se deben tener en cuenta al hablar de cambio climático son las guerras, la agricultura y la actividad humana, viéndolos como moldeadores del paisaje y su afectación al mismo, generando gases contaminantes de efecto invernadero y destruyendo la capa de ozono. Este efecto genera un calentamiento

en la atmósfera, que es una capa delgada de gases (nitrógeno, oxígeno, argón y dióxido de carbono) que rodea el planeta y es de suma importancia, dado que es fundamental para el desarrollo de parte de la vida en la tierra; sin el efecto invernadero que mantiene caliente la superficie terrestre, la vida estaría sumida en un frío constante (Junta de Andalucía, 2002; Caballero M et al. 2007).

La evidencia del cambio climático se encuentra en la mayor intensidad y magnitud de eventos de esta índole que comienzan a repetirse temporada tras temporada, o cambios graduales en la temperatura y la precipitación que van transformando lenta y progresivamente el clima de una región (IDEAM, 2014). Uno de los eventos naturales que se ha visto perjudicado por el cambio climático es el Ciclo de “El Niño y La Niña - Oscilación del Sur” (ENOS), un fenómeno de gran importancia que afecta directamente a Colombia.

Estas variaciones en la estructura térmica del Pacífico están relacionadas con un debilitamiento de los vientos Alisios del Este y con el desplazamiento del núcleo de convección profunda del Oeste al centro del Océano Pacífico Tropical. Dada la ubicación geográfica del país, este recibe la influencia de los ciclos asociados a ENOS (Figura 1). La influencia de esta anomalía no es lineal y puede tener diferentes magnitudes en el efecto invernadero y del impacto producido como consecuencia de las actividades humanas (IDEAM, 2007).



Figura 1. Diagrama del fenómeno del ENOS en el Pacífico. (Tomado de: <https://www.elheraldo.hn/otrassecciones/serviciodeutilidad/983414-468/diferencias-entre-los-fen%C3%B3menos-clim%C3%A1ticos-de-el-ni%C3%B1o-y-la-ni%C3%B1a?mainImg=1>)

Los cambios en la temperatura podrían disminuir el área de distribución de los ecosistemas, lo cual resultaría en la disminución del número de especies. Además, los efectos de la actividad humana están fragmentando los ecosistemas andinos, evidenciándose un aumento en la temperatura en Colombia (Cuesta, 2012).

Colombia se enfrenta a condiciones adversas por consecuencia del cambio climático, se estima que en 10 años la temperatura podría ascender cerca de los 2°C, no es una cifra alarmante, pero trae consigo muchos cambios en el clima y la temperatura, generando eventos como lluvias en temporadas de calor y con ellas inundaciones y en otras regiones del país sequías cuando debería llover. Si esto continúa en el 2100 en la región Andina desaparecerían los páramos y glaciares y con ellos nuestras fuentes de agua más importantes (Redacción El tiempo, 2007; Semana, 2017).

Los Andes Colombianos se han considerado como los principales centros de diversidad y especiación del mundo, lo que los convierten en un área crítica para la conservación a nivel mundial, pues se estima que el 50% de las especies de plantas presentes en esta región son endémicas (Junta de Andalucía, 2002).

Los incendios forestales que han aumentado en los últimos años traen consigo grandes problemas para los bosques tropicales, dado que aumentan los niveles de gases de efecto invernadero, haciendo que la temperatura aumente y las especies mueran de calor (Redacción AFP, 2019), en una entrevista a Brigitte Baptiste en el 2016 por la revista Semana, nos dice que el país se encuentra muy atrasado en investigaciones sobre biodiversidad y no nos damos cuenta por la corrupción, deforestación ilegal y minería todo lo que estamos perdiendo y lo que esto implicaría para el país.

1.2 Bosques tropicales

Los bosques tropicales son los ecosistemas más importantes en términos de diversidad y representan el 7% de la superficie total de bosques en el mundo. Se pueden encontrar distribuidos cerca del ecuador, en zonas sin lluvias ciclónicas, ubicados entre las latitudes 10°N y 10°S (Figura 2), y abarca aproximadamente 70 países (Morley R, 2009; Bierregaard R et al, 1992; Zheng D et al, 2019; Ofosu, 2008).

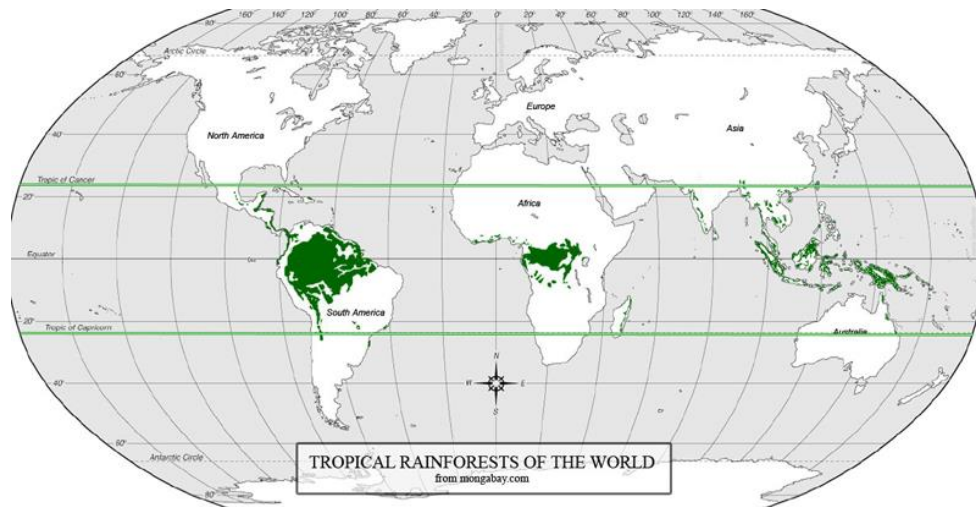


Figura 2. Ubicación de los bosques tropicales en el mundo. (Tomado de: <https://selvastropicales.org/2013/11/20/donde-estan-ubicadas-las-selvas-tropicales/>)

Este tipo de ecosistema es conocido por sus factores medioambientales específicos, como el desarrollo homogéneo de las temperaturas (no varían durante el día y la noche), así como por la existencia de estaciones hidrológicas (Plana E, 2000), que pueden variar según la clase.

Por ejemplo, el bosque tropical seco o con estación seca, en la cual la vegetación debe adaptarse a períodos largos sin lluvias y suelos áridos, la temperatura oscila entre los 15°C y los 25°C, luego están los bosques tropicales estacionales semiperennes, los cuales la gran mayoría se encuentran en Asia tropical, tiene una estación lluviosa y una seca igual de extensas y el promedio de precipitación anual es de 2000 mm y por último, está el bosque tropical lluvioso, donde realmente no existe una estación seca, sino de pocas lluvias (aproximadamente 100 mm) y algunas áreas son húmedas durante todo el año (Alfaro *et al*, 2014; Máxima J, 2019).

Los suelos de estos bosques son pobres en nutrientes, debido a los extendidos periodos sin perturbaciones geomorfológicas y a los grandes volúmenes de precipitaciones anuales, que producen una meteorización intensa y una lixiviación profunda, lo que genera que en la primera capa del bosque se guarden los nutrientes (Plana E, 2000).

La extensión de bosques húmedos en Colombia ocupa aproximadamente 415.000 km², lo que equivale al 36% del territorio nacional (Dueñas A *et al*, 2014). Este ecosistema brinda grandes beneficios a la población humana, ya que provee muchos recursos alimenticios y medicinales, además de ser un enorme reservorio

de carbono (Balvanera, 2012; Nortcliff, 1998). Pero estos beneficios se ven amenazados por las implicaciones en el cambio de uso del suelo, donde se alteran las tasas de sedimentación, infiltración, evapotranspiración y flujos de base, entre otros, debido a las actividades antropogénicas, que dan como resultado la desaparición de los bosques tropicales a una velocidad alarmante (Calvo et al, 2012; Phillips et al, 2011; Tscharrntke et al, 2007).

En Colombia, la actividad humana ha modificado el medio ambiente hasta el punto en que los paisajes son mosaicos de asentamientos humanos, terrenos agrícolas y fragmentos dispersos de ecosistemas naturales. El aumento de la ganadería, agricultura y extracción de recursos naturales, ha causado que se fragmente el hábitat y haya alteraciones en los procesos ecológicos, así como también el aumento de gases de efecto invernadero (Cortes, 2013).

El bosque seco tropical es uno de estos fragmentos, los cuales se encuentran distribuidos por todo el país, donde las orquídeas, las flores más importantes de Colombia aún se mantienen, siendo uno de los indicadores de lo que podría suceder con el cambio climático en estos bosques. Se dice que al cambiar el clima de estos nichos las orquídeas tendrán a migrar a alturas más elevadas para encontrar climas más frescos, pero los asentamientos humanos y otras especies podrían evitar estas migraciones y las flores desaparecerían de los bosques, por ello la necesidad de hablar intensamente sobre este tema y el cuidado de nuestros ecosistemas (Monsalve M, 2017).

1.3 Las orquídeas, su historia y distribución

Las orquídeas son la familia de plantas con flores más evolucionadas y diversas de la tierra. Los orígenes de estas plantas se remontan a millones de años, pero su probable origen es un misterio, debido a su difícil fosilización, pero se cree que se originaron en el sur de Asia en la región malaya, durante la era cretácea, a partir de un antecedente similar a las liláceas o las burmaniáceas (Schiff J, 2018; Junta de Andalucía, 2008).

Desde tiempos remotos, estas flores han generado pasión en los hombres por su belleza, usos medicinales y culinarios. Los primeros escritos sobre las orquídeas son citados por los chinos varios siglos antes de Jesucristo. En la antigua Grecia se le atribuían propiedades curativas, afrodisíacas y eran vistas como símbolo de virilidad. Pero el primer griego que las estudió con criterio científico fue el filósofo y naturalista Teofrasto (374 – 287 A.C), quien era discípulo de Aristóteles y describió algunas orquídeas del Mediterráneo y les dió el nombre genérico de Orchis, y se refiere a ellas en su obra “La Historia de las Plantas” de la siguiente manera: “En la base de la planta donde nacen las hojas, se encuentran dos pelotitas arrugadas

que semejan los testículos de los perros”; de aquí surge la palabra orquídea, dada la semejanza entre sus pseudobulbos y las partes del animal (Ajú M, 2009).



Figura 3. *Cattleya trianae*, orquídea insignia de Colombia. Tomado de [https://es-la.facebook.com/LaBioguia/photos/la-%22flor-de-mayo%22-\(cattleya/819214394794644/](https://es-la.facebook.com/LaBioguia/photos/la-%22flor-de-mayo%22-(cattleya/819214394794644/)

Hacia el siglo XVIII y XIX los científicos y naturalistas se interesaron en el estudio de las orquídeas, como Carlos Linneo padre de la clasificación botánica y para el siglo XIX también hicieron estudios Humboldt, con la descripción de nuevas especies en su viaje a América, Noel Bernard, botánico francés, quien descubrió las condiciones necesarias para que se produjera la germinación y el desarrollo de estas plantas, entre otros (Ajú M, 2009; Álvarez E, 2006; Junta de Andalucía, 2008). Charles Darwin fue el primer intérprete moderno en decir cómo las orquídeas tienen una polinización cruzada, entre sus investigaciones, habla sobre biomecanismos florales y cómo estos se adaptan a los cambios por la selección natural. Unos años más tarde, Darwin habla sobre la ecología de la polinización y su relación con el éxito reproductivo de estas plantas (Bernhardt P *et al*, 2017).

Las orquídeas conforman uno de los órdenes más grandes entre las monocotiledóneas, para el 2012 se tenían registradas cerca de 35.000 especies en todo el mundo (Amaya, 2012). Se encuentran distribuidas en casi todas las regiones del planeta, con excepción de los polos (Cox, 2013), pero se las puede encontrar con mayor facilidad en los bosques tropicales, especialmente en los Andes del norte de Suramérica y en las montañas de Nueva Guinea, en Oceanía (Giraldo y Betancur, 2011).

Su diversidad se debe a que son un grupo botánicamente muy joven y presentan gran facilidad híbrida, es decir, que no solo se pueden reproducir entre especies

del mismo género sino también intergenéricamente. Algunos de estos híbridos no se producen naturalmente, sino que están controlados por intervención humana (Freuler, 2006). Esto genera nuevos tipos de orquídeas, por lo que aún se siguen describiendo nuevas especies y géneros en todo el mundo.

Colombia es el país más rico en diversidad de especies de orquídeas, debido a la variedad geográfica que posee nuestro país que y al ambiente de los bosques húmedos andinos el cual es el más óptimo para su desarrollo. Se han registrado cerca de 4.270 especies, agrupadas en 274 géneros de los cuales 1.572 son especies endémicas del país (Palacios, 2014; Minambiente, 2015). Antioquia es el departamento que posee más riqueza con 1488 especies, seguido de Cundinamarca con 940 registradas, 100 de las cuales son endémicas (Humboldt, 2016).

