

Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae)

Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae)

Seir Antonio Salazar-Mercado¹

¹Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente, grupo de Investigación Ambiente y Vida, semillero Grupo Académico de Investigaciones Agrobiotecnológicas (GAIA), Universidad Francisco de Paula Santander. Avenida Gran Colombia No. 12E-96B Colsag. San José de Cúcuta, Colombia
Correspondencia: Salazar663@hotmail.com

Rec.: 16.01.12 Acept.: 15.03.12

Resumen

Cattleya mendelii es una orquídea endémica de Colombia de gran valor ornamental que se encuentra en peligro de extinción a causa de la recolección masiva y a la destrucción de sus hábitats naturales por la acción antrópica. El cultivo in vitro es una alternativa para la conservación de esta especie o su comercialización. En esta investigación se evaluaron la germinación asimbiótica y el desarrollo de plántulas de las semillas de orquídeas de la especie *C. mendelii*, en diferentes medios de cultivos in vitro. Inicialmente se recolectaron cápsulas maduras; posteriormente, se determinó la viabilidad de las semillas con la prueba de Tetrazolio. En forma paralela, las semillas se desinfectaron y sembraron con el método de jeringuilla para evaluar el efecto de cinco medios de cultivo en el desarrollo de *C. mendelii* después de dieciséis semanas de cultivo. Se encontró que la viabilidad de las semillas fue del 93%. El mejor porcentaje de germinación se halló en el medio de cultivo Murashige-Skoog más agua de coco (MS + AC) con diferencias significativas ($P < 0.05$, Tukey) con respecto a los demás medios de cultivo. En este estudio se demostró que los medios de cultivos MS suplementados con agua de coco y jugo de piña fueron más eficientes en la germinación asimbiótica y en el desarrollo de plántulas en la orquídea *C. mendelii* con respecto a los otros medios de cultivo, lo cual los convierte en una opción en la reducción de los costos generados por la utilización de las fitohormonas.

Palabras clave: *Cattleya mendelii*, cultivo in vitro, desarrollo embrionario, germinación, medio de cultivo, tetrazolio.

Abstract

Cattleya mendelii is an endemic orchid species from Colombia, which has a great ornamental value which is in danger of extinction due to massive collection and their natural habitat's destruction by human activities. In vitro culture is an alternative to preserve this species and/or carry out its marketing. In this study the asymbiotic germination and seedling development of seeds of *C. mendelii*, in several in vitro culture media were evaluated. Mature capsules were collected. Seed viability with tetrazolium test was done; seeds were disinfected at the same time and planted by the syringe method to evaluate the effect of five growth culture media on the development of *C. mendelii* after 16 weeks of cultivation. It was found that seed viability was 93%, the highest percentage of germination was found in the culture medium Murashige-Skoog plus coconut water (MS+AC) with significant differences compared to other culture media ($P < 0.05$, Tukey). This study showed that MS medium supplemented

with coconut water and pineapple juice, were more efficient in asymbiotic germination and seedling development of *C. mendelii* orchids compared with other culture media. It could be an option to reduce the costs generated by using phytohormones.

Key words: *Cattleya mendelii*, culture medium, embryonic development, germination, in vitro culture, tetrazolium.

Introducción

La familia Orchidaceae tiene una amplia diversidad en el reino Plantae con un estimado de 750 géneros y entre 25.000 y 30.000 especies en todo el mundo (Thorpe y Yeung, 2011). Gracias a su capacidad evolutiva, presenta variaciones en el tamaño, la forma, la textura y el color de la flor (Nagaraju y Mani, 2005). Colombia, según los datos más recientes, registra 4.010 especies, distribuidas en 260 géneros (Mejía y Pino, 2010). En Norte de Santander se han descrito 37 géneros y 105 especies, dentro de los que se destaca *Cattleya mendelii* (Díaz *et al.*, 2004), flor nativa de Colombia donde crece en afloramientos rocosos y en las copas de árboles de gran tamaño en la cordillera Oriental de los Andes en los departamentos de Santander y Norte de Santander, a 1200-800 m.s.n.m. (Santos *et al.*, 2010). Las plantas poseen flores grandes y vistosas que les proporcionan un gran valor ornamental y económico. Florece una vez por año entre abril y mayo. Esta especie se encuentra en peligro según el libro rojo de las plantas de Colombia (Calderón, 2007), es decir, enfrenta un alto riesgo de extinción o deterioro poblacional en estado silvestre. Esta amenaza es causada por la recolección excesiva e ilegal con fines comerciales y por la destrucción de los árboles hospederos y su hábitat natural (Salazar *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). Además, la germinación de las orquídeas en estado silvestre presenta algunas limitaciones, como la poca reserva de nutrientes en las semillas, lo cual es un factor limitante para su germinación y supervivencia in vivo; por tanto, es necesario establecer asociaciones simbióticas, principalmente con micorrizas, para lograr su germinación en condiciones naturales (Chen y Chen, 2007).

El primer método para la germinación de semillas de orquídeas (Moore, 1849) con interés hortícola significó un cambio importante y radical de la manera como otras semillas

de orquídeas fueron germinadas hace 160 años (Arditti, 1984; Yam *et al.*, 2002; Yam y Arditti, 2009). Medio siglo después del descubrimiento de Moore, Noël Bernard formuló un método para la germinación simbiótica de semillas de orquídeas in vitro (Rasmussen, 1995; Yam *et al.*, 2002).

