

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADO
EFICIENCIA DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS BASALES: SÓLIDO Y LÍQUIDO,
EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LA ORQUÍDEA
“TRIPITA” *Trichopilia tortilis* Lindl

PRESENTADO POR:
ISRAEL ERNESTO MENDOZA ABARCA

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

DOCENTE DIRECTOR:
Msc. RICARDO FIGUEROA CERNA

COORDINADOR GENERAL DEL PROCESO DE GRADO:
Lic. OSCAR ARMANDO GUERRA ASCENCIO

NOVIEMBRE, 2014
SANTA ANA EL SALVADOR CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADO
EFICIENCIA DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS BASALES: SÓLIDO Y LÍQUIDO,
EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LA ORQUÍDEA
“TRIPITA” *Trichopilia tortilis* Lindl

PRESENTADO POR:
ISRAEL ERNESTO MENDOZA ABARCA

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

DOCENTE DIRECTOR:
Msc. RICARDO FIGUEROA CERNA

ASESOR EXTERNO
Biol. e Ing.: NELLY RUTH GUERRERO DE MENÉNDEZ
COORDINADOR GENERAL DEL PROCESO DE GRADO:
Lic. OSCAR ARMANDO GUERRA ASCENCIO

NOVIEMBRE, 2014
SANTA ANA EL SALVADOR CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

EFICIENCIA DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS BASALES: SÓLIDO Y LÍQUIDO,
EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LA ORQUÍDEA
“TRIPITA” *Trichopilia tortilis* Lindl

PRESENTADO POR:
ISRAEL ERNESTO MENDOZA ABARCA

PARA OPTAR AL GRADO DE: LICENCIADO EN BIOLOGÍA

F. _____

Lic. Oscar Armando Guerra Ascencio
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y COORDINADOR GENERAL DEL
PROCESO DE GRADO:

F. _____

Msc. Ricardo Figueroa Cerna ASESOR

F: _____

Biol. e Ing.: Nelly Ruth Guerrero De Menéndez ASESOR

JURADO

F. _____

Msc. Max Alfredo Carranza Martínez **Presidente**

F. _____

Lic. Juan Arnoldo Amaya Nolasco **Secretario**

F. _____

Msc. Ricardo Figueroa Cerna **Vocal**

NOVIEMBRE, 2014

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



RECTOR:

Ing. MARIO RORBERTO NIETO LOVO

VICE-RECTOR ACADÉMICO:

Msc. ANA MARÍA GLOWER DE ALVARADO

VICE-RECTOR ADMINISTRATIVO:

Msc. ÓSCAR NOÉ NAVARRETE ROMERO

SECRETARIO GENERAL:

Dra. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FISCAL GENERAL:

Lic. FRANCISCO CRUZ LETONA

NOVIEMBRE, 2014

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES DE LA FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA
DE OCCIDENTE



DECANO

Msc. RAÚL ERNESTO AZCÚNAGA LÓPEZ

VICE-DECANO

Ing. WILLIAM VIRGILIO ZAMORA GIRÓN

SECRETARIO

Lic. VICTOR HUGO MERINO QUEZADA

JEFE DE DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Lic. OSCAR ARMANDO GUERRA ASENCIO

NOVIEMBRE, 2014

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO:

Por haberme dado la vida y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. Sin Él nada fuera posible.

A MI MADRE:

Dora Isabel Monterrosa quien siempre ha estado a mi lado brindándome amor, consejo, comprensión, apoyo cuando más los he necesitado. Me ha dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para alcanzar mis metas.

A MI PADRE.

Este es un logro que quiero compartir contigo Ernesto Emilio Mendoza, en la distancia tus oraciones fueron un apoyo fundamental, mil gracias por estar ahí y darme oportuno consejo. Gracias a Dios por tu familia y tu Ministerio.

A MI HERMANA

Abigail Mendoza con mucho cariño, gracias por creer en mí y brindarme siempre tu apoyo, te quiero mucho hermanita.

A MIS TIA/OS:

Tere y Gloria han sido parte importante de mi vida, gracias por estar ahí siempre. Emma y Jorge desde la distancia estuvieron pendientes y me enviaban su apoyo incondicional, motivación y ánimos para no rendirme.

A MIS PRIMA/OS:

Cada uno, gracias, por estar cerca de mí y brindarme apoyo en el transcurso de mi carrera.

A MIS AMIGOS:

Por haber hecho de mi etapa como universitario un trayecto de experiencias, conocimientos y vivencias que nunca olvidaré, con mucho cariño.

A todas las personas que ayudaron directa e indirectamente a lo largo de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Al Msc. Ricardo Figueroa Cerna por aceptar llevar a cabo ésta investigación, por su tiempo y por cada una de sus aportaciones.

A la Biol. e Ing. Agr.: Nelly Ruth Guerrero De Menéndez por la dirección técnica-científica y el constante apoyo durante la realización del trabajo. Por sus consejos, comprensión y amistad.

A la Ing. Agr.: Claudia Isabel Morales Arévalo por su ayuda, amistad, guía, y colaboración durante la realización del trabajo.

A Blanca Sorto, Yuri Mercado, Elmer Alvarenga y Felipe Barahona por su amistad, sus aportes, conocimientos y guía en el desarrollo de la fase de laboratorio.

Al Ing. Agr.: Jaime Ernesto Ayala Morán, investigador del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA) por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados.

A las autoridades de la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez” (ENA) por haberme permitido realizar mí servicio social y posteriormente el trabajo de tesis en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología.

Al personal docente del Departamento de Biología de la Universidad de El Salvador, Facultad Multidisciplinaria de Occidente (UES-FMOcc) por haberme brindado la formación académica a lo largo de mi carrera universitaria.

Y a todas las personas que fueron amables y de alguna manera me ayudaron durante la realización de mi trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Págs.
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1. Características generales de la familia Orquidaceae	15
2.1.1. Raíces.....	15
2.1.2. Pseudobulbos	16
2.1.3. Hojas.....	16
2.1.4. Flor.....	17
2.1.5. Fruto	18
2.1.6. Semillas	18
2.2. Germinación de semillas de orquídea.....	19
2.3. Protocormos.....	20
2.4. Importancia Ecológica.....	22
2.5. Clasificación taxonómica de <i>Trichopilia tortilis</i> Lindl.....	23
2.5.1. Morfología.....	23
2.5.2. Etimología.....	24
2.5.3. Distribución General	25
2.6. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	25
2.6.1. Antecedentes del CTV en Orquídeas	26
2.6.2. Generalidades del CTV.....	27
2.6.3. Ventajas.....	28
2.6.4. Desventajas	29
2.6.5. Aplicaciones prácticas desde el punto de vista ecológico.....	29
2.6.6. Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas	30
2.7. Medios nutritivos para la propagación <i>in vitro</i>	31
2.7.1. Cultivo en medio nutritivo sólido.	32

2.7.2. Cultivo en medio líquido.....	32
2.8. Requerimientos para un medio de nutritivo.....	33
2.8.1. Agua	33
2.8.2. Componentes inorgánicos	33
2.8.3. Componentes orgánicos:	34
2.8.4. Componentes naturales:.....	34
2.8.5. Fuente de carbono:.....	34
2.8.6. Determinación de pH óptimo	34
3. METODOLOGÍA.....	35
3.1. Tipo de investigación	35
3.2. Descripción del área de estudio.....	35
3.3. Universo, población y muestra.....	35
3.4. Instrumentos y Técnicas de la investigación.....	36
3.6.1. Fase de campo.....	36
3.6.2. Fase de Laboratorio.....	37
3.5. Recolección de los datos	41
3.6. Análisis estadístico.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
4.1. Germinación de semillas.....	42
4.2. Formación de protocormos	48
4.3. Porcentaje de germinación.....	53
4.4. Desarrollo de vitroplantas	55
4.5. Contaminación	61
5. CONCLUSIONES.....	62
6. RECOMENDACIONES	63
7. REFERENCIAS.....	64
8. APENDICE	69
9. ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Prueba ANAVA para muestreo 1	43
1.1.	Prueba ANAVA para muestreo 2	45
1.2.	Prueba ANAVA para muestreo 3	46
1.3.	Prueba ANAVA para muestreo 4	46
1.4.	Prueba ANAVA para muestreo 5	46
1.5.	Prueba ANAVA para muestreo 5	47
1.6.	Prueba ANAVA para muestreo 7	47
1.7.	Prueba ANAVA para muestreo 8	47
1.8.	Prueba ANAVA para muestreo 9	48
1.9.	Prueba ANAVA para muestreo 10	48
2	Prueba ANAVA para formación de protocormos (45 días) .	51
2.1.	Prueba ANAVA para formación de protocormos (60 días) .	52
2.2.	Prueba ANAVA para formación de protocormos (75 días) .	52
2.3.	Prueba ANAVA para formación de protocormos (90 días) .	52
2.4.	Prueba ANAVA para formación de protocormos (105 días) .	53
2.5.	Prueba ANAVA para formación de protocormos (120 días) .	53
3	Prueba ANAVA para porcentaje de germinación (120 días)	54
4	Número de semillas desarrolladas (vitroplantas) . .	55
4.1.	Prueba ANAVA para el desarrollo de vitroplantas . .	57
4.2.	Prueba ANAVA para el desarrollo de vitroplantas . .	57
4.3.	Prueba ANAVA para el desarrollo de vitroplantas . .	57
5	Conteo final de repeticiones de T1 (medio líquido) . .	59
6	Conteo final de repeticiones de T2 (medio sólido) . .	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Flor de <i>Trichopilia tortilis</i> Lindl	17
2	Semillas con cubierta seminal liviana en forma de bolsa; c. 0,6-0,7 mm de largo	19
3	Formación de protocormos	21
4	<i>Trichopilia tortilis</i> Lindl	24
5	Corte y desinfección de la cápsula	36
6	Fases del establecimiento <i>in vitro</i>	37
7	Desinfección y siembra de cápsula	40
8	Numero de semillas germinadas	42
9	Desarrollo germinativo de semillas	44
10	Desarrollo de protocormos	49
11	Desarrollo de protocormos después de 45 de iniciada la etapa de establecimiento	50
12	Desarrollo de vitroplantas	55
13	Desarrollo de vitroplantas en 120 días de muestreos.	56
14	Conteo final de individuos por tratamiento	58
15	Contaminación de semillas por hongos y bacterias	61