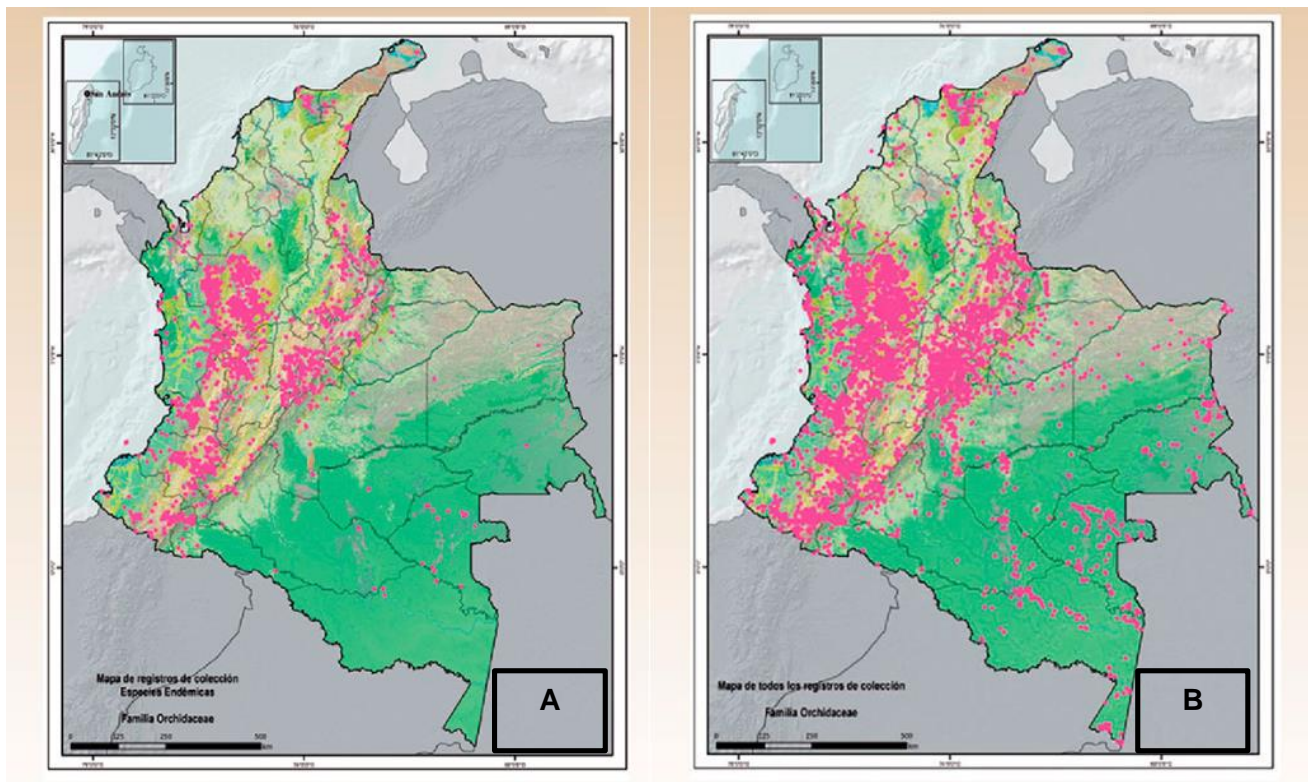


Figura 4. Distribución de las orquídeas en Colombia, A) Distribución de especies endémicas y B) Distribución de todas las especies de orquídeas. Tomado de <http://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/1772-colombia-pais-con-mayor-numero-de-especies-de-orquideas-en-el-mundo>

También poseen un alto grado de apreciación para muchas personas, por lo que algunos géneros como la *Cattleya*, que tiene flores de gran tamaño y la hace muy apetecible para los cultivadores (Hassan *et al*, 2015), también las podemos encontrar a nivel gastronómico en el uso de la *Vainilla* en México donde este

cultivo trae grandes ganancias a los agricultores, pero sus altos costos de inversión hacen que no hayan grandes empresas interesadas en invertir en ellas, por lo que se han vuelto un manjar bastante exótico (Soto, 2006).

Estas plantas tienen una gran distribución y éxito, lo que puede estar relacionado con sus caracteres morfológicos, anatómicos y fisiológicos, y a su relación con hongos micorrízicos, este éxito puede deberse también a la plasticidad de la familia, la cual le permite adaptarse a nuevos ambientes, como un velamen radial especializado que les da una protección extra a la pérdida de agua en los periodos de pocas lluvias o en ambientes donde no se encuentre mucha agua y la producción de frutos con centenares de miles de semillas diminutas, entre otras características que hacen que esta familia tenga el mayor éxito en supervivencia (Rojas, G. 2011).

Lamentablemente, y a pesar de todas estas características, las orquídeas en Colombia y en todo el mundo se han visto sometidas a una alta presión antrópica como el cambio del suelo, el cambio climático y la deposición de nitrógeno (Díaz, *et al.* 2019).

La comercialización de orquídeas a partir de la extracción descontrolada, así como la desaparición de bosques, el reemplazo de áreas naturales por zonas productivas y el uso de agroquímicos que amenazan a sus polinizadores, hacen que haya una necesidad inmediata de acciones *in situ* y *ex situ*, para salvarlas, por lo que sus estudios se han vuelto de gran importancia, no solo a nivel de hábitat, sino también por su apreciación económica (Humboldt, 2016; WWF, 2017).

1.3.1 Morfología y características botánicas de la familia Orchidaceae

La mayor concentración de orquídeas como se ha mencionado anteriormente se encuentra en bosques tropicales situadas a una altura entre 914 y 2740 m.s.n.m. Algunas se pueden encontrar enraizadas en la tierra, otras crecen sobre el tallo de otras plantas y no de una forma parásita (epifitas) o las hay también las que crecen en la superficie de las rocas (rupícolas). Estas pueden crecer de manera monopodial y simpodial, este último es el más común y consiste en el crecimiento de varios tallos o pseudobulbos que brotan de un rizoma trepador, que a su vez es un tallo modificado. El crecimiento de estos tallos y pseudobulbos se genera anualmente y sólo el más joven o maduro producirá flores. Por el contrario las monopodiales poseen un único tallo el cual va añadiendo hojas nuevas hacia arriba. Los tallos florales y las raíces aéreas brotan entre hojas y el tallo de algunas especies se ramifica desde las yemas, en la axila de la hoja (Ordoñez. 2016).

En las plantas hermafroditas, se espera que las diferencias en el atractivo floral para los polinizadores influyan en el éxito reproductivo. Si este éxito está limitado por la visita de los polinizadores, se predice que las características florales más atractivas darán como resultado más polen exportado y la producción de más semillas (Fritz *et al*, 1996).

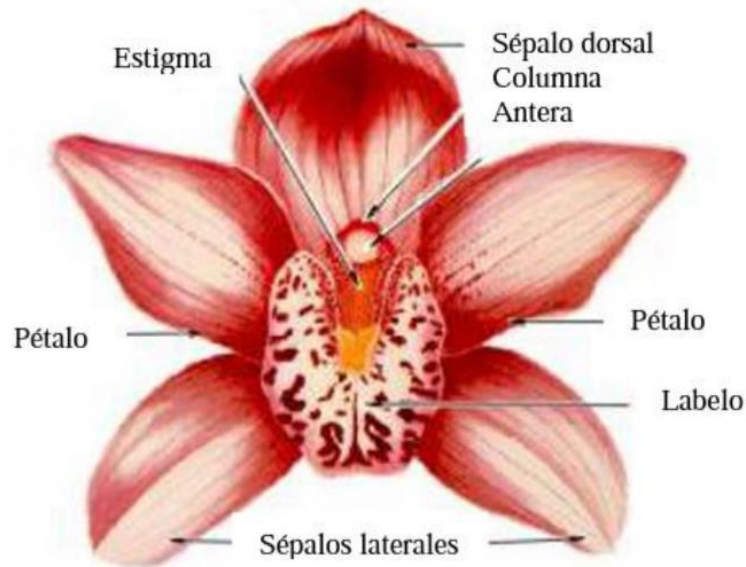


Figura 5. Morfología de las flores de orquídeas. Tomado de Duarte I. 2014.

Por lo tanto las orquídeas lograron esta proeza con variaciones en un esquema básico de tres pétalos y tres sépalos. Los dos pétalos superiores presentan colores brillantes y vivos; el pétalo inferior altamente modificado es un labelo grande que actúa en muchas especies como plataforma de apoyo para los insectos polinizadores. Los sépalos sobresalen entre y detrás de los pétalos como los puntos de una estrella de tres puntas. Las orquídeas comparten esta estructura de tres pétalos y tres sépalos con los lirios. Sin embargo las orquídeas se distinguen de otras flores por una estructura llamada la columna (gimnostemio), situada frente al labio y solo posee un estambre, la cual en casi todas las especies lleva una antera única, aunque estas estructuras están muy juntas, la auto polinización la previenen mediante una variedad de otros mecanismos, la mayoría de estos están diseñados para unir el polen a un insecto después de que haya pasado por el pistilo cuando este saliendo de la flor (McDonald, 1999; Ordoñez, 2016).

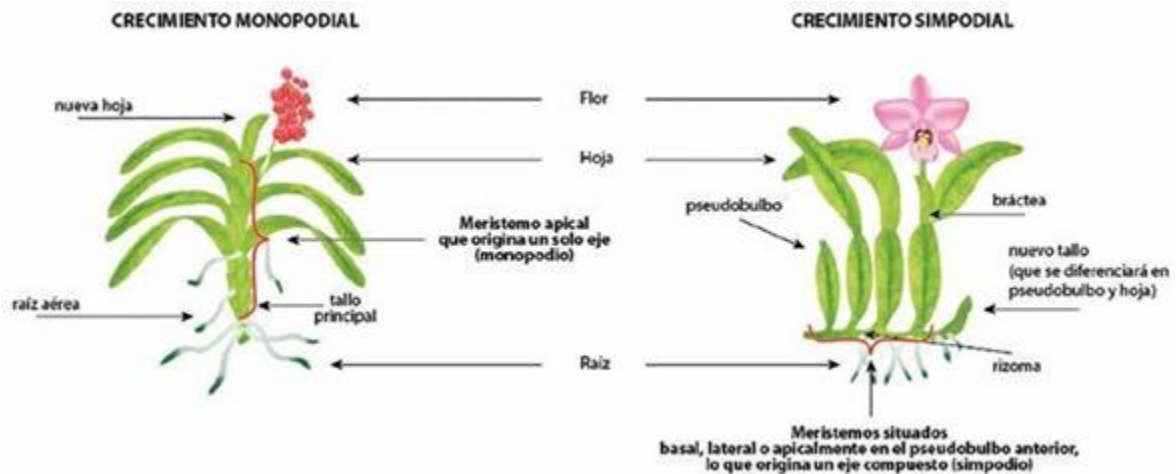


Figura 6. Crecimiento simpodial y monopodial de las orquídeas y sus partes. Tomado de <https://docplayer.es/54346844-Orquideas-importancia-y-aprovechamiento-sustentable-de-productos-forestales-no-maderables-en-bosques-de-niebla-estudio-de-caso-en-pag.html>

Los ovarios de las orquídeas se encuentran por debajo de las demás estructuras de la flor, rodeado de tejido pedicelar. El ovario tiene forma trilocular y guarda numerosos óvulos que al madurar se transforman en semillas, que en las orquídeas son pequeñas y solo tienen un embrión indiferenciado (Ordoñez, 2016).

1.4 El género *Epidendrum*

Este género fue establecido por Linneo en 1763, pertenece a la subfamilia Epidendroideae, las cuales se distribuyen por casi todo el mundo, pero presentando mayor concentración en las áreas tropicales. Se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y latitudinalmente se encuentra desde el nivel del mar hasta 3500 m de altura, además, son colonizadoras agresivas de las áreas perturbadas y desnudas (Farfán, 2008; Franzen *et al*, 2009).



Figura 7. Inflorescencia de *Epidendrum secundum*. Tomado de <https://www.pinterest.de/pin/140315344621636963/>

La principal característica de este género es su hábitat epífita que presenta la gran mayoría de las especies, pero algunas también poseen hábitos terrestres, las cuales presentan tallos tipo caña, los cuales pueden alcanzar una altura de 2m y algunos forman pseudobulbos, el carácter diagnóstico para este género son las flores, que poseen un labelo soldado a la columna, la presencia de cuatro polinarios y una hendidura en el róstelo, para las especies *E. secundum* y *E. ibaguense* sus flores son conocidas como crucifijo, por su forma y el color de las flores puede variar del rojo, naranja, lila y rosado. Este género es considerado como el más grande entre las orquídeas neotropicales, por lo que ha hecho que la clasificación de este género sea muy difícil para numerosos autores, debido a la gran variación de las características florales y vegetativas, lo que no permite establecer reglas generales de cultivo y deben tenerse en cuenta los matices existentes entre una especie y otra, aunque la mayoría se puede cultivar en ambientes con temperaturas intermedias y con riego todo el año (Álvarez *et al*, 2016; Hágsater *et al*, 2016; Fischer, 2007; Engels *et al*, 2017).

La capsula que es fruto de estas flores, tiene un tamaño aproximadamente de cuatro centímetros y dentro se pueden encontrar miles de millones de semillas,

algo que caracteriza a la especie *E. secundum* la cual posee las semillas más grandes entre todas las orquídeas alcanzando una longitud de 6 mm, mientras que las de *E. ibaguense* miden 2.9 mm (Naturalista, 2006).



Figura 4. A) Capsulas de *Epidendrum* B) Semillas vistas al estereoscopio.