Lewis Knudson desarrolló un método para la germinación asimbiótica in vitro de semillas de orquídeas (Knudson, 1921; Yam *et al.*, 2002), que fue el primer procedimiento práctico para la propagación in vitro de cualquier planta en condiciones axénicas, demostrando así que era posible la germinación sobre un medio simple que contuviera minerales y azúcares. La investigación desarrollada por Knudson conmocionó el mundo de las orquídeas al demostrar que las semillas de *Cattleya*, *Vanilla* y otras eran capaces de germinar asimbióticamente in vitro (Knudson, 1946). Otros autores, como Arditti (1982) y Fast (1980), han contribuido a la formulación de medios de cultivos para muchos géneros y especies diferentes.

El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) ha sido probado en la germinación y crecimiento de muchas especies de orquídeas con resultados óptimos gracias a su contenido de sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, lo que brinda un alto grado de nitrógeno y potasio, necesarios para la nutrición. Se debe mencionar que el cultivo in vitro de semillas de orquídeas es favorecido con la adición de suplementos orgánicos y *fitohormonas* al medio de cultivo (Malgren, 2006; Arditti, 2008; Pedroza, 2009; Cancino y Salazar, 2011).

Los métodos de cultivo in vitro están siendo utilizados con éxito para la conservación y propagación de especies de orquídeas en peligro de extinción y de importancia medicinal (Deb y Pongener, 2011; Stewart y Kane, 2006; Lo *et al.*, 2004). Cuando se evalúan las condiciones de germinación es importante te-

ner en cuenta la viabilidad de las semillas en estudio, lo que permite brindar un estimado de la proporción de semillas que no germinará, como consecuencia de condiciones desfavorables causadas por la falta de viabilidad (Muñoz y Jiménez, 2008). En orquídeas, el método más utilizado para la determinación de la viabilidad de las semillas es la prueba bioquímica de tetrazolio (Johnson *et al.*, 2007; Lauzer *et al.*, 2007; Vujanovic *et al.*, 2000) que detecta signos de vida o actividad metabólica. Las semillas viables tienen una fácil identificación gracias a su característica coloración roja (Mweetwa *et al.*, 2008). En el presente estudio se evaluó la germinación asimbiótica de semillas y el desarrollo in vitro de plántulas de *C. mendelii*. Además, se determinó la viabilidad de las semillas de la especie la cual se compara con el porcentaje de germinación.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las cápsulas maduras dehiscentes de *C. mendelii* fueron recolectadas en el municipio de Bochamela, Norte de Santander, Colombia, el 30 de marzo del 2011. Estas cápsulas habían sido polinizadas manualmente en invernadero, transfiriendo dos polinias al estigma de otra flor, utilizando pinzas finas. Se emplearon en total cuatro plantas: dos donadoras y dos receptoras. Seguidamente, las semillas maduras fueron retiradas de las cápsulas para ser almacenadas en sobres de papel Kraft a 4 °C dentro de frascos de vidrio que contenían también sílica gel (agente desecante) para evitar el deterioro de las semillas por la humedad (Dutra *et al.*, 2008; Vogel y Macedo, 2011).

Viabilidad de semillas

Las semillas fueron sometidas a concentraciones de hipoclorito de sodio al 0.5%, 1%, 1.5%, 2.0%, 2.6%, 3.0%. Posteriormente, su viabilidad fue evaluada por medio de la prueba de tetrazolio [2,3,5-cloruro trifenil tetrazolio (CTT: C₁₉H₁₅ClN₄)]. Se sumergieron 100 semillas de orquídeas en la solución de CTT (1%) (1 g en 100 ml de buffer fosfat: 0.9 % Na₂HPO₄ 2H₂O + 1.1 % KH₂PO₄, pH 6-7)

durante 24 horas en la oscuridad (Muñoz y Jiménez, 2008; Ossenbach *et al.*, 2007), antes de ser examinadas en microscopio estereoscópico (Leica EZ4). El proceso para medir la viabilidad se repitió cinco veces. Las semillas viables se tiñeron de rojo debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células. Esta prueba es aceptada por la International Seed Testing Association (ISTA, 1985).

Desinfección y siembra de semillas

Para la desinfección y siembra de las semillas se utilizó el método de la jeringuilla (Vendrame *et al.*, 2007), el cual consiste en colocar algunas de ellas en una jeringa estéril de 5 ml con un filtro de tela. Las semillas se sumergieron en la solución de etanol al 70% durante 30 segundos, luego fueron sometidas a la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0% con dos gotas de *Tween-20*® (agente tensio-activo) durante cinco minutos en agitación constante. Seguidamente se realizaron cinco lavados con agua desionizada estéril y se retiró el filtro de la jeringa para llevar a cabo la siembra en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar. Se cultivaron 100 semillas en cajas de Petri que contenían 25 ml del medio de cultivo.