RESUMEN

La investigación se basa en la necesidad de conocer la eficiencia de los medios nutritivos basales (sólido y líquido) para el establecimiento *in vitro* de la orquídea “Tripita” *T. tortilis* Lindl.

Se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez” (ENA), Ubicada en el Km 33 ½, carretera panamericana, cantón San Andrés, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad a 460 m s.n.m. entre los meses de marzo y noviembre de 2014.

Se utilizó un fruto inmaduro (cápsula verde) con siete meses después de la floración, desinfectada en una solución jabonosa que contenía tres gotas de Tween 20, hipoclorito de sodio al 10% y 190 ml de agua destilada. La toma de datos partió de un diseño completamente al azar, y a los resultados se les aplicó el análisis de varianza.

La germinación en general, fue muy similar en los tratamientos 1,120 semillas germinadas en medio líquido y 1,221 en medio sólido, encontrándose diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el muestreo 1 y diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en los muestreos 8 y 9.

El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el medio sólido con 91.64%. Para la formación de protocormos ambos tratamientos se comportaron estadísticamente similar, mientras tanto para el desarrollo de vitroplantas se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.01$) únicamente en muestreo 10.

En 120 días, los datos estadísticos determinaron que la eficiencia de los medios nutritivos fue muy similar; resultando ambos tratamientos eficientes para el establecimiento *in vitro* de la orquídea *Trichopilia tortilis* Lindl.

1. INTRODUCCIÓN

La propagación natural de las orquídeas se da por vía sexual (germinación de semillas) creando asociación con micorrizas que permiten su correcta adaptación al medio, de manera artesanal; la propagación mediante esquejes provee un máximo de tres a cinco nuevas plantas al año y no permite la obtención masiva, lo que dificulta la producción de orquídeas para su conservación o comercialización.

Una alternativa para la conservación de orquídeas silvestres en El Salvador, es la propagación vegetativa a través del Cultivo de Tejidos Vegetales (cultivo *in vitro*); que en condiciones controladas puede realizarse de manera rápida, eficiente y segura, produciendo grandes cantidades de plantas en corto tiempo.

En los últimos años el cultivo *in vitro* en El Salvador, ha sido considerado como una alternativa para la producción de plantas de interés comercial. Existen Instituciones como: CENTA¹, PROCAFÉ², UNICAES³, UES⁴, ENA⁵, entre otras; que se dedican a la producción e investigación mediante la propagación *in vitro*, obteniendo alta producción, pureza varietal y plantas libres de microorganismos patógenos. No obstante, dicha técnica sigue siendo poco conocida y utilizada.

Actualmente el establecimiento *in vitro* de orquídeas a partir de semillas verdes, al igual que otras técnicas de micropropagación, han sido trabajadas mayormente utilizando medios nutritivos de consistencia sólida, es decir con la adición de un agente gelificante (manteniendo estático el material vegetal). El medio nutritivo líquido a pesar de sus ventajas con relación al medio sólido, ha sido poco utilizado. A pesar de que aumenta la proliferación y desarrollo

¹ CENTA: *Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal* "Enrique Álvarez Córdova".

² PROCAFÉ: *Fundación Salvadoreña para la investigación del Café*.

³ UNICAES: *Universidad Católica de El Salvador*.

⁴ UES: *Universidad de El Salvador*.

⁵ ENA: *Escuela Nacional de Agricultura* "Roberto Quiñónez".

vegetativo. Por lo que podría considerarse como una alternativa para la reducción de los costos operativos en la micropropagación de orquídeas y otras especies de interés.

Los componentes de un medio nutritivo, contienen nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de semillas, plántulas o cualquier tejido con que se trabaje. Surge entonces la interrogante; ¿cómo se ve afectada la eficiencia de estos nutrientes según el estado físico (sólido o líquido) del medio nutritivo?

La investigación se realizó con el objetivo de determinar la eficiencia de los medios nutritivos basales: sólido y líquido, en la etapa de establecimiento *in vitro*, utilizando semillas inmaduras de la orquídea "Tripita" *Trichopilia tortilis* Lindl. a través del número de semillas germinadas, la formación de protocormos, la estimación del porcentaje de germinación y el desarrollo de vitroplantas. Concluyendo a los 120 días de sembradas las semillas, cual es el medio de nutritivo más eficiente para la etapa de establecimiento *in vitro*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Características generales de la familia Orquidaceae

“Las orquídeas tienen un aspecto herbáceo, aunque las hay en una variedad de formas; ello se debe principalmente al clima y hábitos característicos del medio natural. Es muy común encontrarlas en muy diversos medios de vida: terrestres, epífitas, rupícolas, semiterrestres y semiacuáticas” (Pacheco, 2001, p. 37).

Las orquídeas vistas como un grupo, muestran una gran variabilidad morfológica “Esas modificaciones en raíces, tallos y hojas, les permite vivir en los más diversos ambientes” (Munguía, 2007, p. 89).

2.1.1. Raíces

En las orquídeas terrestres, las raíces son estructuras alargadas y ramificantes, cubiertas de pelillos absorbentes. Están cubiertas por hifas (filamentos de los hongos asociados) que las penetran y forman dentro de las raíces unos nódulos.

Las raíces de las epífitas son aún más especializadas que las orquídeas terrestres. Muchos pelillos radicales se han sustituido por una funda de células muertas, esponjosas, que se llama “velamen”, la cual facilita la absorción de agua y minerales del aire, agua de lluvia o de la superficie de los troncos en que crece.

En las epífitas, las raíces pueden originarse en cualquier punto del tallo, en todas direcciones y no sólo hacia abajo. Su tendencia positiva a hacer contacto, les permite servir de soporte, además, estas raíces pueden fotosintetizar, la cual explica la coloración verdosa de sus puntas (Rivera, 1993, p.45).

2.1.2. Pseudobulbos

La gran mayoría de orquídeas cuenta con pseudobulbos, los cuales se mantienen abultados debido a que almacenan agua y nutrientes.

En muchas especies terrestres, los tallos subterráneos se comprimen y abultan a manera de tubérculos. En los tallos aéreos, comunes de las epífitas, también se almacenan agua y nutrientes y por eso pueden aparecer abultados. Estos pseudobulbos, pueden estar, formados por un solo entrenudo como el género *Oncidium* o por varios entrenudos como el género *Dendrobium*; pueden ser pequeños o enormes y de formas muy variadas: esféricos, ovalados, comprimidos, lisos o acostillados, etc.

Las orquídeas se dividen en dos grandes grupos, las de crecimiento "simpodial" (por ejemplo *Cattleya*, *Dendrobium*, *Laelia*, etc.), y las de crecimiento "monopodial"; que producen nuevas hojas alternadamente sobre un tronco con un meristemo común (por ejemplo *Ascocentrum*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, etc.) (Munguía, 2007, p.3).

Al igual que los tallos las hojas de las orquídeas son de gran importancia, manteniendo características propias al ambiente en el que se encuentran.

2.1.3. Hojas

En la familia Orchidaceae, las hojas siempre son simples (es decir no están divididas), sus márgenes son enteros (no tienen espinas, ni son aserrados), y por lo general son angostas y alargadas.

En muchas especies terrestres, las hojas son membranosas y delgadas propensas al ataque por insectos. En las epífitas, la regla general es la de tener hojas gruesas, con una cutícula de cierto espesor y encerada, que les permite resistir no sólo la depredación por insectos, sino también los fuertes vientos secos de los trópicos y subtrópicos (Vidalie, 1992, p. 114).