Se estima que existen más de 1000 especies dentro del género *Epidendrum* de los cuales el 12% corresponden a especies conocidas en Colombia (Álvarez *et al*, 2016), en los Andes Ecuatorianos se tienen registro de 306 especies, la mitad de ellas endémicas; entre las comunidades indígenas el uso de las hojas y las flores tienen un fin médico como laxante o tónico, sus flores se usan para tratar trastornos nerviosos y controlar la temperatura corporal durante el resfriado (Durán M *et al*, 2019), pero las pocas investigaciones que existen sobre este género se basan solamente en su taxonomía, por lo que es importante generar investigaciones relacionadas a su fisiología y desarrollo.



Figura 8. Representación gráfica de la especie *Epidendrum secundum*. Tomado de: <https://www.deviantart.com/masdevalliajr/art/Epidendrum-secundum-watercolor-526859703>.

En Colombia este género es uno de los más grandes, existen registros de 527 especies que corresponden al 12% antes mencionado, presentando una riqueza de 186 especies distribuidas mayormente en la región andina y en la región pacífica

1.5 La importancia de las orquídeas y su conservación

Las orquídeas hacen parte del bosque nativo y son bioindicadores de la buena salud del ecosistema, asimismo son de gran importancia comercial debido a que son plantas de uso ornamental, dado que destacan por su gran belleza, medicinal y como flor de exportación; pero no todas destacan por su gran belleza o por no poseer rasgos de interés comercial, pero cabe mencionar que todas estas especies cumplen funciones importantes en el medio ambiente, ya que sus hojas capturan y fijan CO₂ de la atmósfera por medio del proceso de fotosíntesis. Las orquídeas epífitas, en conjunto forman grandes masas vegetales que interceptan la niebla y las nubes bajas, lo que aumenta la precipitación y reduce el volumen e impacto del escurrimiento del agua, lo que disminuye la erosión y facilita el almacenamiento e infiltración del agua en el suelo (Castellanos y Torres, 2018; Duarte D *et al*, 2002).

Muchas de las orquídeas en Colombia se encuentran en algún grado de amenaza, pero algunas especies que se encuentran dentro del género *Epidendrum* no han sido evaluadas por lo que no se sabe en qué grado de amenaza se encuentran, por lo que los estudios deben priorizarse (Castellanos y Torres, 2018; Calderón E, 2007).

Los métodos de propagación de esta familia se han hecho principalmente con el fin de dejar de explotarla de su medio ambiente y conservarlas, además del interés económico que hay detrás de ellas, existen métodos convencionales para la propagación vegetativa de orquídeas, las cuales proporcionan formas simples de multiplicación y mantenimiento de individuos seleccionados con rasgos deseados. Las orquídeas se reproducen tanto de forma sexual como asexual, en esta última se puede obtener a partir de fracciones de la planta madre, realizando divisiones de pseudobulbos a través de cortes, lo que hace posible la generación de dos o más plantas. Un método no comercial es la producción de keikis o hijuelos con ayuda de fitohormonas, que se generan en los nudos de las orquídeas simpodiales y monopodiales, las cuales al crecer se cortan y se trasplanta en nuevas macetas y por último esta la polinización manual, en la cual se pueden hacer cruces de diferentes especies (Menchada R y Moreno D, 2011; Lee YI, 2018; Cortez M, 2013).

1.5.1 Cultivo *in vitro* de orquídeas

El cultivo *in vitro* es una técnica que consiste en aislar una porción de la planta, ya sean protoplastos, células, tejidos, órganos o plantas completas y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Mediante esta técnica se pueden obtener plantas libres de patógenos en frascos de vidrio en un ambiente artificial con medios de cultivos nutritivos y asépticos, en condiciones ambientales controladas; el avance de estas técnicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de plantas tanto a nivel celular como molecular, de esta forma se puede cultivar una parte determinada de la planta para inducir el crecimiento de brotes y luego adaptarlas a condiciones *in vivo* (Castillo A, 2004; Segretín M, 2008; Roca W y Mroginski L, 1991; Duarte I. 2014).



Figura 9. Representación gráfica de frascos de cultivo de especies de *Epidendrum*.

La pérdida de recursos naturales y genéticos ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos en el desarrollo de conservación *ex situ* como son la biotecnología que permite la conservación de germoplasma vegetal. El cultivo de tejidos *in vitro*

ofrece alternativas para la conservación de la diversidad biológica, permitiendo la multiplicación de especies en peligro de extinción o aquellas que poseen limitaciones para su reproducción (Bohórquez M *et al.* 2016).

El cultivo *in vitro* en general se ha usado para reproducir y conservar plantas de interés económico, y entre los recursos fitogenéticos ornamentales, están las orquídeas. Los complejos requisitos de polinización, germinación de las semillas y otros factores abióticos y bióticos contribuyen con la pérdida de plantas cuando no se cumplen con estas condiciones, por ello la conservación *in vitro* de estas plantas toma una gran importancia (Bonilla M *et al.*, 2015).

El cultivo *in vitro* de orquídeas revolucionó después del descubrimiento de Knudson, un botánico estadounidense en 1922, cuando desarrolló un método para germinar semillas de orquídeas de forma asimbiótica en medios ricos en azúcares y minerales, demostrando que la germinación de semillas en condiciones asépticas era posible sin el requerimiento de hongos micorrízicos. Esto abrió la posibilidad del cultivo de las orquídeas sin explotarlas de su medio. Más adelante en 1962 Murashige y Skoog crearon un medio de cultivo óptimo rico en sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, lo que ofrece un alto grado de nitrógeno y potasio, importantes para la nutrición de las semillas, también se les agrega fitohormonas y algunos suplementos para mejorar la calidad de la germinación (Salazar S y Seir A, 2012; Otero J y Bayman P, 2009; Chávez H *et al.*, 2014; Mayo A *et al.*, 2010; Knudson L. 1921; Murashige y Skoog, 1962).

En Colombia los trabajos con orquídeas se han convertido en una forma de obtención de especímenes sin destruir el hábitat y el método de conservación de germoplasma más utilizado en especies comerciales y no comerciales, como la micropropagación, en la que basan trabajos de viabilidad y germinación de semillas de diversas especies en medios de cultivo modificados con diferentes adiciones como son el agua de coco, el jugo de piña, entre otros, en los cuales se ha podido evidenciar una germinación exitosa como en el trabajo de Cadavid y Salazar en el 2008, en el cual, trabajaron con la especie *Cattleya quadricolor* en medio MS, modificado con los elementos anteriormente mencionados y una adición de ANA para la formación de raíces, teniendo como resultados el 88% de semillas germinadas y crecimiento de raíces a los 90 días después de la siembra.

El trabajo con semillas de orquídeas es complejo y requiere de tratamientos asépticos importantes como la desinfección de semillas de cápsulas maduras y verdes y su posterior siembra, como observamos en trabajos realizados en México en los cuales nos muestran las técnicas que se han generalizado para ciertas especies de orquídeas que poseen semillas minúsculas como las del género *Oncidium*, con las cuales Billard *et al.*, 2014 ajustó una metodología de

desinfección eliminando los enjuagues con agua destilada para evitar la pérdida de material, además de utilizar diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, evaluando así su viabilidad encontrando que entre menos concentración mayor es la viabilidad de las semillas y a los 15 días una germinación exitosa en medio MS.

La finalidad de estos y muchos más estudios es colaborar en la conservación de esta extensa familia botánica como habla Ávila y Salgado en el 2006, en su trabajo en el cual logran establecer un medio de cultivo exitoso para 9 orquídeas logrando la formación de callos, protocormos y el crecimiento de plántulas, utilizando medios nutritivos a partir de MS y reguladores de crecimiento bajo condiciones *in vitro*. En el país Pérez B y Castañeda S en el 2016 ofrecen de igual manera cultivo MS, pero esta vez enriquecidos con pulpa de banano y sin reguladores de crecimiento, mostrando la germinación exitosa de varias especies de orquídeas. Estos trabajos nos demuestran que existen variedad de metodologías a la hora de buscar formas para la conservación de orquídeas y su importancia hortícola y comercial.

1.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Ajú M. 2009. Las orquídeas Bases generales para su conocimiento y enseñanza. Tipo (Tesis: requisito Para Maestría). Facultad de Humanidades. Escuela de Estudios de Postgrado. Universidad de San Carlos de Guatemala. Ciudad de Guatemala. Pag: 1 – 2.
2. Alfaro J, Limón R, Martínez G y Tijerina G. 2014. Ambiente y sustentabilidad *por una educación ambiental*. Primera edición. Grupo editorial Patria. Pag 54. México.
3. Álvarez Á, Jiménez D, Ortiz F, Solarte M, Bacca A. 2016. Revisión del género *Epidendrum* (familia - Orchidaceae) presente en el herbario PSO de la Universidad de Nariño; distribución geográfica, rango altitudinales y hábitat de crecimiento. Taller de investigación IV. Nariño. 14 p.
4. Alvarez E. 2006. El viaje a América de Alexander Von Humboldt y Aimé Bonpland y las relaciones científicas de ambos expedicionarios con los naturalistas Españoles de su tiempo. [http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/1965/Anales_22\(1\)_009_060.pdf](http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/1965/Anales_22(1)_009_060.pdf). Accedida el día 8 de Octubre 2019.
5. Amaya K. 2012. Evaluación del estado de conocimiento y conservación de la familia Orchidaceae, a través de colecciones *ex situ* en el departamento de Cundinamarca, Colombia. (Trabajo de grado). Facultad de estudios ambientales y rurales, programa de ecología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 71 p.
6. Ávila I y Salgado R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*. Núm 8, 138 – 149p.

7. Balvanera P. 2012. Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. *Ecosistemas*. Vol: 21. Pag 136 – 147.
8. Barros, V. 2005. El Cambio climático global. 2 Ed, Libros del Zorzal, Buenos Aire, Argentina, 11-14p.
9. Bernhardt, P. Edens-Meier, R. Grimm, W. Ren, Zong-Xin. Towle, B. 2017. Global Collaborative Research on the Pollination Biology of Rare and Threatened Orchid Species (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol: 102. Pag: 365-376.
10. Bierregaard, R., Lovejoy, T., Kapos, V., Angelo Augusto dos Santos, & Hutchings, R. 1992. The Biological Dynamics of Tropical Rainforest Fragments. *BioScience*, 42(11), 859-866.
11. Billard C, Dalzotto C y Lallana V. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotanica*. Núm 38. 145 – 157p.
12. Bohórquez M, Araque E y Pacheco J. 2016. Propagación *in vitro* de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción. *Actualidades Biológicas*. Vol: 38 (104). Pag 23 – 36.
13. Bonilla M, Mancipe C y Aguirre A. 2015. Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. Vol: 6 (1). Pag 67 – 81.
14. Caballero M., Lozano S. y Ortega. B. 2007. Efecto invernadero, Calentamiento global y Cambio Climático: una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista Digital Universitaria*, Volumen 8 número 10, 3-7p.
15. Cadavid I y Salazar S. 2008. Micropropagación de *Cattleya quadricolor*. Tipo (Proyecto de grado). Departamento de ingeniería de procesos. Universidad EAFIT. Medellín. 28 – 44p.
16. Calderón-Sáenz E. (ed.). 2006. Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 3: Orquídeas, Primera Parte. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. Instituto Alexander von Humboldt - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 828 p.
17. Calvo J, Jiménez C y Quintana M. 2012. Intercepción de precipitación en tres estadios de sucesión de un Bosque húmedo Tropical, Parque Nacional Guanacaste, Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica)*. Vol: 9. Pag 1-9.
18. Castellanos-Castro, C. y Torres-Morales, G. 2018. Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de

- Investigación Agropecuaria Corpoica, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. 328 p.
19. Castellanos-Castro, C., y Torres-Morales, G. (Eds.) 2018. Guía para la identificación y el cultivo de algunas especies de orquídeas nativas de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. 192 p.
 20. Castrillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>. Accedida el día 27 de Septiembre 2019.
 21. Chávez H, Mosquera A y Otero J. 2014. Propagación *in vitro* de semillas de orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. Agronomía. Volumen 64 Núm 2. 125 – 133p.
 22. Cortes J. 2013. Análisis espacio-temporal del Bosque Húmedo Tropical en la región del Magdalena Medio entre los periodos 1977-2013 (Puerto Boyacá, Departamento de Boyacá). Tipo (Trabajo de Grado). Facultad de Estudios Ambientales y Rurales, Programa de Ecología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Pág. 2 – 68.
 23. Cortez M. 2013. Manual práctico de producción y manejo de orquídeas *Phalaenopsis*. <http://ena.edu.sv/wp-content/uploads/2016/07/PRODUCCION-Y-MANEJO-DE-ORQUIDEAS-PHALAENOPSIS.pdf>. Accedida el día 12 de Noviembre 2019.
 24. Cox L. 2013. Orquídeas: Importancia y uso en México. Bioagrocencias. Vol 6: 1-7 p.
 25. Díaz-Álvarez, E.A., Felix, J.D. & de la Barrera, E. Acta Physiol Plant. 2019. 41: 99. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2893-y>. Accedida el día 1 de Junio de 2019.
 26. Duarte D, Gomez S y Monsalve H. 2002. Orquídeas. <http://sie.car.gov.co/bitstream/handle/20.500.11786/33803/29121.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Accedida el día 15 de Octubre 2019.
 27. Duarte I. 2014. Germinación *In vitro* de *Barkeria uniflora* Lex. Dressler & Halbinger, una orquídea endémica de México. Tipo (Tesis). Facultad de estudios superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
 28. Dueñas A, Betancur J y Galindo R. 2014. Estructura y composición florística de un bosque húmedo trópico del Parque Nacional Natural Catatumbo Barí, Colombia. Colombia forestal. Vol 10. Pag 26.