Medio asimbiótico y condiciones de cultivo

El medio de cultivo basal fue MS en concentraciones de macro y micronutrientes al 100% (Murashige y Skoog, 1962) con 3000 mg/l de sacarosa, 700 mg/l de agar, 100 mg/l de myo-inositol y 1000 mg/l de carbón activado. Se emplearon cinco medios de cultivo: medio basal MS como control, MS suplementado con jugo de piña (MS+JP), MS con agua de coco (MS+AC), MS más 0.5 mg/l de ácido indolacético (AIA) y MS con 0.5 mg/l de ácido giberélico (MS+GA3). Los medios con suplementos orgánicos se prepararon adicionando 200 ml/l (20%) de agua de coco y jugo de piña, respectivamente. El jugo de piña se preparó utilizando una licuadora, posteriormente se filtró con gasa, se puso en ebullición por diez minutos y se almacenó en frascos de vidrio (200 ml) a -80 °C. El medio fue ajustado a un pH de 6.0 usando NaOH o HCl al 0.5 M. Se esterilizó a 15 libras de presión (Psi) a 121 °C

durante 20 minutos. Los medios de cultivo fueron incubados en condiciones ambientales controladas (23 ± 2 °C, fotoperiodo de dieciséis horas de luz y ocho horas de oscuridad, con una intensidad de luz $25 \mu\text{mol/m}$ por segundo provista por luz fluorescente y 60% de humedad relativa).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental consistió en un factorial 6 x 5 completamente al azar (seis fases del desarrollo y cinco medios de cultivo), con cinco repeticiones y promedio de tres cajas de Petri (cada una con 100 semillas) para un total de 75 unidades experimentales. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (Anova) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples de HSD (*honesto diferencia significativa*) de Tukey para determinar las diferencias significativas a un nivel de $P < 0.05$ (Tukey, 1994).

El proceso de germinación de semillas a formación de plántulas fue evaluado cada dos semanas durante dieciséis semanas después de la siembra, mediante las fases del desarrollo de orquídeas adaptadas por Vasudevan y Staden (2010) (Cuadro 1). Además, se midió el porcentaje total de germinación in vitro para efectos de comparación con la prueba de viabilidad, sumando las fases del desarrollo de semillas de orquídeas 1, 2, 3, 4 y 5, de cada medio de cultivo utilizado (MS, MS+JP, MS+AC, MS+AIA y MS+GA3); posteriormente, se obtuvo el promedio de la germinación (porcentaje de germinación). También se determinó el coeficiente de correlación entre la concentración de hipoclorito de sodio y el porcentaje de viabilidad. Para el análisis

Cuadro 1. Fases de desarrollo de semillas de orquídeas.

Fase	Descripción
0	Semillas con embrión no germinaron.
1	El embrión aumenta de tamaño.
2	Ruptura de la testa.
3	Formación de protocormos y rizoides.
4	Aparición de la primera hoja.
5	Elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior.

Fuente: Modificado de Vasudevan y Staden, 2010.

estadístico se utilizó el software Statgraphic Centurión XV versión 15.2.05 (2006).

Resultados y discusión

Porcentaje de viabilidad en relación con la concentración de hipoclorito de sodio

El mayor porcentaje de viabilidad de *C. mendelii* se encontró en las semillas tratadas con hipoclorito de sodio al 1%, y el menor en el tratamiento con mayor concentración de este compuesto (3%) (Figura 1). De acuerdo con estos resultados, se puede decir con una probabilidad del 95% que el hipoclorito de sodio tiene una influencia moderadamente fuerte en la viabilidad de las semillas y un coeficiente de correlación R^2 igual a 0.7841 (Figura 1, Foto 1). Alvarez-Pardo *et al.* (2006) al asociar la viabilidad de semillas con concentraciones diferentes de hipoclorito de sodio, encontraron un mayor porcentaje de viabilidad en *C. bicolor*. El hipoclorito de sodio escarifica la cubierta de las semillas permitiendo con ello que la solución de tetrazolio penetre fácilmente y estimulando su germinación (Rännbäck, 2007; Vasudevan y Staden, 2010).

La prueba de tetrazolio es un método recomendado debido a su eficiencia y facilidad de uso. Las semillas viables son fácilmente identificadas por su coloración roja característica debida a la reacción que ocurre en las células vivas la cuales liberan hidrógeno por la actividad deshidrogenasa en el proceso de la respiración (Vujanovic *et al.*, 2000; Ossenbach *et al.*, 2007; Muñoz y Jiménez, 2008).

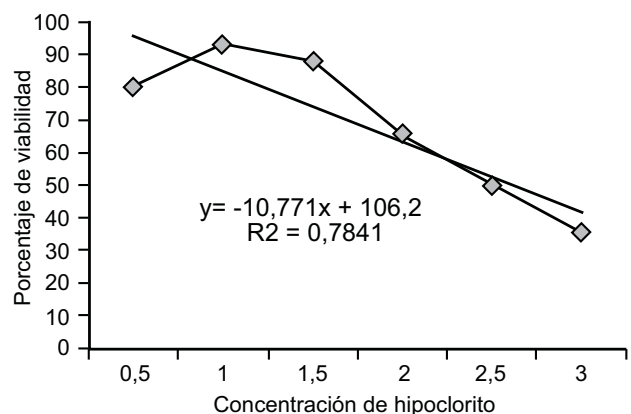


Figura 1. Correlación entre el porcentaje de viabilidad y la concentración de hipoclorito de sodio.