2.1.4. Flor

Las orquídeas se cultivan principalmente por la belleza y el atractivo de sus flores (ver figura 1), encontrándose gran diversidad de tamaños, colores, olores, etc., pese a esto; todas las orquídeas muestran una disposición muy similar de sus flores.

Como sucede en la mayoría de las monocotiledóneas, su flor está constituida por verticilos de tres sépalos, desprovistos de clorofila, que protegen la flor una vez que se abre; tres pétalos y una columna central que sustenta las anteras y el pistilo llamada ginostemo (Figura 1). Los dos pétalos superiores son idénticos, pero el inferior, el labelo, se ha transformado en la estructura más llamativa de la flor, con sus propios colores, formas. Las flores pueden ser aisladas o en inflorescencias laterales (Munguía, 2007, p.38).



En tanto Labollita (2000) afirma que las flores pueden surgir, dependiendo del género y la especie, de la base de la hoja, del rizoma o de algún entrenudo

del pseudobulbo. Las flores en general son hermafroditas (raramente unisexuales), en general cigomorfas (de simetría bilateral), usualmente resupinadas (es decir, las partes florales giran 180° durante el desarrollo), muchas veces conspicuas, epíginas (p.115).

A diferencia de las flores, los frutos son muy similares en la mayoría de orquídeas.

2.1.5. Fruto

Dimitri (1972), citado por Muñoz (2011), menciona “las orquídeas poseen frutos llamada cápsula, raramente baya, con placentación parietal, multiovular” (p.76). Cada fruto puede contener miles de semillas viables, de manera natural la dispersión se logra a través del viento. Pudiendo adaptarse a diferentes ambientes.

2.1.6. Semillas

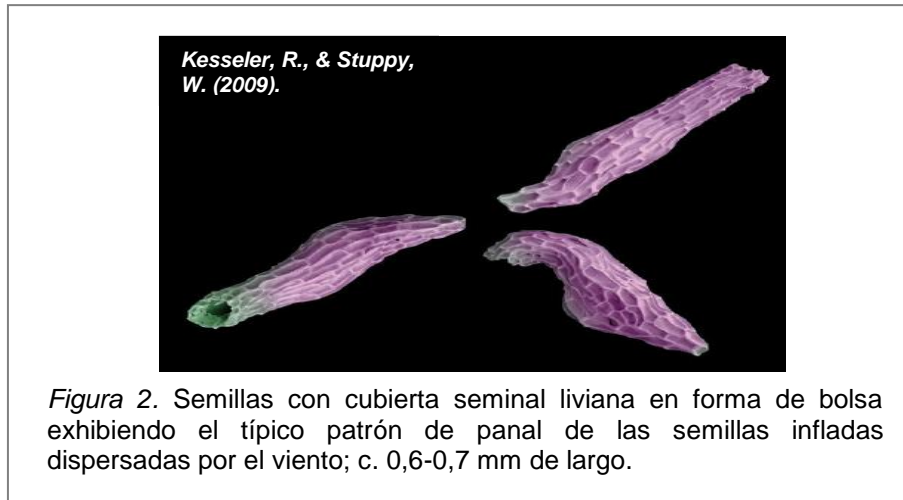
El mismo autor citado por Muñoz (2011), menciona que “las orquídeas poseen semillas con embrión generalmente no diferenciado sin tejido nutritivo” (p. 77).

Pierik (1989), señala sobre las semillas de orquídeas:

Se producen en cantidades elevadas por cápsula: 1,300 - 4, 000,000. Las semillas constan de una testa gruesa, que encierra un embrión de alrededor de 200 células. La cubierta tiene un aspecto exterior característico, en forma de red, que es diferente para cada especie (figura 2).

El embrión tiene forma redondeada o esférica. La mayor parte de las semillas de orquídeas están escasamente diferenciadas: no se distinguen cotiledones ni raíces y carecen de endospermo.

En el extremo distal del embrión existe un punto de crecimiento potencial, no identificable en el estado de semilla (p.6).



Las semillas de orquídeas contienen limitadas reservas energéticas necesarias para germinar y desarrollarse por sí solas en su ambiente natural.

2.2. Germinación de semillas de orquídea

Es necesaria la asociación simbiótica con algunos hongos, los cuales nutren por cierto tiempo a las semillas permitiéndoles desarrollarse. A pesar de esto, son pocos los estudios que profundizan la relación orquídea-hongo.

McKendrick (2000), hace referencia a las semillas:

Llamadas “semillas de polvo” porque son minúsculas y contienen pocas reservas de alimento. Usualmente no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorriza, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento.

Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo. Manteniendo las condiciones normales, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas.

En el caso de orquídeas terrestres, es de vital importancia que la relación orquídea-hongo se conserve durante los estados tempranos del ciclo de vida de la planta ya que el protocormo enterrado no puede fabricar alimento por sí mismo. Por otro lado, los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento. La relación orquídea-hongo no ha sido en su totalidad investigada.

Según Arditti (1967), la germinación de las semillas de orquídeas se puede describir de la siguiente forma:

- ✓ El embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen.
- ✓ Después se inicia la división celular, rompiendo el embrión la cubierta seminal.
- ✓ Formación de una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células, y sobre aquel se puede distinguir un meristemo del vástago.
- ✓ Luego se diferencian los órganos (meristemo del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comenzando un período de crecimiento intenso.
- ✓ Si el protocormo está expuesto a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo se desarrollan las hojas.

La relación simbiótica permite la formación de las estructuras protocórmicas, a partir de las cuales se considera que la planta es capaz de fabricar su propio alimento.

2.3. Protocormos

Es una masa celular característica de la familia Orquidaceae, constituyen la fase intermedia del desarrollo de una semilla y una planta totalmente formada.

Junta de Andalucía (2010), describe la formación de protocormos:

Durante la germinación, el embrión se hincha hasta alcanzar varias veces su volumen, forma una protuberancia por una hendidura de la testa y produce

largos pelos protocórmicos. En esta etapa el embrión es un cuerpo con forma cónica, lustrosa y casi transparente, de 0,25-0,33 mm de longitud, que porta una yema en el extremo. El polo basal, es decir, la zona opuesta a la yema, está cubierta en sus 2/3 partes de pelos protocórmicos, que en ausencia de la radícula, tienen la misión de absorber nutrientes del medio.

El término protocormo fue acuñado por el botánico francés Bérnard para designar ese estado del desarrollo de los embriones de las orquídeas. La figura 3 muestra la formación de protocormos).



El desarrollo de los protocormos en el ambiente natural es muy lento. Una semilla puede tardar varios meses en alcanzar el estado de protocormo. A partir de este punto, el desarrollo varía considerablemente de unas especies a otras, dependiendo, entre otras cosas, del modo de crecimiento adoptado por la planta adulta. En las plantas con tubérculos, durante el primer año, la yema terminal produce una única hojita verde.

Simultáneamente se forma el primer tubérculo, que quedará aislado al final del primer periodo vegetativo junto con la yema terminal. En este momento el protocormo no mide más que 2-3 mm. En el segundo año, el crecimiento

continúa a partir de la yema terminal. Esta yema produce un corto rizoma en el que aparecen las primeras raíces de la planta.

El rizoma se une al protocormo mediante una ancha base. En el extremo del rizoma la yema terminal produce 1-2 hojitas, y bajo tierra se forma un segundo tubérculo más voluminoso. Este segundo tubérculo también se separa de la planta madre al final del periodo vegetativo. Desde este momento desaparece la yema terminal y el crecimiento continúa a partir de una yema axilar. Se establece así un sistema de ramificación simpódico, y el crecimiento se sucede a lo largo de varios años.

Más allá de ver las orquídeas como un atractivo ornamental, es innumerable el papel que estas plantas juegan dentro de los diferentes nichos ecológicos.

2.4. Importancia Ecológica

Las orquídeas en general son importantes para la existencia de otras plantas y animales, así como para la circulación de nutrientes en las redes tróficas, la producción de oxígeno y la captación de dióxido de carbono.

Morales, Vanegas, Ortega, Cano, y Ramírez (2009) mencionan:

La familia de las orquídeas (Orchidaceae) es la que mayor número de especies comprende en el Reino Vegetal. Se estima que debe haber alrededor de 35,000 especies en todo el mundo pertenecientes a unos 750 géneros.

La importancia en el medio ambiente o ecosistemas para esta familia radica en la acumulación de carbono y minerales que son parte importante para la flora. También algunas orquídeas son capaces de fijar carbono en bajo niveles de luz y temperatura donde otras plantas no pueden hacerlo, además puede captar algunos nutrientes minerales en medio ambientes escasos de estos elementos.

Además, algunas orquídeas ofrecen refugio a muchos animales, que viven alrededor de sus raíces; especialmente hormigas, pequeñas serpientes, ranas, pájaros etc. Las flores de algunas especies ofrecen néctar a muchas abejas, moscas, mariposas, palomillas y colibríes, a cambio del servicio de polinización que ofrecen estos organismos.