29. Durán M, Caroca R, Jahreis K, Narváez M, Ansaloni R y Cazar M. 2019. The micorrryzal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid. *South African Journal of Botany*. Vol: 125(2019). Pag 54-61
30. Engels M, Ferneda L. 2017. Dois novos registros de distribuição geográfica em *Epidendrum* (Orchidaceae) para o Centro-Oeste brasileiro. *Rodriguésia*. Vol: 68. Pag 779-789.
31. Farfán J. 2008. Estrategias reproductivas de la orquídea *Epidendrum xanthinum* Lindl., en la Cordillera Occidental, Valle del Cauca. Tipo (Trabajo de grado). Facultad de ciencias, Departamento Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 88 p.
32. Fischer A. 2007. Cultivo de orquídeas. 1ra edición, Grupo Imaginador de ediciones. Buenos Aires. Pag 17.
33. Franzen J, Goldenberg R, Barros F. 2009. O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta. Bot. Bras.* 23(3): 864-880 p.
34. Freuler M. 2006. Orquídeas. Editorial Albatros. Buenos Aires. 47 p.
35. Fritz AL., Nilsson L.A. 1996. Reproductive Success and Gender Variation in Deceit-Pollinated Orchids. In: Lloyd D.G., Barrett S.C.H. (eds) *Floral Biology*. Springer, Boston, MA
36. Giraldo G y Betancur J. 2011. Guía de campo de las orquídeas de Santa María (Boyacá, Colombia). Serie Guías de Campo del Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. No. 9. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 188 p.
37. Gonzales, P. 1993. Historia de la ciencia y de la técnica, 50 La Revolución Industrial. Ediciones Akal, S.A., Madrid, España, 7p.
38. Hágsater E, Santiago E, Rodríguez L. 2016. *Epidendrum lasiostachyum* (Orchidaceae): a new Colombian species of the *Epidendrum macrostachyum* grup. *Lankesteriana*. 16(1): 27-37 p.
39. Hassan Y, Elsayed M, Niranjana H, Yoeup K. 2015. Micropropagation of *Cattleya*: Improved In Vitro Rooting and Acclimatization. *Hort. Environ. Biotechnol.* 56(1): 89-93 p.
40. Humboldt. 2016. Diversidad de orquídeas en Cundinamarca. <http://reporte.humboldt.org.co/biodiversidad/2016/cap4/401/index.html#seccion1>. Accedida el día 13 de septiembre 2019.
41. IDEAM, 2007, Modelo institucional del IDEAM sobre el efecto climático de los fenómenos El Niño y La Niña en Colombia, Bogotá, D.C.
42. IDEAM. 2014. Cambio climático / Conceptos básicos de cambio climático. <http://www.cambioclimatico.gov.co/otras-iniciativas>. (Accedida el día 24 de abril de 2019).

43. Junta de Andalucía, 2002, Consecuencias de la desertificación, <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/planesmed/planandaluz/diagnostico5.pdf>, (Accedida el día 24 de abril de 2019).
44. Junta de Andalucía, 2008, Las orquídeas, https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural._Uso_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpa/orquideas_grazalema/03_orquideas.pdf, Accedida el día 27 de Mayo 2019.
45. Knudson L. 1921. La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. Bol. Real Soc. Española Hist. Nat. Volumen 21. 250 – 260p.
46. Lee YI. 2018. Propagación vegetativa de orquídeas. En: Lee YI., Yeung ET. (eds) Propagación de orquídeas: de laboratorios a invernaderos: métodos y protocolos. Manuales de protocolos de Springer. Humana Press, Nueva York, NY
47. Máxima J. 2019. “Bosque Tropical”. <https://www.caracteristicas.co/bosque-tropical/>. Accedida el día 22 de septiembre 2019.
48. Mayo A, Cázares J, Lázaro E y Flores A. 2010. Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. Primera edición. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Agropecuarias. 11p.
49. McDonald E. 1999. Pag 50 y 51. Orchid botany and Nomenclature. En: McDonald E (Ed(s)). Ortho's All about Orchids (Ortho's All about Gardening). American Orchid Society, pag. 4 – 56.
50. Menchada R y Moreno D. 2011. Manual para la propagación de orquídeas. Primera edición. Editorial Vivir Mejor. México. 30p.
51. Minambiente. 2015. Colombia, país con mayor número de especies de orquídeas en el mundo. <http://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/1772-colombia-pais-con-mayor-numero-de-especies-de-orquideas-en-el-mundo>. Accedida el día 13 de septiembre 2019.
52. Monsalve M. 2017. Las orquídeas hablan sobre el cambio climático. El Espectador. Tomado de <https://www.elespectador.com/noticias/medio-ambiente/las-orquideas-hablan-sobre-el-cambio-climatico-articulo-722361>
53. Morley, R. 2009. Tropical Rain Forests. Earth system. Vol. 3: History and Natural Variability (eds V. Cilek), V.N. Livchits), & V. V Tokarev), Oxford Eolss Publishers, Oxford, UK.
54. Mota F. 2016. Especies de fauna y flora se mueren por las olas de calor. El Tiempo. Tomado de <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-16494817>
55. Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. Volumen 15. 437 – 497p.

56. Natutalisa. 2006. Flor de Cristo (*Epidendrum secundum*). <https://colombia.inaturalist.org/taxa/130068-Epidendrum-secundum>. Accedida el día 14 de noviembre 2019.
57. Nortcliff S. 1998. Human Activity and the Tropical Rainforest: Are the Soils the Forgotten Component of the Ecosystem?. In: Maloney B.K. (eds) Human Activities and the Tropical Rainforest. The GeoJournal Library, vol 44. Springer, Dordrecht.
58. Ordoñez J. 2016. Proyecto: Investigación e innovación tecnología y apropiación social del conocimiento científico de orquídeas nativas de Cundinamarca. Anexo 2: Guías curso teórico – práctico de taxonomía de orquídeas y manejo de colecciones de orquídeas. Pag. 9 – 12.
59. Osofu Aseiedu, A. 2008. El intercambio de experiencias y situación del conocimiento sobre la ordenación forestal sostenible de los bosques tropicales húmedos. Instituto de Pesquisas Espaciais – INPE. 249 – 250p.
60. Otero J y Bayman P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica de orquídeas epifitas. Acta Agron. Volumen 58, núm 4. 270 – 276p.
61. Palacios H. 2014. Inventario taxonómico de especies de la familia Orchidaceae en un área de bosque Andino del predio La Sierra, Santuario de fauna y flora Guanentá Alto Río Fonce. Trabajo de grado. Programa de Tecnología agroforestal. Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente ECAPMA. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Duitama. 103 p.
62. Pérez B y Castañeda S. 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. Biotecnología vegetal. Volumen 16 Núm 3. 143 – 151p.
63. Phillips OL, Lewis SL, Baker TR, Malhi Y. 2011. La respuesta de los bosques tropicales de América del Sur a los recientes cambios atmosféricos. En: Bush M., Flenley J., Gosling W. (eds) Respuestas de la selva tropical al cambio climático. Libros de Springer Praxis. Springer, Berlín, Heidelberg
64. Plana Bach, Eduard. 2000. La certificación forestal y la conservación de los bosques tropicales, enfoque crítico. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya. Universitat Autònoma de Barcelona., ES. 14 p.
65. Redacción AFP. 2019. La importancia de las selvas tropicales en la lucha contra el cambio climático. El Espectador. Tomado de <https://www.elespectador.com/noticias/medio-ambiente/la-importancia-de-las-selvas-tropicales-en-la-lucha-contra-el-cambio-climatico-articulo-881041>
66. Redacción El Tiempo. 2007. Colombia y el calentamiento global. El Tiempo. Tomado de <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-4200959>.
67. Roca W y Mroginski L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Primera edición. CIAT centro internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

68. Rojas G. 2011. Morfología y anatomía comparada de seis especies de orquídeas de los Andes Venezolano. Tipo (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Universidad de Los Andes. Mérida. Pag: 2.
69. Salazar S. 2012. Germinación de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). Acta Agronómica. Volumen 61, núm 1. 69 – 78 p.
70. Schiff JL. 2018 Historia de las orquídeas. En: Orquídeas raras y exóticas. Springer, Cham.
71. Segretín M. 2008. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).
<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>.
Accedida el día 27 de septiembre 2019.
72. Semana. 2016. “El país sigue muy atrasado en investigaciones sobre biodiversidad”. Revista Semana. Tomado de <https://www.semana.com/vida-moderna/articulo/brigitte-baptiste-habla-sobre-politica-ambiental-y-biodiversidad-en-colombia/474239>
73. Semana. 2017. Así sería Colombia en el 2100 por culpa del cambio climático. Revista Semana. Tomado de <https://www.semana.com/nacion/articulo/efectos-del-cambio-climatico-en-colombia-en-el-2100/512513>
74. Soto M. 2006. La vainilla: reto y perspectivas de su cultivo. CONABIO. Biodiversitas. 66: 1-9 p.
75. Tscharntke T., Leuschner C., Zeller M., Guhardja E., Bidin A. 2007. La estabilidad de los márgenes de la selva tropical, vinculando las limitaciones ecológicas, económicas y sociales del uso de la tierra y la conservación: una introducción. En: Tscharntke T., Leuschner C., Zeller M., Guhardja E., Bidin A. (eds) Estabilidad de los márgenes de la selva tropical. Ciencia e Ingeniería Ambiental (Ciencia Ambiental). Springer, Berlín, Heidelberg
76. WWF. 2017. La orquídea, un tesoro nacional. <http://www.wwf.org.co/?uNewsID=317184>. Accedida el día 13 de septiembre 2019.
77. Zheng, Daran, Shi, Gongle, Hemming, Sidney R, Zhang, Haichun, Wang, Weiming, Wang, Bo y Chang, Su Chin. 2019. Age constraints on a Neogene tropical rainforest in China and its relation to the Middle Miocene Climatic Optimum. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. Vol: 518, Pag 82 – 88.

2. CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Epidendrum* (ORCHIDACEAE), CUNDINAMARCA, COLOMBIA

2.1 RESUMEN

Colombia es el país más rico en biodiversidad de orquídeas, teniendo en cuenta las 4270 especies. Para el género *Epidendrum* se estima que hay más de 1000 variedades, las cuales el 12% son locales y se han visto amenazadas por cambios en uso del suelo, extracción masiva de especies y el calentamiento global. Para medir la viabilidad de sus semillas, se usó el método de Tetrazolio, con pretratamiento de hipoclorito en diferentes concentraciones. En evaluación del porcentaje de germinación, se sembraron aproximadamente 50 semillas de cada especie; la primera observación se hizo 15 días post siembra; posteriormente, cada ocho días evaluando la cantidad de embriones que rompieron la testa. Para la observación del desarrollo, se realizó un cultivo en medio MS donde se sembraron varias semillas, a las que se les hizo un seguimiento del crecimiento hasta aparecer la segunda hoja verdadera. Las semillas de *E. secundum* no arrojaron resultados en las primeras pruebas sin tratamiento; se esperó hasta que las cápsulas maduraran y abrieran, además de aplicar tratamientos con hipoclorito, que ayudan a escarificar la cubierta de las semillas permitiendo que la solución de tetrazolio ingrese con facilidad al embrión, arrojando resultados positivos. En semillas de *E. ibaguense* los efectos fueron menores. Esto pudo deberse a que el embrión es más delicado a la escarificación. El porcentaje de germinación en ambas especies arroja resultados muy bajos, posiblemente por el tipo de medio de cultivo, haciendo evidente la necesidad de otra fuente de nutrición para germinar rápida y exitosa. En las diferentes etapas de desarrollo de las especies *E. Secundum* y *E. ibaguense*, se realizó una observación total de un mes y 15 días. Para *E. ibaguense*, se observó crecimiento de los embriones a los 8 dds. Mientras que *E. Secundum* tuvo problemas con el medio al cual se realizó una modificación para ayudar a su germinación. La observación de la primera fase tardó 15 dds. Los estudios en este género son muy escasos, lo que genera gran importancia para su conservación. Aún falta explorar sobre la fisiología de este género y los recursos que podrían generar para su preservación.

Palabras clave: *E. secundum*, *E. ibaguense*, cultivo *in vitro*, conservación, viabilidad, germinación, desarrollo.

3. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas es una de las familias con mayor diversidad de flores, se estima que hay aproximadamente 35.000 especies registradas, se encuentran distribuidas en todo el mundo especialmente en la zona intertropical, sin embargo no se les puede encontrar en los desiertos y los polos. Su diversidad se debe a que es una familia botánicamente muy joven y tiene facilidad de hibridación no sólo entre especies sino también intergenéricamente. Algunos de estos híbridos son producidos por la mano del hombre, lo que genera nuevas especies y géneros en todo el mundo (Cox, 2013; Amaya, 2012; Giraldo y Betancur, 2011; Freuler, 2006).