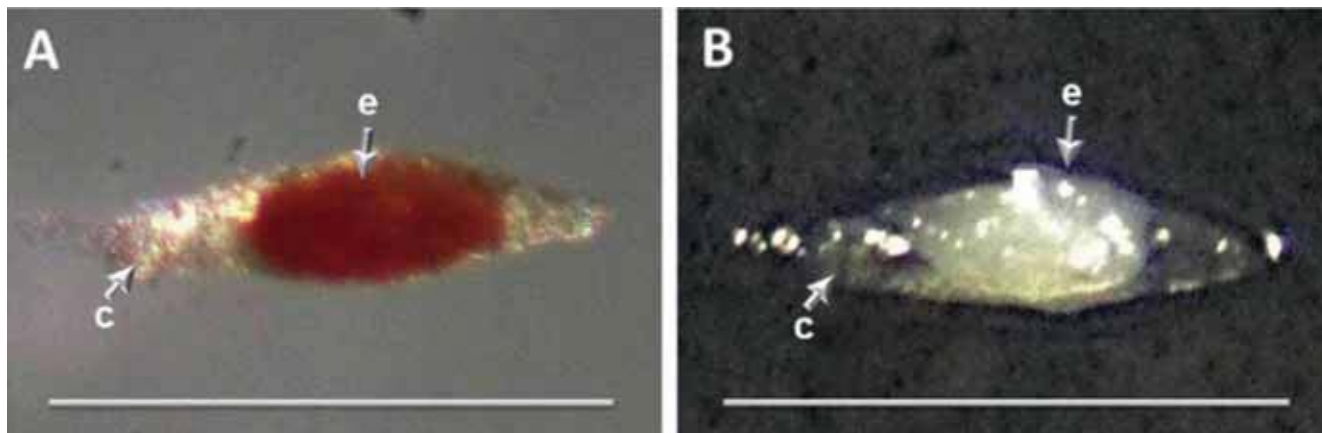


Foto 1. Evaluación de la viabilidad de *Cattleya mendelii*, usando la prueba de Tetrazolio. (A) semilla viable. (B) semilla no viable. La sal de Tetrazolio es una solución incolora, soluble y oxidada. Cuando hay presencia de actividad respiratoria se reduce, produciendo un precipitado rojo insoluble llamado Formazán. Escala de la barra 1 mm. **c:** cubierta de la semilla; **e:** embrión.

Viabilidad y germinación de semillas

En promedio, la viabilidad de *C. mendelii* fue alta (93%). Lauzer *et al.* (2007) y Vujanovic *et al.* (2000) demostraron que la prueba de viabilidad no es un buen indicador de germinación ya que no evalúa la capacidad de división celular y el desarrollo (Padilla, 2011). Por esta razón, la validez de esta prueba debe ser confirmada con pruebas de germinación en vivero (Johnson *et al.*, 2007; Muñoz y Jiménez, 2008).

La germinación asimbiótica in vitro de semillas de *C. mendelii* en los cinco medios de cultivo evaluados, fue, en promedio, del 94.1% (Cuadro 2). La diferencia entre la prueba de germinación y la prueba de viabilidad fue del 1.1%, lo que indica que no existen diferencias ($P < 0.05$) entre ambas. Esto demuestra que la prueba de tetrazolio puede ser utilizada para predecir la capacidad de germinación de *C. mendelii*. Hosomi *et al.* (2011) utilizaron la prueba de tetrazolio para estimar la viabilidad de semillas de *Cattleya* sp. con fines de propagación y conservación. También se ha empleado para determinar la capacidad de germinación y el crecimiento de plántulas en una amplia gama de especies de orquídeas (Stewart y Kane, 2006; Yamazaki y Miyoshi, 2006; Mweetwa *et al.*, 2008; Cancino y Salazar, 2011). No obstante, la prueba se basa únicamente en las condiciones internas de las semillas y no revela el comportamiento combinado de su calidad con ciertas condiciones de crecimiento (Ossenbach *et al.*, 2007).

Además, la viabilidad de las semillas de diferentes cápsulas varía considerablemente y en muchas especies de orquídeas disminuye durante el almacenamiento (Vendrame *et al.*, 2007; Hirano *et al.*, 2011).

Medio de cultivo, germinación asimbiótica y desarrollo de plántulas

El porcentaje de germinación de *C. mendelii* fue constante a partir de la semana cuatro (Figura 2). El mayor porcentaje se encontró en el medio MS+AC ($P < 0.05$) (Cuadro 2). El mayor porcentaje de formación de protocormos ocurrió en el medio MS+JP que no fue diferente ($P > 0.05$) del medio MS+AC (Cuadro 2). Resultados similares hallaron Stewart y Kane (2006) con la formación de protocormos de *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae). Kitsaki *et al.* (2004) encontraron que el medio de cultivo enriquecido con agua de coco era más adecuado para la germinación y

Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo en el porcentaje de germinación y formación de protocormos de *Cattleya mendelii*. Evaluación realizada a los 120 días de cultivo.

Medio de Cultivo	Porcentaje de germinación	Formación de protocormos
MS	92.86 a*	12.798 a
MS + JP	94.06 bc	26.198 b
MS + AC	95.7 d	23.464 bc
MS + AIA	93.34 ab	13.73 a
MS + GA3	94.5 c	20.398 c

*Valores en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey.