Las raíces y otras partes de las orquídeas epífitas atrapan hojarasca y otro material orgánico (cadáveres y excremento de insectos y animales, restos de plantas viejas etc.), de allí se alimentan las enredaderas y otras epífitas. De todas estas plantas se alimentan las poblaciones de reptiles, mamíferos y pájaros alimentándose de sus hojas, flores y semillas. Así se mantiene la riqueza y diversidad de organismos que conviven en las copas de los árboles en las selvas tropicales (p 11-12).

2.5. Clasificación taxonómica de *Trichopilia tortilis* Lindl

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Género: *Trichopilia*

Especie: *Trichopilia tortilis* (Tomado de Sndb, 2010).

2.5.1. Morfología

Presentan un corto rizoma reptante con agrupaciones de pseudobulbos monofoliados, ovalados o cilíndricos. Las hojas son pseudopeciadas, coriáceas, brillantes. La inflorescencia es basal, en arco o en racimo corto, con pocas o hasta diez flores muy vistosas y fragantes, a primera vista.

La inflorescencia, basal, arqueada o colgante, sale lateralmente entre las brácteas y el pseudobulbo. Las flores, más o menos perfumadas, pueden ser de talla mediana (cerca de 5 cms) o grande (cerca de 13 cms). Los sépalos y pétalos son similares, por lo general con los lados de los sépalos algo juntos en la base, todos con márgenes ondulados o retorcidos y con formas variables.

Como lo muestra la figura 4, el labio es muy amplio, ligeramente soldado a la base de la columna, trilobulado, generalmente con el frontal redondeado y la participación de la columna que forman una especie de tubo que se extiende y se abre al lóbulo medio, se asemeja a un embudo. La columna es alargada, semicilíndrica con márgenes peludos y dos polinias (Conabio, s.f).

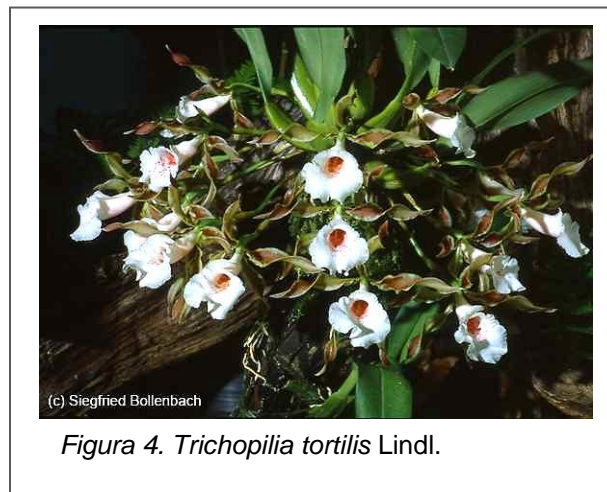


Figura 4. *Trichopilia tortilis* Lindl.

2.5.2. Etimología

“Pertenece a la sub-familia de los Epidendroidae, El nombre viene del griego *Trichos* (cabello) y *pilos* (fieltro) y hace referencia al borde ciliado de la punta de la columna, *tortilis* proviene del latín, enrollado” (Pacheco, 2001, p.34).

2.5.3. Distribución General

El género "*Trichopilia* se encuentra en El Salvador aproximadamente entre los 900 y 1200 m s.n.m. Floreciendo de marzo a junio. Además se encuentra desde México hasta América del Sur, en las pequeñas Antillas al norte hasta Bolivia y en Brasil" (Muñoz, 2011).

Se consideran diversos nombres comunes para *T. tortilis*, de los cuales los más conocidos a nivel Latinoamericano son: "Tripita", "orquídea del aire", "orquídea", "campanita" (Zárate, 2008, p. 115).

Aunque la gran mayoría de orquídeas a nivel mundial, se encuentran en las áreas tropicales, el cultivo de tejidos vegetales ha permitido su propagación masiva, haciendo posible su comercialización a través de todo el mundo.

2.6. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

Según la FAO⁶ (2014), desde hace más de 100 años, en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen.

A través de los años el CTV se ha venido utilizando en diferentes especies de orquídeas, gracias a esto, hoy en día se dispone de muchas opciones para su micropropagación; que van desde la adición de reguladores de crecimiento, compuestos orgánicos, la utilización de diferentes tejidos vegetales, etc.

⁶ FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

2.6.1. Antecedentes del CTV en Orquídeas

La propagación y cultivo de las orquídeas fue revolucionado después del descubrimiento de Knudson (1922) en donde semillas de *Cattleya* pudieron ser germinadas en un medio simple con azúcar. Este trabajo demostró que la germinación de semillas de orquídeas en condiciones *in vitro* fue posible sin la asociación con hongos (Mosqueda et al. 2010, p. 34).

Murashige y Skoog (1962), realizaron la investigación: *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*; donde experimentaron con cultivos de tejidos y células, desarrollando un medio nutritivo que contenía sales y azúcares con el que lograron crecimiento rápido en tejidos de tabaco.

En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies de orquídeas. Desde hace varios años, a nivel internacional se ha realizado un gran número de investigaciones enfocadas a estudios de embriogénesis, organogénesis, hibridación, diferenciación, fitopatología, citología, mutagénesis, producción de metabolitos secundarios, etc.

Rodríguez et al. (2003), demostraron en la investigación: *Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica in vitro de semillas de Cattleya labiata*, en el Centro de Desarrollo de la Montaña Limonar de Monte Ruz, Guantánamo, Cuba. Los resultados mostraron diferencias estadísticas favorables al empleo del medio de cultivo líquido con menor tiempo para la germinación y mayor porcentaje de la misma. Además fue significativamente superior el empleo de mayor concentración de carbón activado (2 g/l^{-1}) con respecto a la menor (1 g/l^{-1}) para las variables días y porcentaje de germinación.

Valverde (2007), trabajó en la *Producción de flores y plantas ornamentales* para el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de tres genotipos de

Dendrobium sp. Utilizando el medio MS⁷ suplementado con 4 ml/L de cisteína como antioxidante. Concluyendo: Los sistemas de micropropagación han sido implementados para cada una de ellas, logrando la formación de callos, la regeneración de estructuras tipo protocormos y el desarrollo de plántulas, utilizando el medio nutritivo MS con reguladores de crecimiento.

Recientemente Escobar et al. (2008), en la investigación: *Propagación in vitro de Oncidium stramineum Lindl*, en el Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, México. Con base en los resultados de este trabajo, para la reproducción *in vitro* de *Oncidium stramineum* se recomienda utilizar el medio de cultivo MS suplementado con 30 g/litro⁻¹ de sacarosa; 6.5 g/litro⁻¹ de agar, 100 ml.litro⁻¹ de agua de coco, 40 g·litro⁻¹ de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·litro⁻¹ de peptona y 200 mg·litro⁻¹ de polivinil pirrolidona (PVP).

El personal técnico de la Escuela Nacional de Agricultura (ENA) viene trabajando desde hace varios años en el cultivo *in vitro* de orquídeas. En 1998 con la ayuda de la Cooperación Japonesa se comenzó a trabajar con especies del género *Phalaenopsis* a través de embriogénesis somática en semillas inmaduras. Posteriormente se fueron agregando otras orquídeas de interés ornamental; *Cattleya*, *Epidendrum*, *Dendrobium* son las más representativas. Dichas orquídeas se han trabajado en la etapa de establecimiento *in vitro* con los requerimientos nutricionales basales de Murashige y Skoog.

2.6.2. Generalidades del CTV

El cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín “en vidrio”) abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en inocular un tejido con potencialidad de diferenciación

⁷ MS: Murashigue y Skoog.

bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas.

Podemos definir en cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con las cuales podemos ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos de estudio. (Esquivel y Escalante, 1994).

El CTV tiene la capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera, no se puede encontrar un fenómeno similar en animales superiores.

2.6.3. Ventajas

Roca & Mroginski (1993), mencionan las siguientes:

- ✓ Obtención masiva de nuevas plantas.
- ✓ Número grande de plantas homogéneas o iguales a la planta donante, ya que el explante es de carácter somático y su información genética es homocigota diploide ($2n$), y no sexual haploide (n).
- ✓ El tiempo de regeneración de una planta es considerablemente menor que por la vía sexual.
- ✓ Se obtiene sanidad de las plantas propagadas por este método: resultando ser una opción viable para la certificación de semillas.
- ✓ Mejoramiento genético: con fines de obtener plantas más resistentes al ataque de plagas y enfermedades, así como plantas tolerantes a sequías, salinidad, heladas y muchas más condiciones adversas que en la naturaleza están presentes e inciden en el vegetal.

2.6.4. Desventajas

- ✓ Las técnicas requieren de laboratorios especializados, con controles de contaminación muy estrictos.
- ✓ Se necesita equipo adecuado que genera altos costos de inversión. (Roca & Mroginski, 1993).
- ✓ Se necesita mano de obra especializada.
- ✓ El material químico empleado en la preparación de los medios de cultivos es costoso y poco disponibles en el mercado. (Kozai, 1991 citada por Gómez 2002).