Colombia y Ecuador comparten la mayor diversidad de especies, contando con alrededor de 9.000, de las cuales 4.270 se tienen registradas en Colombia con 1572 especies endémicas y 819 han sido registradas en los parques Naturales. Las especies se distribuyen de la siguiente manera: en el Pacífico hay 533 especies, en los Andes que posee una variedad geográfica abarca la mayor concentración con 2.542, para región de la Orinoquia 143 especies y para las regiones del Caribe y la Amazonia 1052 especies (Palacios, 2014; Minambiente, 2015; Humboldt, 2016).

Las plantas de la familia Orchidaceae se ubican entre las más vulnerables debido a su sobreexplotación del medio silvestre, tráfico ilegal, pérdida del hábitat y cambio climático, además de verse sometidas a una alta presión antrópica como el cambio del suelo (Tejeda *et al*, 2017; Díaz *et al*, 2019) adicionalmente existe poco conocimiento acerca de la ecología de esta familia como su distribución, la delimitación de las poblaciones, la polinización, entre otros (Valencia, 2014).

Colombia y Ecuador comparten la riqueza de orquídeas más grande del mundo, con cerca de 9000 especies registradas hasta el momento. Alrededor de 3000 se encuentran en algún grado de vulnerabilidad (Tejeda *et al*, 2017) debido a la pérdida de su hábitat y la extracción indiscriminada de su medio, otros factores de su pérdida se deben a la aplicación de glifosato y la utilización de pesticidas que causan un efecto negativo en la población de polinizadores y la disminución de hongos micorrízicos de los cuales dependen para su germinación, provocando una alteración en el entorno biótico (Muñoz y Gómez, 2015).

El género *Epidendrum* se distribuye por casi todo el mundo, sin embargo, presenta mayor concentración en las áreas tropicales. Se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, altitudinalmente se encuentra desde el nivel del mar hasta 3500 m.s.n.m (Farfán, 2008; Franzen *et al*, 2009). Este género cuenta con aproximadamente 2400 especies, de las cuales 527 se han registrado en Colombia y 186 son endémicas.

La principal característica de este género es su hábitat epífita que presenta la gran mayoría de las especies, pero algunas también poseen hábitos litófilos y terrestres, las cuales presentan tallos tipo caña que pueden alcanzar los 2 metros

de altura y algunos pueden presentar la formación de pseudobulbos. El carácter diagnóstico para este género son las flores, que poseen un labelo soldado a la columna, la presencia de cuatro polinarios y una hendidura en el rostelo. Este género es considerado como el más grande entre las orquídeas neotropicales, por lo que ha hecho que la clasificación de este género sea muy difícil para numerosos autores debido a la gran variación de las características florales y vegetativas (Álvarez *et al*, 2016; Hágsater *et al*, 2016).

Muchas de las orquídeas en Colombia se encuentran en algún grado de amenaza, sin embargo, para algunas especies que se encuentran dentro del género *Epidendrum* no se ha realizado una evaluación del estado de amenaza, por este motivo los estudios deben priorizarse (Castellanos y Torres, 2018; Calderón S, 2006).

Algunas especies de este género son poco estudiadas ya que se consideran de poco valor comercial, debido a que son muy comunes en estado silvestre (Castellanos C y Torres G, 2018), pero algunos científicos e indígenas ecuatorianos las consideran de gran valor por sus propiedades medicinales, el uso de las hojas y las flores se usan como laxante o tónico, sus flores se usan para tratar trastornos nerviosos y controlar la temperatura corporal durante el resfriado (Durán M *et al*, 2019), además de ofrecer servicios ecosistémicos como bioindicadores de la buena salud del ecosistema ya que cumplen funciones importantes como capturar y fijar el CO₂ de la atmósfera por medio de la fotosíntesis (Castellanos y Torres, 2018; Duarte D *et al*, 2002).

La conservación *in situ* es la estrategia que más se recomienda para muchas de las especies de valor comercial dado que el cultivo *in vitro* suele ser muy difícil y costoso, sin embargo, estos métodos de investigación (*in situ* y *ex situ*) y las acciones de conservación de las orquídeas en peligro de extinción son requeridas para desarrollar la eficiencia en estrategias para su conservación y de esta forma contribuir a la prevención de la extinción de la diversidad de esta familia en Colombia (Gil K, 2012).

El cultivo *in vitro* es una estrategia para ayudar a la disminución de especies silvestres, este método se ha convertido en una herramienta importante en el control de enfermedades y la producción en masa de cosechas de diferentes plantas de interés económico, como los frutales, maderables o la flores de ornamentación (Morales E, 2012).

En Colombia los estudios están centrados en la producción de orquídeas a partir de cultivo *in vitro* para la restauración de especies en el ecosistema, estos planes de estudio también aplican para el género *Epidendrum*, el cual posee gran diversidad de especies por esta razón, los estudios de ADN han posibilitado que se separen en nuevos géneros (Fisher, 2007). Por ejemplo ta (Dressler R, 1972) haciendo de esta especie endémica de esta zona tanto,. De esta forma se abre una posibilidad a futuros estudios con dichas especies poco estudiadas.

Adicionalmente, existen estudios basados en el tratamiento de las semillas de orquídeas que naturalmente necesitan de agentes para lograr su germinación, entre los cuales, desarrollan una relación simbiótica con hongos tales como micorrizas. En el presente estudio se evaluará la viabilidad, la germinación y el desarrollo de dos especies de *Epidendrum*, bajo condiciones *in vitro*, de esta forma se espera generar nuevas metodologías para la conservación de especies silvestres.

4. METODOLOGÍA

4.1 Área de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Química Bioorgánica y cultivo de tejidos de la Universidad Militar Nueva Granada sede campus Cajicá, Cundinamarca.

4.2 Recolección de material vegetal

Las cápsulas de *Epidendrum* fueron colectadas entre los meses de febrero a octubre de 2018 y de Agosto a Septiembre de 2019, las primeras se recogieron en el municipio de Ubaté (5°18'24.22"N y -73°48'52.44"O) y en el Club de profesores de la Universidad Nacional Los Búhos en la Sabana de Bogotá (4° 781" 103' N y -74° 090" 436' W). Las cápsulas se conservaron en bolsas de papel y conservadas en refrigeración a 4°C hasta su siembra. Esta recolección de especímenes está bajo la autoridad Nacional de Licencias Ambientales – ANLA, resolución número 1198 del 15 de Octubre de 2014.

4.3 Medios de cultivo

El medio de cultivo basal en cuanto a sales y vitaminas fue Murashige y Skoog (MS) (1962) adicionado con 30 g/L de sacarosa, 7.5 g/L de agar (PhytoTech Labs, A111 Agar, Plant TC), y el pH fue ajustado a 5,8. Para los medios usados con *E. secundum*, se agregó inositol 0.1 g/L y carbón activado 2 g/L.

4.4 Cultivo *in vitro* de semillas de *Epidendrum*

4.4.1 Desinfección y siembra de cápsulas

Las cápsulas se lavaron con jabón suave y agua corriente, en seguida, bajo condiciones asépticas en cámara de flujo, se realizó el proceso de desinfección; en un vaso de precipitado estéril se agregaron 100 ml de alcohol antiséptico al 70% en el cual se colocaron las cápsulas durante dos minutos agitándolo suavemente, al terminar el tiempo se lavaron con agua destilada estéril para retirar el alcohol. A continuación, se agregó hipoclorito de sodio al 2% hasta cubrir las y una gota de Tween 20 y se agitó suavemente durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y para finalizar se flamearon

ligeramente.

Con ayuda de un bisturí se hizo un corte longitudinal en la cápsula y con una microespátula se retiraron las semillas y se sembraron en los medios de cultivo, los cuales se incubaron en condiciones controladas de luz con un fotoperiodo de 16/8 h y una temperatura promedio de 22°C.

4.4.2 Desinfección y siembra de semillas

Para la desinfección de semillas de cápsulas maduras, las semillas se depositaron en tubo de centrífugo estéril de 50 ml, luego se agregaron 20 ml de alcohol antiséptico al 70%, se agitó suavemente durante 5 segundos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril, a continuación se colocó hipoclorito 20 ml y una gota de Tween 20, se agitó suavemente por 5 minutos. Para finalizar se realizó tres lavados con agua destilada estéril y con una microespátula se colocaron en los medios de cultivo.

4.5 Evaluación de viabilidad de las semillas

Para la evaluación de la viabilidad de las semillas se tuvo en cuenta el peso de las semillas las cuales se pesaron 10 mg de cada especie, donde se realizó un conteo con ayuda de un estereoscopio donde se contaron 800 semillas, luego se colocaron en micro tubos, para su posterior evaluación empleando los siguientes métodos:

4.5.1 Método de Cloruro de Tetrazolio (TTC)

La evaluación se realizó siguiendo la metodología de Salazar S (2012), modificado. Las semillas fueron puestas a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0.5%, 1%, 1.5%, 2.0%, 2.5% y 3.0%) y luego. A continuación, fueron sumergidas en una solución de tetrazolio (2, 3, 5-cloruro trifeníl tetrazolio) al 1% con pH 6,5 durante 24 horas en condiciones de oscuridad a una temperatura de 20 °C, al finalizar se efectuó un lavado con agua destilada. Para determinar la viabilidad de la semilla, el embrión debía teñirse de color rojo. Para su posterior evaluación se realizó un conteo con ayuda de un estereoscopio.

4.5.2 Método de Carmín de Índigo (CI)

Para la evaluación de viabilidad por Carmín de índigo las semillas se cubrieron con la solución de carmín de índigo y se guardaron en oscuridad durante tres horas, al finalizar se lavaron con agua destilada para retirar el colorante. Para determinar la viabilidad de las semillas estas se debían teñir de azul, el cual indica cuántos embriones no son viables, ya que este procedimiento solo tiñe las células muertas. Para el conteo se usó un estereoscopio.

4.6 Evaluación de germinación de semillas

Para evaluar la germinación de las semillas se tuvo en cuenta la cantidad de semillas colocadas en cada caja Petri, para lo cual se pesaron aproximadamente entre 3,0 mg y 1,0 mg de semillas donde se encontraban cerca de 50 a 70 semillas. Luego fueron guardadas en micro tubos a temperatura ambiente.

Las semillas se sembraron con un día de por medio realizando tres repeticiones de cada una. Se hicieron tres observaciones, comenzando a los 15 dds (días después de la siembra), con ayuda de un estereoscopio. Se consideró una germinación exitosa cuando el embrión hubo aumentado de tamaño y roto la testa. Se realizó un conteo de las semillas y se calculó el porcentaje.

4.7 Identificación de las etapas de desarrollo

Para la identificación de las etapas de desarrollo se tomaron registros fotográficos con ayuda de un estereoscopio con cámara, empezando desde el día de su siembra y luego cada 8 días después de la siembra, hasta la aparición de la segunda hoja verdadera.

4.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se aplica un modelo logístico de distribución de Poisson, basado en la teoría de modelos lineales generalizados, dado que fue un análisis de conteo. El modelo empleado fue:

$$y_{ij} = \ln\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Con i : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Donde π representa la variable de interés en cada caso (No de tratamientos, especies y semillas viables y germinadas), μ : es el efecto de la media global y T : representa el efecto de cada uno de los tratamientos aplicados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de viabilidad de semillas

5.1.1 Método de Cloruro de Tetrazolio (TTC)

Como se mencionó anteriormente la prueba de cloruro de tetrazolio, nos permite conocer la viabilidad de las semillas, la cual se caracteriza por el contenido de sales incoloras, pero cuando entran en contacto con la actividad respiratoria de las

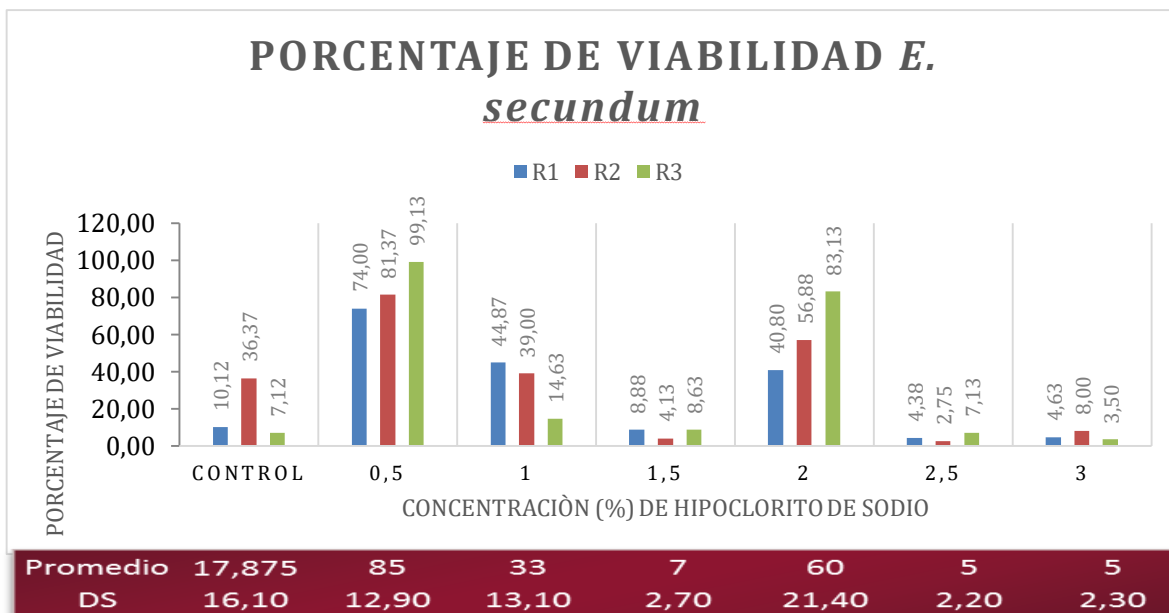
células, al liberar hidrogeno por la actividad deshidrogenasa, se reducen transformándola en trifenilformazan, tiñendo así los embriones de color rojo o rosado (Salazar S, 2012, Pérez F y Pita J, 2014; Malgarejo S, 2010). En la figura 10 podemos observar cinco embriones mostrando una escala de la tinción roja, indicando que el embrión teñido desde un 100% hasta un 50% son embriones viables.