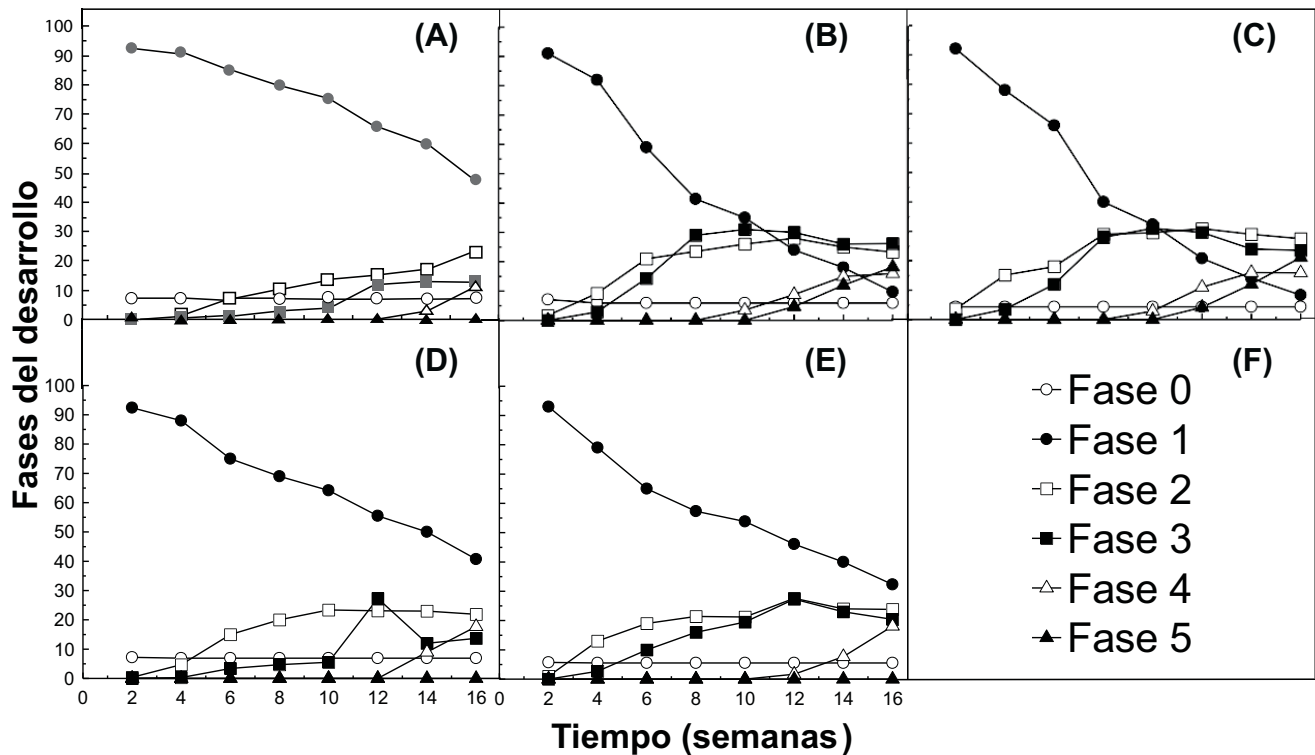


Figura 2. Fases del desarrollo de *Cattleya mendelii* cultivada en cinco medios. **(A)** medio de cultivo MS (Murashige y Skoog). **(B)** MS + Jugo de piña. **(C)** MS + Agua de coco. **(D)** MS + ácido indolacético. **(E)** MS + ácido giberélico. **(F)** símbolos de las fases.

formación de protocormos de *Ophrys* que el enriquecido con jugo de piña. Independientemente del hábito de crecimiento y de la taxonomía, muchas especies pueden tener diferentes requisitos de germinación (Vogel y Macedo, 2011). Además, es posible inferir que la germinación es influenciada no sólo por el medio de cultivo, sino también por la madurez y calidad de las semillas (Lo *et al.*, 2004; Yam y Arditti, 2009).

Las fases del desarrollo de *C. mendelii* (Foto 2 y Figura 2) fueron muy variables en los medios en el transcurso de las dieciséis semanas evaluadas, a diferencia de la fase 0, en la cual no varió a partir de la semana cuatro en todos los medios (Foto 2A). En las demás etapas del desarrollo se halló que el mayor porcentaje en la Fase 1 (Foto 2B y C) ocurrió en el medio MS (47.33%; ($P < 0.05$) (Figura 3). En la Fase 2 (Foto 2D) el desarrollo fue poco equilibrado en los medios de cultivos (MS: 22.798; MS+JP: 23.33; MS+AC: 27.57; MS+AIA: 21.864 y MS+GA3: 23.796; Figura 3). En la Fase 3 (Foto 2E y F) el mayor porcentaje

se encontró en el medio MS+JP (26.198) (Figura 3); no obstante, no fue diferente ($P > 0.05$) con el desarrollo en el medio MS+AC (23.464). En la Fase 4 (Foto 2G) las plántulas en el medio MS presentaron un menor desarrollo (10.794) en relación con los otros medios de cultivo y no se encontraron diferencias entre ellos. ($P > 0.05$; Figura 3). El desarrollo en la Fase 5 (Foto 2H e I) solamente se alcanzó en los medios MS+JP y MS+AC, pero las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$).

Kitsaki *et al.* (2004) encontraron que el medio de cultivo suplementado con agua de coco es más eficaz en las primeras fases del desarrollo (1, 2 y 3), a diferencia del medio de cultivo suplementado con jugo de piña el cual es mejor para las fases 4 y 5. Por el contrario, en la presente investigación se evidenció que los medios MS+AC y MS+JP fueron los mejores en todas las fases del desarrollo de *C. mendelii*. No obstante, los demás medios de cultivo utilizados fueron eficientes hasta la Fase 4 de cultivo. Pedroza (2009) demostró que la adición de AIA (0.5 mg/l) al medio de