La producción de plantas a gran escala con fines comerciales, a través del CTV (en sus diferentes técnicas de propagación), ha demostrado ser un recurso eficaz para el aprovechamiento sustentable de los recursos vegetales; evitando la pérdida de especies y manteniendo un equilibrio natural de los ecosistemas.

2.6.5. Aplicaciones prácticas desde el punto de vista ecológico.

Los ecosistemas tropicales tienen vital importancia por su riqueza y amplia biodiversidad, ya que en ellos están ubicadas la gran mayoría de especies con un potencial aún sin determinar en aspectos tales como el alimenticio, medicinal y otros. Es deber de los países que poseen esta riqueza velar por su conservación, preservación y protección; por medio de una estrategia multidisciplinaria que involucre al estado y a la sociedad; y que sea realmente eficaz en los objetivos antes propuestos.

Dicha estrategia puede contemplar el CTV desde dos puntos de vista:

1. Propagación de una especie endémica, que presente algún grado de dificultad en su propagación natural (sexual) y/o que se encuentre en peligro de extinción, como por ejemplo especies cuyas semillas son

especiales, por su tamaño y reservas alimenticias como en el caso de orquídeas en general.

2. Preservación: Creación de Bancos de Germoplasma para especies de interés biológico, comercial, cultural, etc. (Morales et al. 2009. p.11-12).

2.6.6. Cultivo *in vitro* de orquídeas

Según Mosqueda et al. (2010), la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas puede realizar a través de dos vías:

a) Co-cultivo de las semillas con diversos hongos micorrízicos para establecer una relación simbiótica. Para ello es necesario el aislamiento y cultivo del hongo en un medio específico.

b) Inoculación de las semillas en un medio de cultivo, que en ausencia de hongos simbióticos, proporciona los nutrientes requeridos para el desarrollo de la semilla (p. 12).

“Dada la importancia hortícola y comercial de las orquídeas, se han desarrollado diversos métodos de propagación, tanto sexual, a través de semillas como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos” (Ávila et al. 2006, citado por Cadavid y Salazar, 2008, p.16). Como hojas, ápices de hojas, raíz y semillas que se colocan en frascos con medio nutritivo.

McKendrick (2000), menciona que la germinación puede darse de dos maneras:

Germinación *in vitro* simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo micorriza adecuado. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo, hasta que éste produzca hojas y se vuelva autotrófico.

Esta técnica tiene la ventaja de usar un medio simple, y como resultado las plantas micorrizales suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas asimbióticamente.

La desventaja es que se necesita el tipo de hongo micorriza específico para la simbiosis y prevenir parasitismo y muerte de las semillas. Son pocas las investigaciones sobre la relación del hongo con las orquídeas tropicales.

La germinación *in vitro* asimbiótica implica el uso de un medio de cultivo más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada puesto que no se tendrá la simbiosis con el hongo (p.4).

Cualquier órgano o tejido vegetal que se utilice para la micropropagación necesita de un medio nutritivo, como fuente de energía y nutrición para el desarrollo del explante.

2.7. Medios nutritivos para la propagación *in vitro*

“Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993).

Según Thompson (1980), citado por Muñoz (2011), “el medio puede ser preparado ya sea utilizando ingredientes básicos (basal), fitorreguladores (reguladores de crecimiento); hay diferentes tipos de medios disponibles así como otros específicos para ciertas especies diseñados por expertos profesionales” (p. 66).

Un medio nutritivo basal, es una mezcla de nutrientes en concentraciones determinadas; sin la adición de fitorreguladores. Para el cultivo de tejidos

vegetales hay muchas "formulas" en el mercado y cada una tiene dosificaciones específicas, las más conocidas son las sales de Murashige y Skoog.

El medio nutritivo puede ser preparado con o sin la adición del agente gelificante, esto dependerá de los fines del cultivo; aunque a nivel internacional el medio nutritivo sólido ha sido más utilizado. A pesar, que el medio líquido brinda grandes beneficios en menor tiempo.

2.7.1. Cultivo en medio nutritivo sólido.

Son aquellos que se les ha agregado un agente gelificante (gelrite, phytigel, transfergel, ficoll, etc.). "Son ampliamente usados en el establecimiento de explantes. El explante se mantiene estático sobre el medio, con solo uno de sus extremos en contacto por donde se realiza la absorción del nutrientes" (Lorenzo et al. citado por Molina y Cabrera, 2013).

2.7.2. Cultivo en medio líquido.

George (1987), citado por Molina y Cabrera (2013), sostiene:

Son aquellos que no se les agrega ningún agente gelificante.

La utilización de este da como resultado mayores tasas de crecimiento que en sólidos, debido a la mayor superficie de contacto del explante con el medio de cultivo y a las menores gradientes de difusión entre el medio y el explante, lo que facilita la absorción de nutrientes.

Se han descrito un gran número de medios nutritivos básicos para las diferentes etapas de la micropropagación como: Heller 1953, 1954; Murashige & Skoog 1962; Gamborg 1968 y 1979; Schenk & Hildebrandt 1972; De Fossard 1976 (Krikorian 1993).

Mosqueda et al. (2010), mencionan que aunque en la fase de iniciación se utiliza preferentemente el medio sólido, el medio líquido es muy utilizado por las ventajas siguientes:

- ✓ Mejoramiento de la maduración de los embriones y como consecuencia mejoramiento de la germinación de los mismos.
- ✓ Reducción en el tiempo de germinación.
- ✓ Favorece las condiciones para la respiración y síntesis de proteínas.
- ✓ Aumento la proliferación y desarrollo vegetativo.

Independientemente del estado físico del medio nutritivo y las ventajas que estos presenten, este debe contar con elementos esenciales para la nutrición de la planta.

2.8. Requerimientos para un medio de nutritivo

Según Usui et al. (1996), un medio nutritivo debe contar con ingredientes básicos como los siguientes:

2.8.1. Agua

Los medios de cultivo de tejidos están constituidos en su mayor parte por agua: por lo tanto, es necesario utilizar agua de intercambio iónico o agua destilada, ya que el agua natural incluye algunas sustancias que pueden causar alguna influencia negativa para el crecimiento de las plantas “*in vitro*”.

2.8.2. Componentes inorgánicos

Aparte del agua, otros componentes inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si escasean estos elementos, aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento.

2.8.3. Componentes orgánicos:

Vitaminas (Tiamina, Piridoxina y B₃), Mio-inositol, Aminoácidos.

2.8.4. Componentes naturales:

Fitohormonas (citocininas, auxinas y Giberelinas).

2.8.5. Fuente de carbono:

Originalmente, las plantas pueden producir azúcar como fuente de energía a través de la fotosíntesis. Sin embargo las vitroplantas casi no realizan fotosíntesis debido a la baja intensidad de luz en la que se desarrollan, y aunque lo hagan, producirán muy poca azúcar. A causas de esto, es necesario adicionar cierta cantidad de azúcar como fuente de energía. Por lo general, esta cantidad varía entre 1 y 3% de sucrosa o glucosa que se agrega al medio de cultivo.

2.8.6. Determinación de pH optimo

La concentración del ion H⁺ produce un efecto en la absorción iónica, en los medios de cultivo. La acidez y la alcalinidad extremas inhiben el crecimiento de las vitroplantas. Por lo general, se estabiliza el pH apropiado entre 5.4 a 6.5, con HCL, y NaOH, según la especie de planta que se va a micropropagar.

3. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

La investigación es cuantitativa de tipo experimental, la cual “requirió la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles resultados. Se lleva a cabo para analizar si una o más variables independientes afectan a una o más variables dependientes y por qué lo hacen. Así también se utilizan cuando el investigador pretende establecer posibles efectos de una causa que se manipula” (Sampieri, Fernández, y Baptista, 2006, p.159).

3.2. Descripción del área de estudio

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez” (ENA), Ubicada en el Km 33 ½, carretera panamericana, cantón San Andrés, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad; cuyas coordenadas geográficas son 13° 48.5´ N; 89° 24.4´ W a 460 m s.n.m. con valores de temperatura promedio anual de 24.4 °C, humedad relativa de 77% y una precipitación pluvial anual de 2,657 mm (MARN, 2013).

3.3. Universo, población y muestra

Universo: Todas las cápsulas de la orquídea *Trichopilia tortilis* Lindl.

Población: Todas las semillas de una cápsula.

Muestra: Las semillas sembradas en cada tratamiento.

La unidad experimental: El frasco de vidrio conteniendo 30 ml de los tratamientos a experimentar, donde fueron sembradas las semillas.