Figura 10. Embriones de semillas de *Epidendrum* teñidas por TTC.

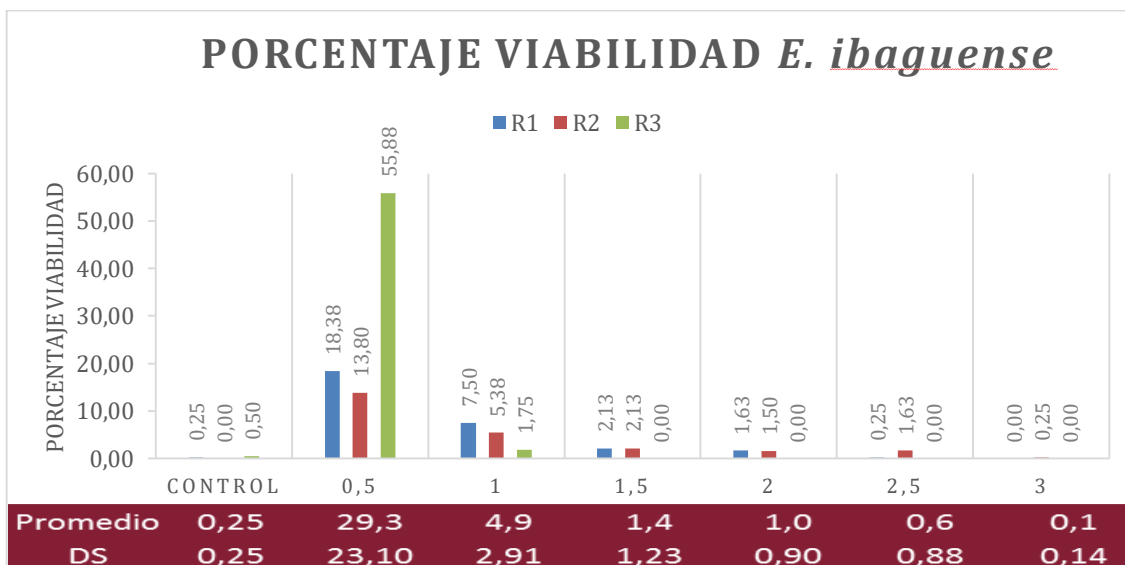
En los primeros ensayos, no se logra observar los resultados esperados de viabilidad, pero dichas semillas tenían altos porcentajes de germinación, por lo tanto, de acuerdo con el trabajo de Salazar M en el 2012, se decide realizar pretratamientos con hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones para lograr escarificar la testa y permitir el ingreso de la solución de tetrazolio al embrión. Se realizaron seis tratamientos con diferentes concentraciones 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% y 3,0%.

Se observó que las semillas que fueron tratadas con hipoclorito tuvieron diferentes respuestas de viabilidad dependiendo las concentraciones de hipoclorito. Las semillas de *E. secundum* mostraron mejor viabilidad en la concentración de 0,5%, con un promedio de 29,3%, al igual que *E. ibaguense* con un promedio de 85%. La desviación estándar muestra resultados altos debido a que las especies trabajadas son silvestres, lo que nos indica la gran variabilidad genética que pueden tener cada semilla dentro de una capsula.



Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad de *E. secundum* con el método TTC

De acuerdo con estos porcentajes de viabilidad, observados para ambas especies de orquídea, la concentración óptima de hipoclorito de sodio para el proceso de escarificación de la testa de las semillas es del 0,5%, este resultado es corroborado por la dispersión de Poisson ($<2e-16$), indicando una significancia para ambas especies.



Gráfica 2. Porcentaje de viabilidad de *E. ibaguense* con método TTC.

La viabilidad de los embriones en *E. ibaguense* comienza a decaer desde la concentración 1% siendo el 3% la viabilidad más baja, mientras que en *E. secundum* al 2% muestra resultados del 60% en promedio indicando que este

pretratamiento también es recomendado para la evaluación de la viabilidad de esta especie, pero al igual que *E. ibaguense* muestra una viabilidad baja a la concentración del 3% con 5%, Salazar (2012) registro para *C. mendelii* una viabilidad mayor en la concentración del 1% y menor al 3%. Lallana V y García L (2013), reportaron para *Trichocentrum jonesianum* 32% de viabilidad utilizando el pretratamiento de hipoclorito, pero añadiendo detergente.

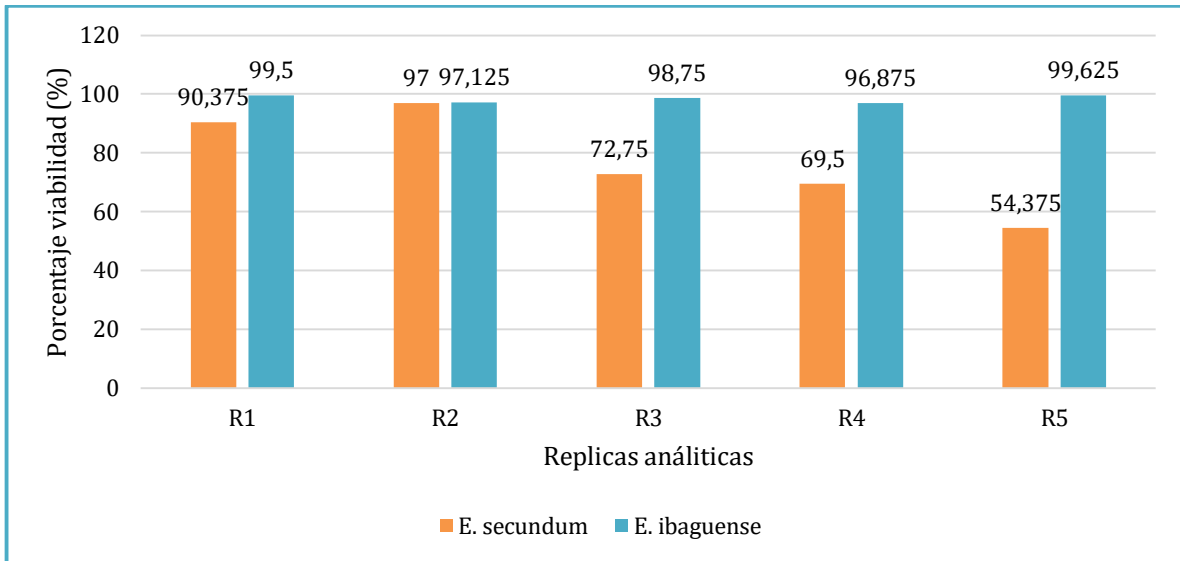
5.1.2 Método de Carmín de índigo (CI)

El método de Carmín de índigo produce una coloración diferencial de los tejidos vivos y muertos del embrión expuesto al colorante, de esta forma solo se tiñen de azul los tejidos muertos debido al aumento en la permeabilidad de la membrana, esta prueba no es reconocida por la ISTA, pero se ha usado para determinar la viabilidad de algunas plantas forestales (Salazar S y Gélvez J, 2015; Benito L *et al*, 2004).



Figura 11. Embriones teñidos por Carmín de índigo.

Para evaluar la viabilidad de las semillas con CI, la tinción azul del embrión debía estar entre un 50% a un 100% como indicativo de un embrión no viable ya que no es tejido vivo (Figura 11). Con la técnica de CI se reporta una viabilidad de las semillas en *E. ibaguense* de 99,6% y para *E. secundum* del 97,9% (grafica 3) de viabilidad, estos resultados se pueden relacionar con el trabajo de Salazar S y Gélvez J del 2015, quienes trabajaron con diversas especies de orquídeas, entre ellas del género *Epidendrum* en el cual se registró una viabilidad del 99,6%.



Gráfica 3. Porcentaje de viabilidad con Carmín de índigo de *E. secundum* y *E. ibaguense*.

5.2 Porcentaje de germinación de semillas

Para evaluar el porcentaje de germinación se tuvo en cuenta cuando la semilla se hubo hidratado y roto la testa (aparición del protocormo). Se realizó seguimiento cada 15 días observando los leves cambios que presentaban los embriones. A los 15 días después de la siembra (DDS) se observó que los embriones de *E. secundum* solo un promedio del 9% de semillas comenzaban a hidratarse, mientras que para *E. ibaguense* el 100% de las semillas habían tomado un color verde. Para los 30 días las semillas mostraron el siguiente paso del desarrollo en el cual aumenta el embrión, pero aun no rompía la testa, pero como mostro *E. ibaguense* no todas las semillas habían alcanzado esta etapa por lo cual en la gráfica 5 observamos que el porcentaje ha bajado, pero en el día 51 de observación en esta especie se logró un 99% de semillas germinadas, para *E. secundum* la germinación fue más, con un promedio de 55% de éxito en la germinación.

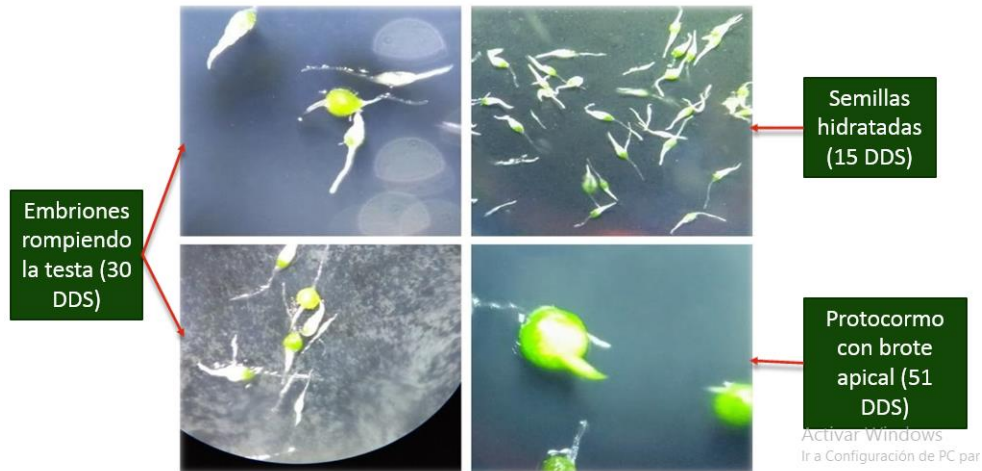
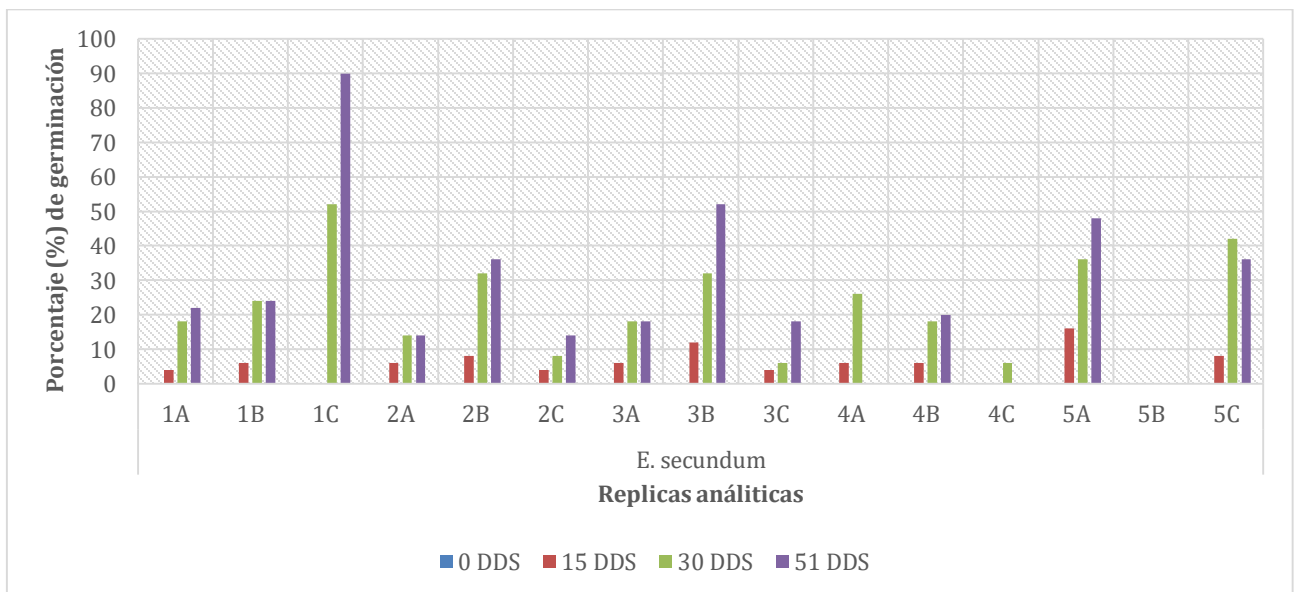


Figura 12. Semillas germinadas de *E. secundum* en medio de MS modificado con carbón activado e inositol.