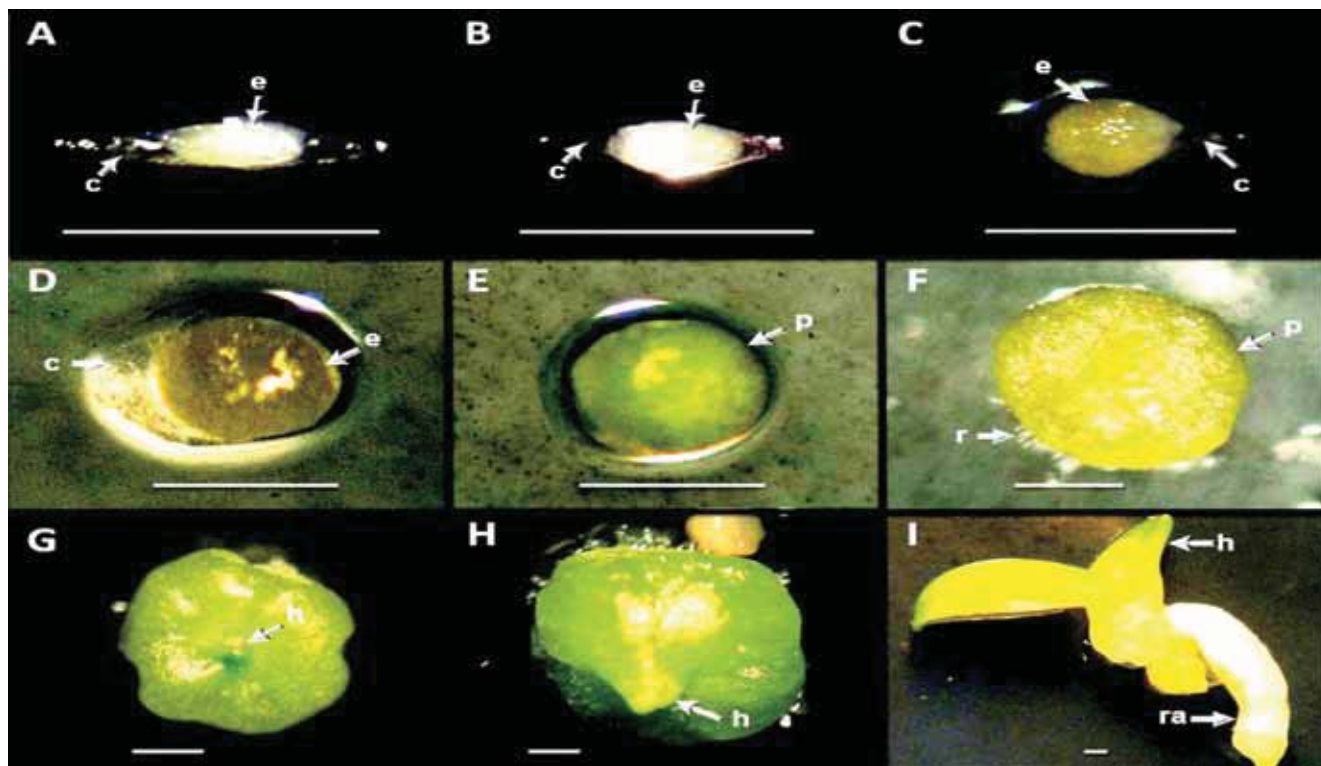


Foto 2. Fases del desarrollo de *Cattleya mendelii* desde la germinación de la semilla a formación de la plántula en medio de cultivo in vitro asimbiótico. **(A)** Fase 0: Semilla con embrión no germinaron. **(B y C)** Fase 1: El embrión aumenta de tamaño. **(D)** Fase 2: Ruptura de la testa. **(E y F)** Fase 3: Formación de protocormos y rizoides. **(G)** Fase 4: Aparición de la primera hoja. **(H y I)** Fase 5: Elongación de la primera hoja y su desarrollo posterior. Escala de la barra = 1mm. **c:** cubierta de la semilla; **e:** embrión; **h:** hoja; **p:** protocormo; **r:** rizoide; **ra:** raíz.

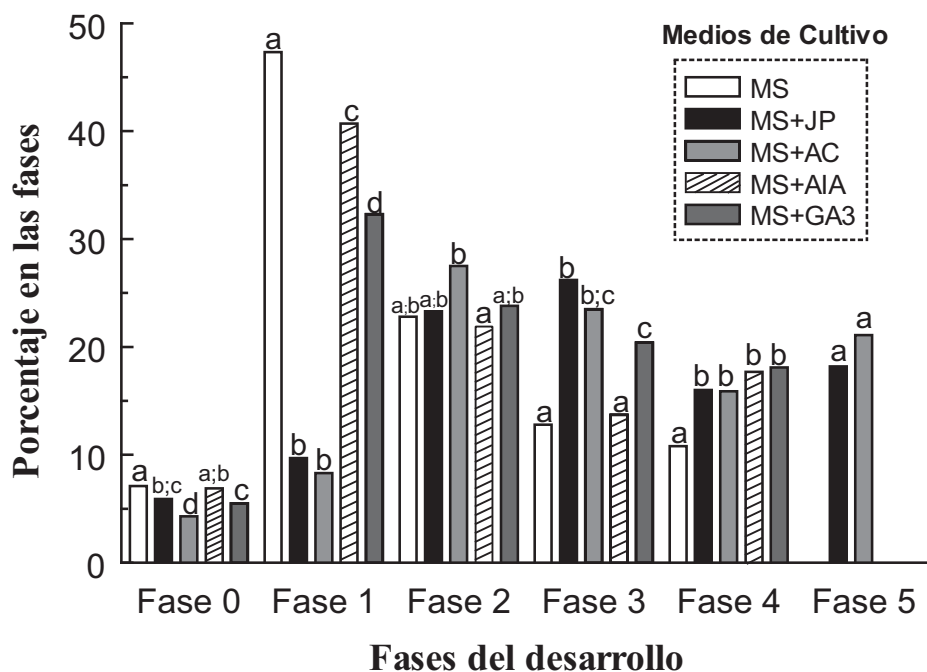


Figura 3. Efecto del medio de cultivo en las fases del desarrollo de *Cattleya mendelii*. Las barras con distinta letra dentro de cada fase demuestran diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con la prueba de Tukey HSD ($P < 0.05$). Evaluación realizada a las 16 semanas de cultivo.