3.4. Instrumentos y Técnicas de la investigación

3.6.1. Fase de campo.

El material vegetal se adquirió de colecciones particulares de una persona miembro de la ASO⁸. Se realizó la colecta de una sola cápsula verde (aproximadamente siete meses después de la floración). Algunos autores recomiendan utilizar cápsulas verdes debido a que el interior de la misma se encuentra en condición estéril; reduciendo de esta manera la proliferación de agentes patógenos (hongos-bacterias) en el establecimiento del cultivo.

La figura 5 muestra cómo se realizó la colecta de *Trichopilia tortilis* Lindl. El uso de guantes fue necesaria para evitar contacto y adición de cualquier patógeno. Con una tijera de podar desinfectada en alcohol (90%) se realizó el corte de la cápsula, para luego limpiar el exterior de la misma con algodón y alcohol; se envolvió en papel toalla y se depositó en un recipiente hermético para su transporte. La extracción y siembra de las semillas se llevó a cabo 4 días después de la colecta.



⁸ ASO: Asociación Salvadoreña de Orquideología.

3.6.2. Fase de Laboratorio: en la figura 6 se muestran las fases en las que se dividió la investigación.

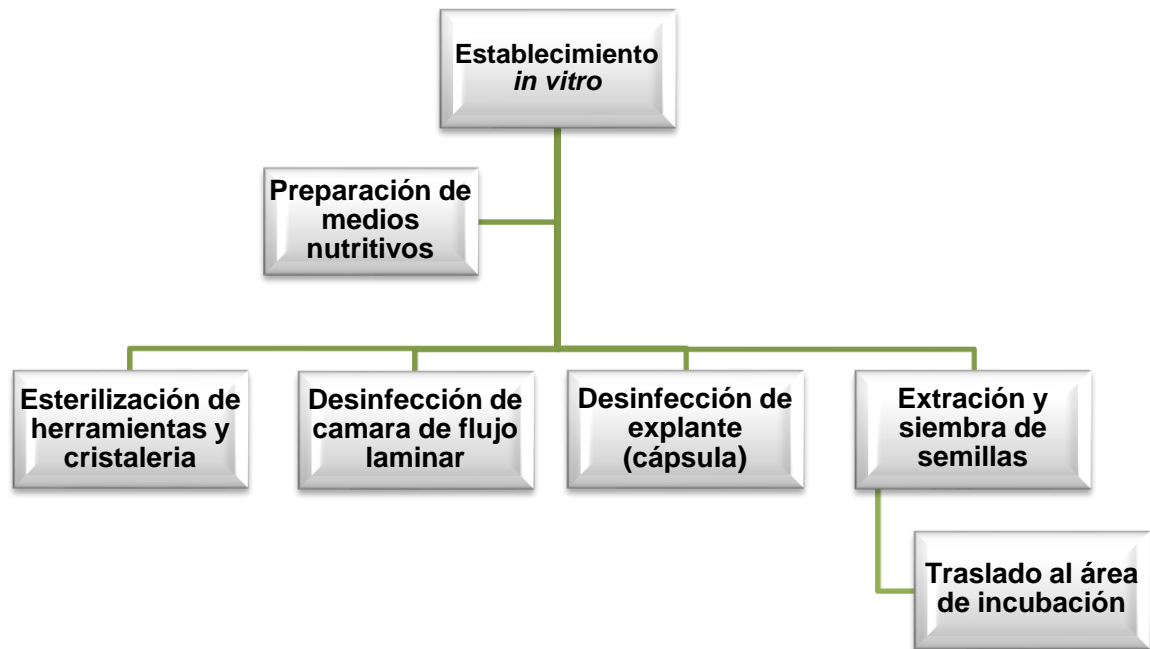


Figura 6. Fases del establecimiento *in vitro*.
Fuente: Elaboración Propia.

Fase 1. Preparación de medios nutritivos

La composición de los medios nutritivos basales utilizados en los tratamientos, tuvieron como base las sales recomendadas por Murashige y Skoog (1962), dosificadas en 20 ml/litro⁻¹ de soluciones madre uno y dos, 10 ml/litro⁻¹ de soluciones madre tres a la siete y 10 ml/litro⁻¹ de compuestos orgánicos (Dosis según ENA), además la adición de 25 g/litro⁻¹ de sacarosa y 2 g/litro⁻¹ del agente gelificante (phytagel) este únicamente al tratamiento sólido (Ver anexo 2).

Posteriormente se ajustó el pH con NaOH 0.1 N a 5.65, por último para el medio sólido, la solución caliente (98 -100°C) se dispensó 30 ml del medio en cada frasco.

De igual manera se realizó en el medio líquido, con la diferencia que a este no se le agregó agente gelificante. Por último ambos medios se esterilizaron a 121°C (15 minutos) a 20 libras de presión.

Fase 2. Esterilizaciones

Todas las herramientas y cristalería (Beaker, pinzas, cajas Petri, espátula, etc.) así como papel y agua destilada que se utilizó en la asepsia de la cápsula, se esterilizaron a 127 °C (30 minutos) a 20 20 libras de presión para su utilización dentro de la cámara de flujo laminar.

Fase 3. Desinfección de la cámara de flujo laminar

La cámara de flujo laminar se encendió aproximadamente 30 minutos antes de ser utilizada, dejando activas las lámparas de luz ultravioleta (eliminación de patógenos). Posteriormente con el uso de un rociador y papel toalla se limpió y desinfectó el área de trabajo utilizando alcohol al 70% y flameando pinzas y bisturí con alcohol 90%. Dicho procedimiento se realizó cada vez que se utilizó la cámara.

Fase 4. Desinfección del explante

En la asepsia superficial, la cápsula se lavó con agua corriente utilizando mascón y jabón líquido antibacterial, se mantuvo en agitación constante por cinco minutos en un solución jabonosa que contenía tres gotas de Tween 20(detergente y emulsionante), 10% de Hipoclorito de sodio y 190 ml de agua destilada; pasado este tiempo, la cápsula sumergida en la solución jabonosa se trasladó a la cámara de flujo laminar para la extracción de las semillas.

Fase 5. Extracción y siembra de semillas en los tratamientos (sólido y líquido)

Las condiciones del área de transferencia donde se sembraron las semillas fueron: Humedad relativa 40% y temperatura entre 23-24°C.

Previo a la extracción y siembra, toda la cristalería, herramientas y agua estéril se introdujeron a la cámara. Con el uso del bisturí y una pinza se limpiaron y cortaron cuidadosamente los extremos de la cápsula para realizar los lavados con agua estéril y eliminar residuos de la solución jabonosa.

Enseguida se transfirió la cápsula a una caja Petri (esterilizada) donde se procedió de la siguiente manera: sosteniendo la cápsula con una pinza se realizó un corte longitudinal utilizando un bisturí, tomándose cada mitad de la cápsula con las pinzas, para luego hacer un raspado de semillas (Ver figura 7C), depositándolas en un beaker que contenía 30 ml de agua estéril. Del beaker, con una jeringa descartable, se tomó una alícuota de 1 ml que se depositó en cada frasco de vidrio, para ambos medios nutritivo se adicionó la misma cantidad (1 ml) homogenizando las semillas del beaker antes de tomar cada alícuota.

Cada frasco se flameo y sello con plástico transparente (cling-film), el cual posibilito el intercambio gaseoso. Luego se rotularon con las letras iniciales de la orquídea en estudio (Tt⁹) con el número correlativo.

Las pinzas y bisturís utilizados se desinfectaron sumergiéndose en alcohol al 90%, luego de flamearlas se dejaron enfriar para su posterior uso.

⁹ Tt: *Trichopilia tortilis* Lindl



Figura 7. Desinfección y siembra de cápsula. 7A) Lavado en solución jabonosa. 7B) Disección de la cápsula. 7C). Extracción de semillas. 7D). Siembra de semillas.

Fase 6. Traslado al área de incubación

Condiciones físicas del área de incubación:

- ✓ Fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad.
- ✓ Temperatura 24-25 °C.
- ✓ Humedad Relativa entre 28-30%.
- ✓ Intensidad lumínica de 2000-3000 lux (Lumen/m²).

Los primeros 12 días de sembradas las semillas en los tratamientos, se mantuvieron en luz indirecta. Luego los frascos (medio sólido) pasaron a estantes donde se tenía influencia de luz directa. Los frascos con medio líquido, se colocaron en el agitador de matraces a 150 revoluciones por minuto, manteniendo las semillas en agitación constante durante toda la fase experimental.

3.5. Recolección de los datos

Durante cinco meses se realizaron 10 muestreos cada 15 días, evaluando el desarrollo fenológico de las semillas en los tratamientos; A través del estereomicroscopio, desde el momento de la siembra de las semillas, en ambos tratamientos, se tomaron en cuenta los siguientes cambios físicos: coloración (blanco, amarillo, y verde), imbibición (hidratación u aumento de volumen de las semillas), ruptura de la testa seminal, formación de protocormos, surgimiento de primordios foliares y radicales, así como desarrollo de vitroplantas.