Con respecto a las pruebas de germinación, se observa que el test de viabilidad de las semillas no da un resultado que refleje el estado morfológico de la semilla, o en este caso el efecto que tiene la concentración de hipoclorito de sodio, el cual puede afectar al embrión en el momento de evaluar su viabilidad o germinación. Por lo tanto, es importante trabajar estas pruebas conjuntas, ya que de esta forma se evidencia la factibilidad de germinación de las semillas en medios asimbióticos.



Gráfica 4. Porcentaje de germinación de *E. secundum*.

En la literatura se reporta que la germinación de las semillas de orquídea cultivadas a partir de cultivo *in vitro* puede variar dependiendo de la madurez de la

cápsula (Lee y Lee, 1991), la semilla o el tipo de orquídea corroborado por Díaz I y Salgado R (2006) al reportar que para nueve especies de orquídea (*Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Epidendrum radicans*, *Euchile citrina*, *Laelia albida*, *laelia autumnalis*, *Oncidium cavendishianum* y *Oncidium tigrimun*), que para lograr el 100% de la germinación, el tiempo varía para cada orquídea, pero en promedio oscila entre los 30 y 45 días después de la siembra.

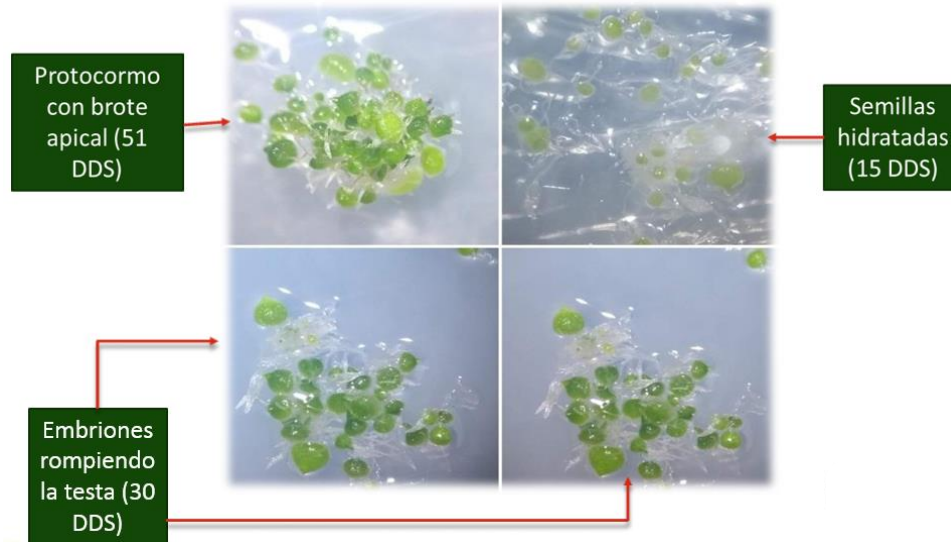
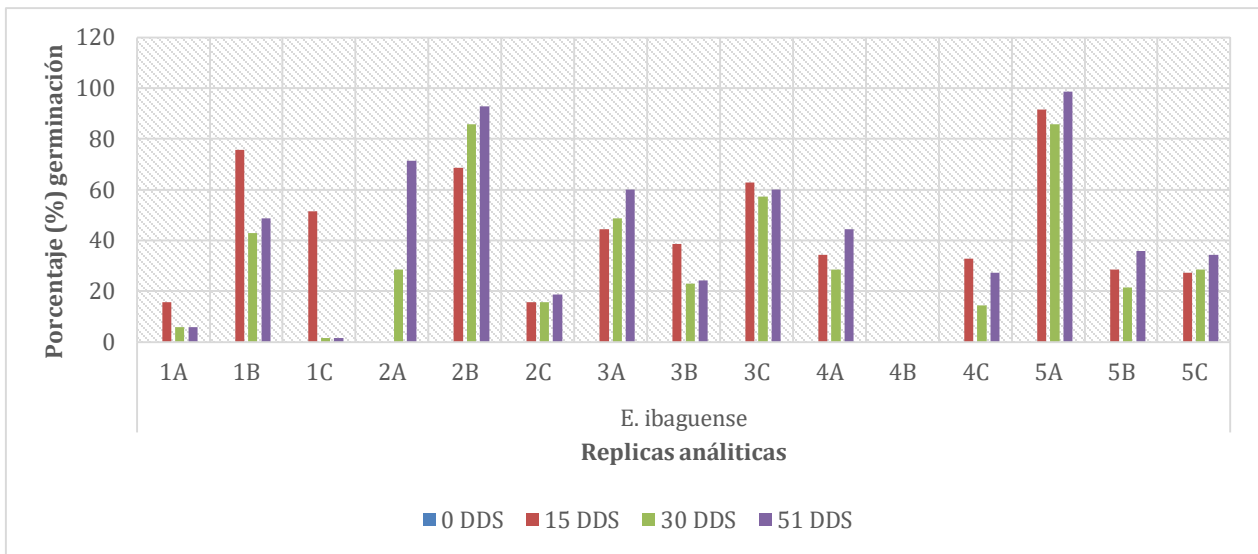


Figura 13. Semillas de *E. ibaguense* en medio MS sin modificación.

Las semillas de la gran mayoría de las orquídeas pueden germinar de forma asimbiótica, es decir, sin la necesidad de asociación con hongos micorrízicos. Sin embargo, existen reportes de (Junta de Andalucía, 2008) que evalúan la germinación de las semillas con diferentes modificaciones en los medios de cultivo para comparar la respuesta germinativa. Los resultados registrados por Damon y asociados en el 2004, con semillas inmaduras de tres especies de orquídea originarias de Chiapas, México (*Cattleya aurantica*, *Encyclia chacaoensis* y *Brassavola nodosa*), reportaron que los medios Hutner y Knudson modificados mostraron que la germinación de las orquídeas podía variar desde un 70% a un 92% de semillas germinadas.



Gráfica 5. Porcentaje de germinación de *E. ibaguense*.

Adicionalmente, los medios de cultivo suplementados con carbón activado han evidenciado una respuesta positiva en la germinación de *Epidendrum sp*, como se demuestra en el trabajo de Hunhoff y compañía en el 2018, en el cual obtuvieron mayor número de semillas germinadas, 100%, además de una formación de protocormos de mayor tamaño.

El medio basal utilizado de MS sin modificaciones y reguladores de crecimiento indicaron en el presente estudio que para especies como *E. secundum* y *E. ibaguense* no requieren de complementos para su germinación, pero se podría evaluar qué efectos tendría sobre estas si el medio variara en sus componentes, como lo reporta Rodríguez L y compañía en el 2007, lo cuales evaluaron tres medios cultivo diferentes entre los cuales se encontraba el medio MS son el 50% de sus sales, minerales y vitaminas, obteniendo en este el resultado más alto de germinación entre las especies con un 53%, se debe resaltar que este medio también tenía agregado carbón activado, este aditivo ejerce un efecto positivo en el cultivo de tejidos de orquídeas ya que permite la aireación del medio de cultivo y absorbe el etileno el cual puede inhibir el crecimiento de los embriones (Yam T y Arditti J, 2017).

5.3 Identificación de las etapas de desarrollo

El proceso de germinación y desarrollo es similar entre las orquídeas, sin embargo, el tiempo que toma la semilla para pasar de una fase a otra es diferente en cada especie (Arditti J, 1992). El desarrollo inicia cuando el embrión absorbe agua y este se hincha, alargando hasta tomar una forma esférica llamada protocormo. Posteriormente, el embrión sigue aumentando de tamaño hasta

romper la testa; el protocormo es la estructura de transición que le sigue a la germinación de las semillas, la formación del tallo y las raíces (Hunhoff *et al.* 2018; Duarte I, 2014).

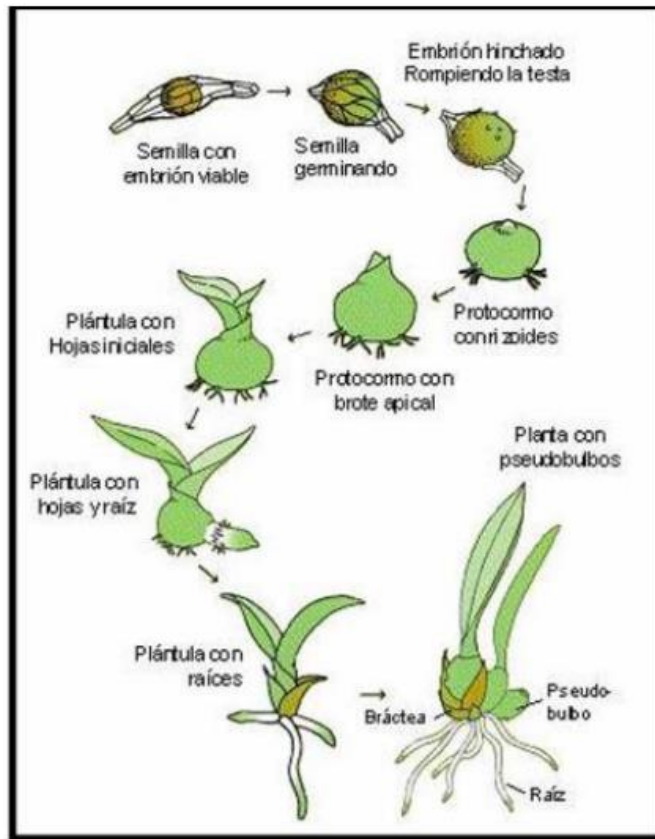


Figura 14. Estados de desarrollo de las orquídeas. Duarte I, 2014

En las dos especies se evidencia, luego de la germinación, el crecimiento del embrión con el primordio foliar que dará paso a la primera hoja verdadera. En *E. secundum* (Figura 15) el cambio de fase 1 a fase 2, el cual se considera como semilla germinada, tomó quince días, mientras que para *E. ibaguense* (Figura 16) solo tomó ocho días. Para las fases siguientes, se realizan observaciones semanales detallando que el desarrollo para ambas es igual, sin embargo, para *E. ibaguense* (Figura 16) la aparición de la segunda hoja toma un mes. En la literatura no hay muchos reportes sobre el desarrollo de estas especies en cultivo *in vitro*, por lo cual, la presente investigación, es uno de los primeros estudios en evidenciar el desarrollo de las semillas de orquídea en las dos especies de *Epidendrum* evaluadas en la presente investigación.

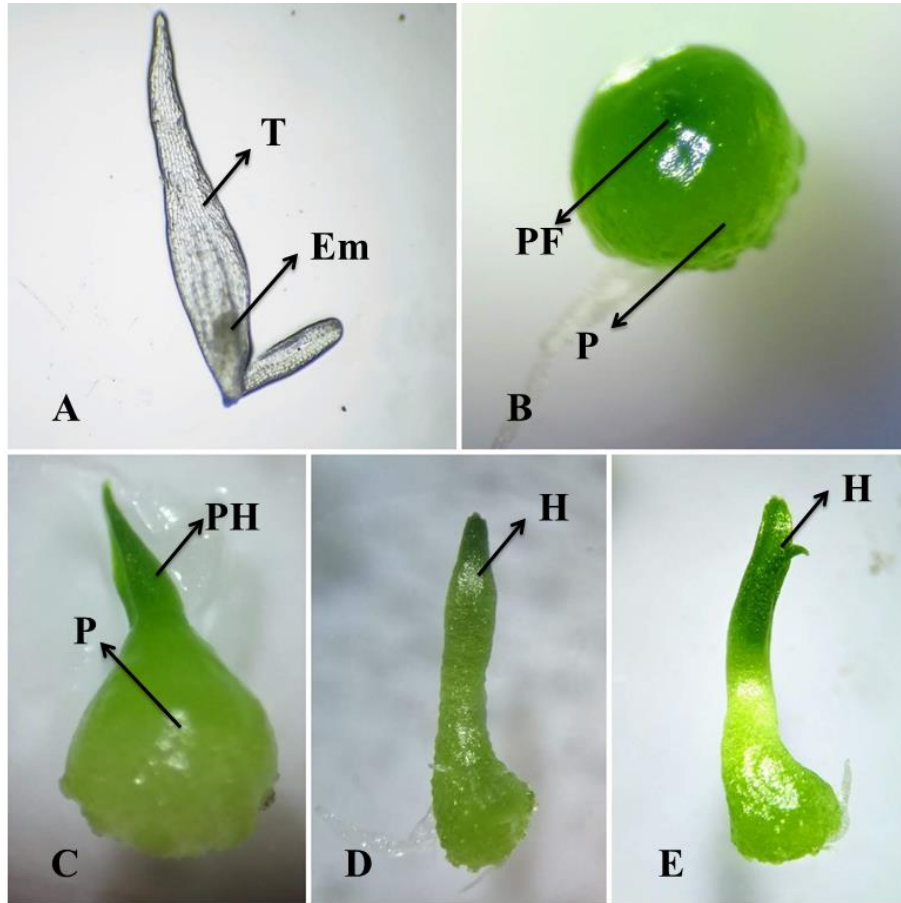


Figura 15. Etapas de desarrollo de *Epidendrum secundum*, (A) Fase 1: Semilla con embrión no germinado, (B) Fase 2: crecimiento del embrión y rompimiento de la testa, (C): Fase 3: Aparición de la primera hoja, (D) fase 4: Elongación de la primera hoja, (E) Fase 5: Aparición de segunda hoja y crecimiento de la plántula. T:Testa, Em: Embrión, P: Protocormo, PF: Primordio foliar, PH: Primera hoja, H: Hoja.