cultivo MS promueve las fases del desarrollo de *Epidendrum elongatum* (Orchidaceae). En otros estudios, igualmente se demostró el efecto benéfico del AIA cuando se agrega al medio de cultivo MS (Farias y Arciga, 2011). Manrique *et al.* (2005) y Coello *et al.* (2010) encontraron que el GA3 puede acelerar la germinación y el crecimiento de las orquídeas, lo cual no coincide con los hallazgos del presente estudio, en el que el efecto de los fitorreguladores AIA y GA3 no fue óptimo para las fases de desarrollo de la planta. Cabe anotar que tanto el agua de coco como el jugo de piña contienen altos niveles de vitaminas, aminoácidos y fitohormonas y son muy energéticos (Kitsaki *et al.*, 2004; Yam y Arditti, 2009; Yong *et al.*, 2009). En esta investigación se encontró que la adición de estos aditivos orgánicos al medio MS mejoró su eficiencia y por tanto favorecen un mayor crecimiento y desarrollo de *C. mendelii*.

Conclusiones

- El presente estudio demostró que los medios de cultivos MS suplementados con componentes orgánicos como agua de coco y jugo de piña, favorecieron la germinación asimbiótica y el desarrollo in vitro de plántulas en la orquídea *C. mendelii*, siendo esta una combinación adecuada para producir múltiples plantas y reintroducir especies en peligro de extinción en sus hábitats naturales.
- La utilización de suplementos orgánicos en los medios de cultivo podría ser una alternativa para la reducción de los altos costos generados por el uso de fitohormonas en el medio de cultivo. Asimismo, la prueba de tetrazolio es un método eficaz para predecir la capacidad germinativa en las semillas de *C. mendelii*.
- Son necesarios estudios relacionados con la multiplicación y el endurecimiento de especies de orquídeas en riesgo de extinción y con valor ornamental, que ayuden en su conservación o comercialización. Además, se recomienda la evaluación de otros componentes orgánicos con diferentes especies de orquídea para comprobar su efectividad.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) y a la Universidad Francisco de Paula Santander por el apoyo brindado a esta investigación. También a Fernando Barrientos y a Lilian Trinidad por su valiosa colaboración; a Yuri Osorio por su asistencia técnica y a Jean Denis por su aporte del material vegetal.

Referencias

- Alvarez-Pardo, V. M.; Ferreira, A. G; y Nunes, V. F. 2006. Seed disinfection methods for in vitro cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Hortic. Bras.* 24:217 - 220.
- Arditti, J. 1982. Introduction, north american terrestrial orchids. En: *Orchid biology. II. Reviews and perspectives. Orchid seed germination and seedling culture – a manual.* Ithaca, Nueva York: Cornell University Press. p. 245-73, 278-93.
- Arditti, J. 1984. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Bot J Linn Soc.* 89:359 - 381.
- Arditti, J. 2008. *Micropropagation of orchids*, 2nd edn. Blackwell, Cambridge.
- Calderón, E. 2007. Libro Rojo de plantas de Colombia. Vol. 6. Orquídeas primera parte, Instituto Alexander von Humboldt – Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Bogotá, Colombia.
- Cancino, G. O y Salazar, S. A. 2011. Evaluación del efecto de suplementos orgánicos en la germinación in vitro de dos especies de orquídeas de la provincia de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Memorias. VI Congreso Colombiano de Botánica Biodiversidad, Desarrollo y Cultura: Una Visión Integradora.* Cali, 11-15 de agosto (CD-rom).
- Coello, C.; Miceli, C.; Orantes, C.; Dendooven, L.; y Gutiérrez, A. 2010. Plant growth regulators optimization for in vitro cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W. E. Higgins. *Gayana Bot.* 67(1):19 - 26.
- Chen, W. y Chen, H. 2007. *Orchid Biotechnology.* World Scientific. Editorial: World Scientific Pub Co Inc.
- Deb, C. y Pongener, A. 2011. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: a multipurpose orchid. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 20(1):90 - 95.
- Díaz, J.; Solano, F.; Sánchez, L.; y Espinosa, F. 2004. Riqueza y distribución de las Orquideaceae