Que luego se establecieron de la manera siguiente: T1 Medio nutritivo líquido en agitación constante x "Tripita" *Trichopilia tortilis* Lindl. T2 medio nutritivo sólido x "Tripita" *Trichopilia tortilis* Lindl.

3.6. Análisis estadístico.

La evaluación de ANAVA se realizó utilizando el paquete estadístico MSTAT-C, a través de un diseño completamente al azar, para determinar la existencia de diferencias significativas al ($p \leq 0.05$) y ($p \leq 0.01$) entre los tratamientos en la etapa de establecimiento *in vitro*. Estadísticamente el ANAVA determinó cuál medio nutritivo es superior al otro.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Germinación de semillas

El tiempo de evaluación fue de 120 días a partir de la siembra. Al tercer día, en ambos tratamientos (T1 y T2) se observó un cambio en la coloración de las muestras, inicialmente blancas tornándose amarillas-verde claro.

De acuerdo a la figura 8, luego de 30 días se contabilizaron 196 semillas germinadas en T1 y 209 en T2; a los 45 días en T1 se observaron 121 semillas germinadas; mientras que en T2, 101. Para el resto de muestreo, en ambos tratamientos se observó una reducción considerable en la germinación, posiblemente se debió a que la gran mayoría de semillas habían salido de la fase de imbibición y entrado a la fase de formación de protocormos.

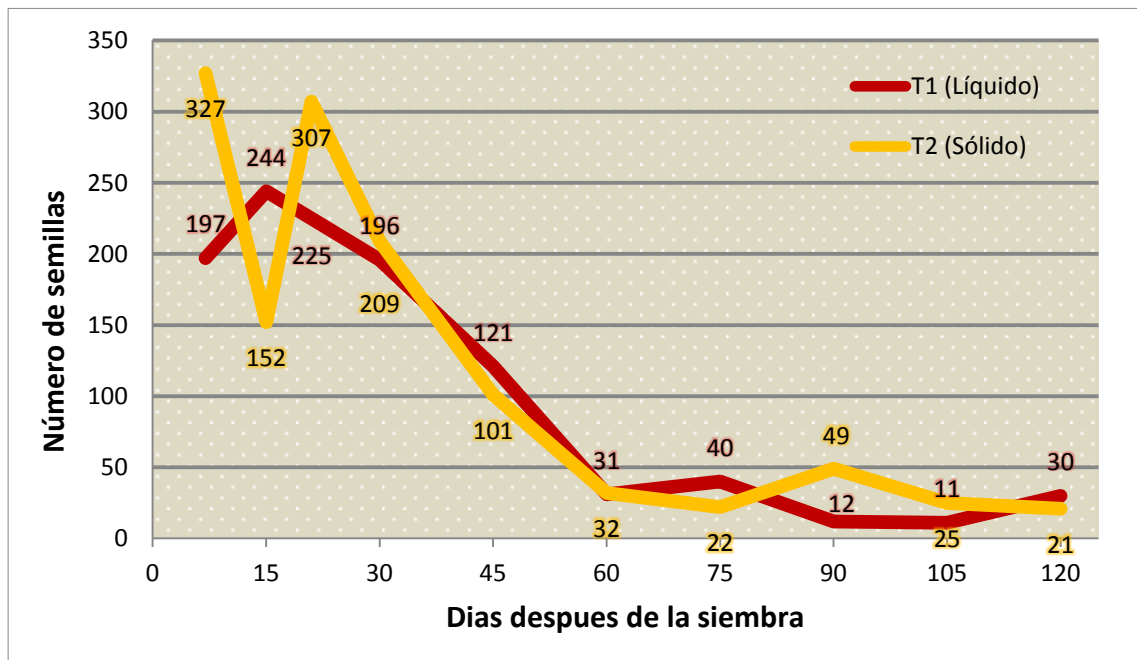


Figura 8. Número de semillas germinadas. Visualización de primeros muestreos con alto nivel germinativo y una reducción considerable en los últimos muestreos.

La sumatoria total de semillas en 120 días de evaluación, resultó para T1 con 1,120 semillas germinadas y 1,221 en T2; de manera general los números en la germinación de semillas fueron muy similares en los tratamientos. De igual manera Escobar et al. (2008), trabajó con la especie *Oncidium stramineun* Lindl; iniciando la germinación a los 4 días de sembradas las semillas, presentando un hinchamiento pronunciado y una coloración verde pálido del embrión. No así para Muñoz (2011), quien esperó 130 días para la germinación de *Cyrtorchilum macranthum* utilizando MS + carbón activado + pulpa de plátano.

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

Como lo demuestra el ANAVA, el desarrollo germinativo (figura 7) para T1 y T2 resultó con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el Muestreo 1 (tabla 1.) y diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en los muestreos 8 y 9 (tabla 1.7 y 1.8.); posiblemente esto se debe a que no todas las semillas iniciaron el proceso de imbibición de manera simultánea.

Tabla 1. Prueba ANAVA para muestreo 1.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	1	17.45	17.453	6.09	0.0486
REP	6	11.87	1.979	0.69	0.6677
Error	6	17.19	2.865		
Non-additivity	1	1.63	1.625	0.52	
Residual	5	15.56	3.113		
Total	13	46.51			

Coefficiente de variación = 24.99%

Medias para Muestreo 1

Trat	Medias
Líquido	33.714
Sólido	62.714

Para el resto de muestreos se evidenció que los tratamientos se comportaron en general de manera similar, no encontrándose diferencias significativas (ver tablas 1.1. a 1.6 y 1.9). Además en casi todos los muestreos los coeficientes de variación se mantuvo abajo del 30% demostrando certeza y credibilidad a los datos del ANAVA.

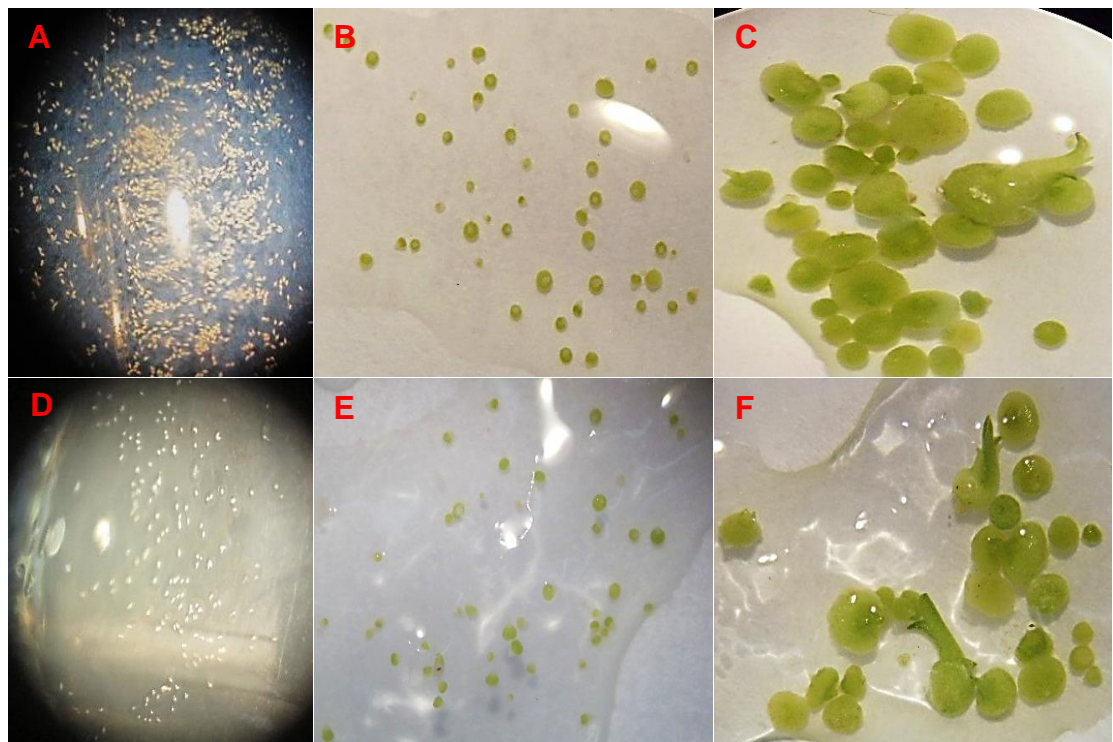


Figura 9. Desarrollo germinativo de semillas. 9A, 9B, 9C) Semillas en medio líquido. 9D, 9E, 9F) Semillas en medio sólido. 9A y 9D) 3 días, estado de imbibición. 9B y 9E) 45 días, poca presencia de semillas en imbibición. 9C y 9F) 90 días, el mayor número son protocormos e inicia la presencia de primordios foliares.

Según lo anterior, a los 120 días T1 y T2 mostraron datos estadísticos muy similares, considerando que ambos tratamientos son eficientes para la germinación de semillas. Esto es contrario para lo que describen algunos autores, debido a que el medio nutritivo en estado líquido debería brindar mayores beneficios en la propagación *in vitro* de orquídeas, acortando los tiempo para la germinación y aumentando el desarrollo vegetativo.