A los 45 días de desarrollo, se observó que los embriones germinados no ha habido un crecimiento de la raíz los reportes de Sair A (2012), Wida E y compañía (2015), sugieren la adición de complementos para el medio basal de MS, como el agua de coco, jugo de piña y vitaminas, los cuales han logrado obtener un 80% en la germinación, desarrollo y crecimiento de semillas de orquídeas. Por lo tanto se sugiere realizar la investigación con dichos parámetros, para así obtener mejores resultados en el éxito de la germinación y desarrollo de los géneros estudiados.

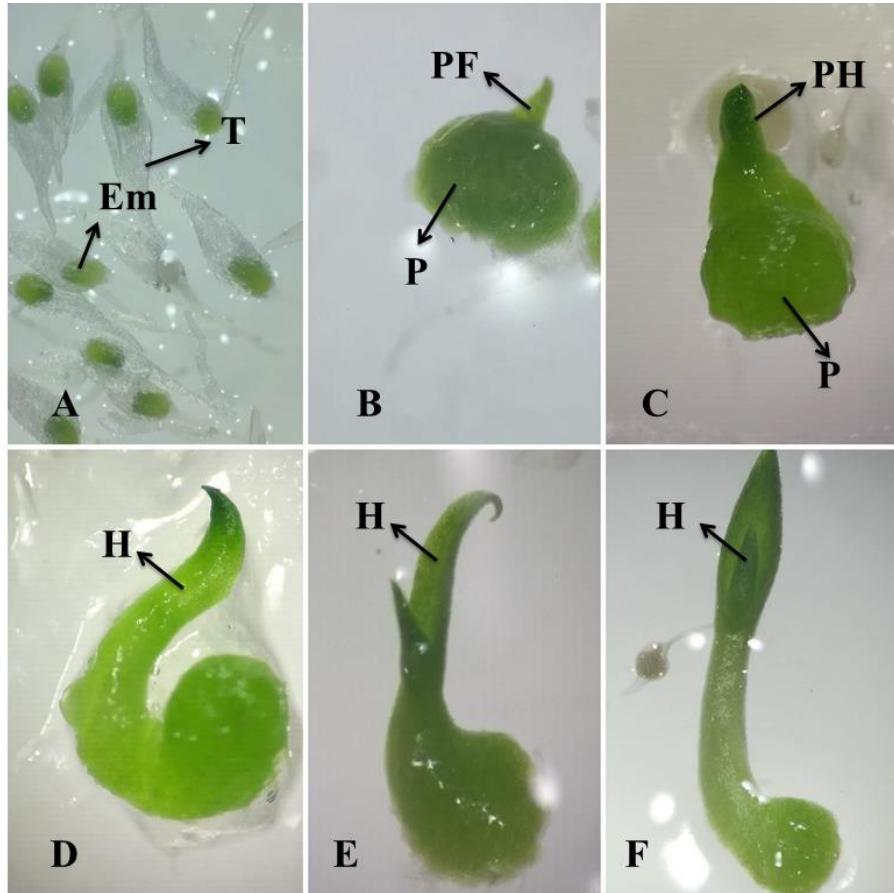


Figura 16. Etapas de desarrollo de *Epidendrum ibaguense*, (A) Fase 1: Semilla con embrión no germinado, (B) Fase 2: crecimiento del embrión, rompimiento de la testa y aparición de la primera hoja, (C): Fase 3: crecimiento del protocormo, (D) fase 4: Elongación de la primera hoja, (E) Fase 5: Aparición de segunda hoja y crecimiento de la plántula, (F) fase 6: Desarrollo posterior de la plántula T: Testa, Em: Embrión, P: Protocormo, PF: Primordio foliar, PH: Primera hoja, H: Hoja.

6. CONCLUSIONES

El test de tetrazolio junto con los pretratamientos con hipoclorito de sodio, permitió evaluar, la viabilidad de las semillas de *E. secundum* y *E. ibaguense*, indicando que la viabilidad de las semillas de una cápsula de orquídea puede llegar a tener del 90% al 99% de sus semillas viables.

El método de Carmín de Índigo sirve para establecer un test complementario para la observación de la viabilidad de las semillas, para darnos un total probable de semillas con embriones muertos, de esta forma vemos la capacidad de las semillas de *Epidendrum* para sobrevivir en el medio.

Se determinó que la germinación para *E. secundum* es necesario agregar al medio carbón activado e inositol para lograr un 90% de semillas germinadas, al contrario de *E. ibaguense* tuvieron un 93% de semillas germinadas en cultivos sin ningún tipo de modificación. El mejor porcentaje de germinación para ambas especies ocurrió a los 51 días después de la siembra.

Se logró identificar las primeras etapas de desarrollo en condiciones de cultivo *in vitro*; en los cuales se pueden evidenciar la germinación. Transcurrido un total de mes y medio de observación, se logró identificar la formación del protocormo y la generación de las primeras hojas, pero no el desarrollo de rizoides en el protocormo, ni el desarrollo de raíces. Por lo tanto, se espera en futuros estudios la obtención de estas mediante el uso de medios modificados suplementado con hormonas y complementos orgánicos que ayuden a su desarrollo.

El porcentaje de contaminación en los medios usados fue del 2%, indicando que el método de desinfección y asepsia usada es el indicado.

7. RECOMENDACIONES

En futuros estudios se esperaría la obtención de raíces mediante el uso de medios modificados suplementado con hormonas y complementos orgánicos que ayuden a su desarrollo.

Para evitar el error visual al momento de contar las semillas, se recomienda el uso de técnicas similares, a las usadas en el conteo de bacterias, a partir de tablas milimétricas que faciliten la tarea.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez Á, Jiménez D, Ortiz F, Solarte M, Bacca A. 2016. Revisión del género *Epidendrum* (familia - Orchidaceae) presente en el herbario PSO de la Universidad de Nariño; distribución geográfica, rango altitudinales y hábitat de crecimiento. Taller de investigación IV. Nariño. 14 p.
2. Amaya K. 2012. Evaluación del estado de conocimiento y conservación de la familia Orchidaceae, a través de colecciones *ex situ* en el departamento de Cundinamarca, Colombia. (Trabajo de grado). Facultad de estudios ambientales y rurales, programa de ecología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 71 p.

3. Ávila I y Salgado R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*. Volumen o. Núm 8. 138 – 149p.
4. Benito I, Herrero N, Jiménez I y Peñuelas J. 2004. Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: Test de tetrazolio e índigo carmín. *Cuad. Soc. Esp. Cien. For.* Volumen 17. 23 – 28p.
5. Calderón-Sáenz E. (ed.). 2006. Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 3: Orquídeas, Primera Parte. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. Instituto Alexander von Humboldt - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 828 p.
6. Castellanos-Castro, C., y Torres-Morales, G. (Eds.) 2018. Guía para la identificación y el cultivo de algunas especies de orquídeas nativas de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. 192 p.
7. Castellanos-Castro, C., y Torres-Morales, G. (Eds.) 2018. Guía para la identificación y el cultivo de algunas especies de orquídeas nativas de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. 192 p.
8. Cox L. 2013. Orquídeas: Importancia y uso en México. *Bioagrociencias*. Vol 6: 1-7 p.
9. Damon A, Aguilar E, Rivera L y Nikolaeva V. 2004. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. Volumen 10. Núm 2. 195 – 203p.
10. Duarte D, Gómez S y Monsalve H. 2002. Orquídeas. <http://sie.car.gov.co/bitstream/handle/20.500.11786/33803/29121.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Accedida el día 20 de Noviembre 2019.
11. Duarte I. 2014. Germinación *In vitro* de *Barkeria uniflora* Lex. Dressler & Halbinger, una orquídea endémica de México. Tipo (Tesis). Facultad de estudios superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

12. Durán M, Caroca R, Jahreis K, Narváez M, Ansaloni R y Cazar M. 2019. The micorrryzal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid. *South African Journal of Botany*. Vol: 125(2019). Pag 54-61
13. Farfán J. 2008. Estrategias reproductivas de la orquídea *Epidendrum xanthinum* Lindl., en la Cordillera Occidental, Valle del Cauca. Tipo (Trabajo de grado). Facultad de ciencias, Departamento Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 88 p
14. Fisher A. 2007. Cultivo de Orquídeas. Buenos Aires: Grupo Imaginador.
15. Franzen J, Goldenberg R, Barros F. 2009. O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta. Bot. Bras.* 23(3): 864-880 p.
16. Freuler M. 2006. Orquídeas. Editorial Albatros. Buenos Aires. 47 p.
17. Gil K. 2012. Evaluación del estado de conocimiento y conservación de la familia Orchidaceae, a través de colecciones *Ex situ* en el departamento de Cundinamarca, Colombia. Tipo (Trabajo de grado). Facultad de Estudios Ambientales y Rural. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. 71p.
18. Giraldo G y Betancur J. 2011. Guía de campo de las orquídeas de Santa María (Boyacá, Colombia). Serie Guías de Campo del Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. No. 9. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 188 p.
19. Hágsater E, Santiago E, Rodríguez L. 2016. *Epidendrum lasiostachyum* (Orchidaceae): a new Colombian species of the *Epidendrum macrostachyum* grup. *Lankesteriana*. 16(1): 27-37 p.
20. Humboldt. 2016. Diversidad de orquídeas en Cundinamarca. <http://reporte.humboldt.org.co/biodiversidad/2016/cap4/401/index.html#seccion1> . Accedida el día 13 de Septiembre 2019.
21. Hunhoff V, Lage L, Palú E, Krause W y Silva C. 2018. Nutritional requirements for germination and in vitro development of three Orchidaceae species in the southern Brazilian Amazon. *Ornamental Horticulture*. Volumen 24. Núm 2. 87 – 94p.
22. Junta de Andalucía, 2008, Las orquídeas, https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural._Usos_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpe/orquideas_grazalema/03_orquideas.pdf, Accedida el día 20 de Noviembre 2019).
23. ISTA (International Seed Testing Association). 1996. International Rules for Seed Testing. *Seed Science & Technology*. Volumen 24 Supplement. 335p.

24. Lallana y Garcia L. 2013. Efecto de pretratamiento en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). Investig. Agrar. Volumen 15. Núm 2. 129 – 132p.
25. Lee J y Lee H. 1991. Micropropagación de orquídeas a partir de semillas. Boletín informativo de FIRA XXIV. Volumen 2. 15 – 30p.
26. Melgarejo L. 2010. Experimentos en Fisiología Vegetal. Primera Edición. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. 16p.
27. Minambiente. 2015. Colombia, país con mayor número de especies de orquídeas en el mundo. <http://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/1772-colombia-pais-con-mayor-numero-de-especies-de-orquideas-en-el-mundo>. Accedida el día 14 de Noviembre 2019.
28. Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* Volumen 15. 437 – 497p.
29. Morales E. 2012. Propagación *in vitro* de *Bletia purpurea* Lam para la producción de semillas sintéticas. Tipo (Tesis). Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco, A.C. Mérida, Yucatan, Mexico. 80 p.
30. Palacios H. 2014. Inventario taxonómico de especies de la familia Orchidaceae en un área de bosque Andino del predio La Sierra, Santuario de fauna y flora Guanentá Alto Río Fonce. Trabajo de grado. Programa de Tecnología agroforestal. Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente ECAPMA. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Duitama. 103 p.
31. Pérez F y Pita J. 2014. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Hojas Divulgadoras. Núm 2112. 2 – 15p.
32. Rodríguez L, González R, Alvarado K y Telles E. 2007. Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres. *Biotecnología vegetal.* Volumen 7. Núm 3. 139 – 142p.
33. Salazar S y Gélvez J. 2015. Determining the Viability of Orchid seeds using the Tetrazolio and Carmín Índigo Test. *Revista de ciencias.* Volumen 19. Núm 2. 59 – 69p.

34. Salazar S. 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). Acta Agronomica. Volumen 61. Núm 1. 69 – 78 p.
35. Wida E, Purnobasuki H, Soedaeti T y Hariyanto S. 2015. Asymbiotic Seed Germination and *in vitro* Seedling Development of *Paphiopedilum liemianum* Fowliw, an Endangered Terrestrial Orchid in Northern Sumatra, Indonesia. Journal of Plant Sciences. Volumen 10. Núm 1. 25 – 34p
36. Yam T y Aditti J. 2017. Micropropagation of Orchids. Tercera edición. 10.1002/9781119187080.

enero

39. Dressler R. 1972. *Epidendrum ibaguense*, su distribución y variación. https://www.researchgate.net/publication/257132490_Epidendrum_ibaguense_su_distribucion_y_variacion. Accedida el día 20 de enero 2020.