- en la provincia de Pamplona. *Bistua* 2(1):106 - 112.
- Dutra, D.; T. R. Johnson, P.J.; Kauth, S. L.; Stewart, S.; y Kane, M. 2008. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* 94:11 - 21.
- Farias, H. y Arciga, M. 2011. Germinación in vitro de *Guarianthe aurantiaca* Bateman (Orchidaceae) (Tesis de Biólogo, Michoacana de San Nicolás de Hidalgo).
- Fast, G. 1980. Propagation and cultivation. En: Fast, G., Ulmer, Stuttgart (eds.). *Orchid culture. Botanical principles, cultural practices, plant descriptions.* p. 207 - 23.
- Hirano, T.; Yukawa, T.; Miyoshi, K.; y Mii, M. 2011. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds for seeds of some *Cymbidium* species. *Plant Biotechnol.* 28:99 - 102.
- Hosomi, S. T.; Santos, R. B.; Custodio, C. C.; Seaton, P. ; Marks, T. R.; y Machado Neto, N. B. 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Sci. Technol.* 39:178 - 189.
- ISTA (International Seed Testing Association). 1985. International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 13:300 - 520.
- Johnson, T.; Stewart, L.; Dutra, D.; Kane, M.; y Larry Richardson. 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 90:313 - 323.
- Kitsaki, C.; Zygouraki, S.; Ziobora M.; y Chintziest, S. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Rep.* 23:284 - 290.
- Knudson, L. 1921. La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. *Bol. Real Soc. Española Hist. Nat.* 21:250 - 260.
- Knudson, L. 1946. A nutrient for germination of orchid seeds. *Am Orchid Soc Bull* 15:214 - 217.
- Lauzer, D.; Renaut, S.; Arnaud.; y Barabé, D. 2007. In vitro asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *J. Torrey. Bot. Soc.* 134(3):344 - 348.
- Lo, S.; Wade, S.; Kuo, C.; Chen, C.; y Tsay, H. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino—a medicinally important orchid. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40:528 - 535.
- Malgren, S. 2006. *Orchid propagation.* Consultado en Junio 1, 2012, en <http://www.lidaforsgarden.com/Orchids/engelsk.htm>
- Manrique, J.; Fernandez, C.; y Suárez, A. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcata* seeds under in vitro conditions. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41:838 - 843.
- Mejía, H. y Pino, T. 2010. Diversity of orchids epiphytes in a tropical rain forest (Bh-T) of department Chocó, Colombia. *Acta biol. Colomb.* 15(2):37 - 46.
- Muñoz, M. y Jiménez, V. 2008. Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. *Lankesteriana* 8(2):23 - 31.
- Moore, D. 1849. On growing orchids from seeds. *Garden Chron.* 35:549.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:437 - 497.
- Mweetwa, A. M.; G. E. Welbaum, D.; y Tay. 2008. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on in vitro germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Sci Hortic.* 117:257 - 262.
- Nagaraju, V. y Mani, S. K. 2005. Rapid In vitro Propagation of Orchid *Zygopetalum intermedium*. *J. Plant. Biochem. Biot.* 14:27 - 32.
- Ossenbach, C.; Arce, J.; y Warner, J. 2007. Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. *Tierra Tropical.* 3(1):47 - 59.
- Padilla, J. 2011. Prueba de viabilidad con tetrazolio. Consultado en Diciembre 8, 2011, en <http://snics.sagarpa.gob.mx/Documents/pruebaviabilidad>.
- Pedroza, J. 2009. The effect of activated charcoal, indol acetic acid (IAA) and benzylaminopurine (BAP) on *Epidendrum elongatum* Jacq protocorm-like body (PLB) development in in vitro conditions. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 6(1):17 - 32.
- Rännbäck, L. 2007. Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium* spp. Dept. of Crop Science, SLU. Bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme. 2007:1.
- Rasmussen, H. 1995. *Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant.* Cambridge University Press, Nueva York.
- Santos, C. G.; Ordoñez, J. C.; y Morales, L. 2010. Colección viva de especies amenazadas. contribución del jardín botánico José Celestino Mutis. (on-line). Bogotá, Colombia: Jardín Botánico José Celestino Mutis. ISBN 978-958-8576-04-6.

- Salazar, F. J.; Benavides, O. L.; Trespalacios-González y L. F. Pinzón. 2010. Informe sobre el Estado de los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente, Componente de Biodiversidad Continental - 2009. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos. Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C., Colombia. 167 p.
- Statgraphics Centurión XV © 2006 by StatPoint, Inc. Version 15.2.05 1. 1982-2007. <http://www.statgraphics.com>.
- Stewart, S. y Kane, M. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid Plant. Cell. Tiss. Organ Cult. 86:147 - 158.
- Thorpe, T. A. y Yeung, E. C. 2011. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 710, DOI 10.1007/978-1-61737-988-8_20, © Springer Science+Business Media, LLC.
- Tukey, J. W.. 1994. The problem of multiple comparisons. En: H. L. Braun (ed.). The collected works of John W. Tukey. Nueva York: Chapman and Hall. Vol. VIII, Chapter 1, p. 1 - 300.
- Vasudevan, R. y Staden, J. 2010. In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. Sci Hortic. 123:496 -504.
- Vendrame, W. A.; Carvalho, V. S.; y Dias J. M. 2007. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. Sci Hortic 114(3):188 – 193.
- Vogel, I. y Macedo, A. 2011. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult. 104:147 - 155.
- Vujanovic, V.; Arnaud, M.; Barabe, D.; y Thibeault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. Ann. Bot. 86:79 - 86.
- Yamazaki, J. y Miyoshi, K. 2006. In vitro Asymbiotic Germination of Immature Seed and Formation of Protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). Ann. Bot. 98, 1197-1206.
- Yam, W.; Nair, H.; Hew, S.; y Arditti, J. 2002. Orchid seeds and their germination: An historical account. In: Kull T, Arditti J (eds.). Orchid biology: reviews and perspectives. Kluwer Dordrecht. vol. 8:387 - 504.
- Yam, T. y Arditti J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Plant Biotechnol Rep. 3:1 - 56.
- Yong, J.; Ge, L.; Yan, N.; y Tan, S. N. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Molecules 14:5144 - 5164.