Por otra parte Rodríguez et al. (2003), mencionan que en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiata*; “El efecto positivo del medio de cultivo líquido en la germinación de las semillas puede estar dado, entre otros factores, por la mejor aireación, el incremento de la superficie aérea y la dilución de inhibidores”

Sin embargo, Singh (1993), citado por Rodríguez (2003), menciona que “estudios recientes demostraron la importancia que tiene el embrión al momento de realizar la siembra, teniendo que haber alcanzado un grado de diferenciación tal que le permita germinar en el menor tiempo posible”

Para la germinación de semillas de orquídea, hay diferentes factores que según algunos autores influyen directamente en el tiempo y desarrollo de las semillas; considerándose: el estado de madurez de la cápsula, la utilización de cápsulas abiertas o cerradas, el estado físico del medio nutritivo (sólido o líquido), las sales y la adición de reguladores de crecimiento al medio nutritivo, etc.

Tabla 1.1. Prueba ANAVA para muestreo 2.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	2.75	2.748	2.55	0.1616
REP	REPETIC	6	11.43	1.905	1.77	0.2535
Error		6	6.47	1.079		
	Non-additivity	1	0.63	0.631	0.54	
	Residual	5	5.84	1.168		
Total		13	20.65			

Coefficiente de variación = 16.60%

Medias para Muestreo 2

Trat	Medias
Líquido	45.571
Sólido	33.714

Tabla 1.2. Prueba ANAVA para muestreo 3.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	4.08	4.077	4.17	0.0871
REP	REPETIC	6	5.40	0.900	0.92	0.5387
Error		6	5.86	0.977		
	Non-additivity	1	0.08	0.080	0.07	
	Residual	5	5.78	1.157		
Total		13	15.34			

Coefficiente de variación = 13.62%

Medias para Muestreo 3

Trat	Medias
Líquido	44.857
Sólido	60.714

Tabla 1.3. Prueba ANAVA para muestreo 4.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.23	0.226	0.12	0.7393
REP	REPETIC	6	16.45	2.742	1.47	0.3248
Error		6	11.16	1.861		
	Non-additivity	1	0.06	0.065	0.03	
	Residual	5	11.10	2.220		
Total		13	27.84			

Coefficiente de variación = 22.12%

Medias para Muestreo 4

Trat	Medias
Líquido	37.286
Sólido	40.714

Tabla 1.4. Prueba ANAVA para muestreo 5.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.41	0.406	0.14	0.7203
REP	REPETIC	6	7.46	1.243	0.43	0.8353
Error		6	17.30	2.884		
	Non-additivity	1	1.26	1.260	0.39	
	Residual	5	16.04	3.209		
Total		13	25.17			

Coefficiente de variación = 35.42%

Medias para Muestreo 5

Trat	Medias
Líquido	25.857
Sólido	21.714

Tabla 1.5. Prueba ANAVA para muestreo 6.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.01	0.007	0.02	0.9007
REP	REPETIC	6	3.78	0.630	1.53	0.3103
Error		6	2.48	0.413		
	Non-additivity	1	0.01	0.011	0.02	
	Residual	5	2.46	0.493		
Total		13	6.26			

Coefficiente de variación = 28.58%

Medias para Muestreo 6

Trat	Medias
Líquido	4.429
Sólido	4.571

Tabla 1.6. Prueba ANAVA para muestreo 7.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.96	0.959	2.70	0.1517
REP	REPETIC	6	0.88	0.146	0.41	0.8487
Error		6	2.14	0.356		
	Non-additivity	1	0.54	0.539	1.69	0.2506
	Residual	5	1.60	0.319		
Total		13	3.97			

Coefficiente de variación = 26.30%

Medias para Muestreo 7

Trat	Medias
Líquido	5.714
Sólido	3.143

Tabla 1.7. Prueba ANAVA para muestreo 8.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	5.64	5.643	22.51	0.0032
REP	REPETIC	6	1.90	0.317	1.26	0.3920
Error		6	1.50	0.251		
	Non-additivity	1	0.10	0.101	0.36	
	Residual	5	1.40	0.281		
Total		13	9.05			

Coefficiente de variación = 22.90%

Medias para Muestreo 8

Trat	Medias
Líquido	1.714
Sólido	7.143

Tabla 1.8. Prueba ANAVA para muestreo 9.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	5.67	5.665	17.85	0.0055
REP	REPETIC	6	0.55	0.092	0.29	0.9209
Error		6	1.90	0.317		
	Non-additivity	1	0.00	0.002	0.01	
	Residual	5	1.90	0.380		
Total		13	8.12			

Coefficiente de variación = 25.78%

Medias para Muestreo 9

Trat	Medias
Líquido	1.571
Sólido	7.143

Tabla 1.9. Prueba ANAVA para muestreo 10.

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	5.79	5.786	0.65	0.4521
REP	REPETIC	6	31.71	5.286	0.59	0.7310
Error		6	53.71	8.952		
	Non-additivity	1	3.62	3.620	0.36	
	Residual	5	50.09	10.019		
Total		13	91.21			

Coefficiente de variación = 8.13%

Medias para Muestreo 10

Trat	Medias
Líquido	4.286
Sólido	3.000

4.2. Formación de protocormos

Los primeros días se formaron estructuras celulares color verde claro, volviéndose tenue después de 30 días, se podían diferenciar estructuras diminutas llamadas rizoides (figura 11C). Además se observó en el ápice el apareamiento de un diminuto primordio foliar de color verde oscuro (figura 11F); el protocormo continuó su desarrollo incrementando su volumen, desarrollándose por completo a los 45 días; el surgimiento de las primeras hojas se hizo evidente a los 75 días (ver figura 11L).

La formación de protocormos se comenzó a evidenciar a los 45 días (ver figura 10), en T1 hubieron 18 protocormos, mientras que en T2 se obtuvieron 24. A los 75 días, 158 en T1; mientras que para T2 196. En T2 se observó que algunos protocormos mostraban surgimiento y elongación de la primera hoja; no así en T1 donde este proceso se inició a los 90 días. El mayor número de protocormos para T1 se obtuvo a los 90 días con 183, mientras que para T2 la se logró a los 105 días con 256 protocormos.

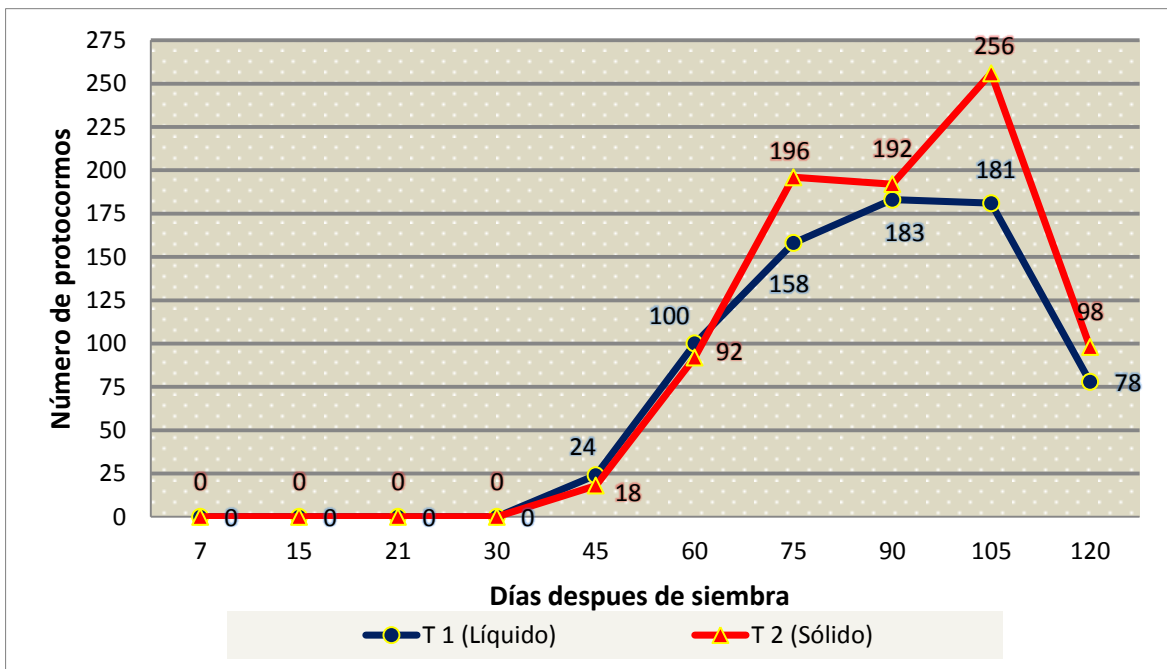


Figura 10: Desarrollo de protocormos de manera relativamente homogénea. La disminución en el número de protocormos a los 120 días, evidencia que los mismo han comenzado la emergencia de primordios foliares v radicales.

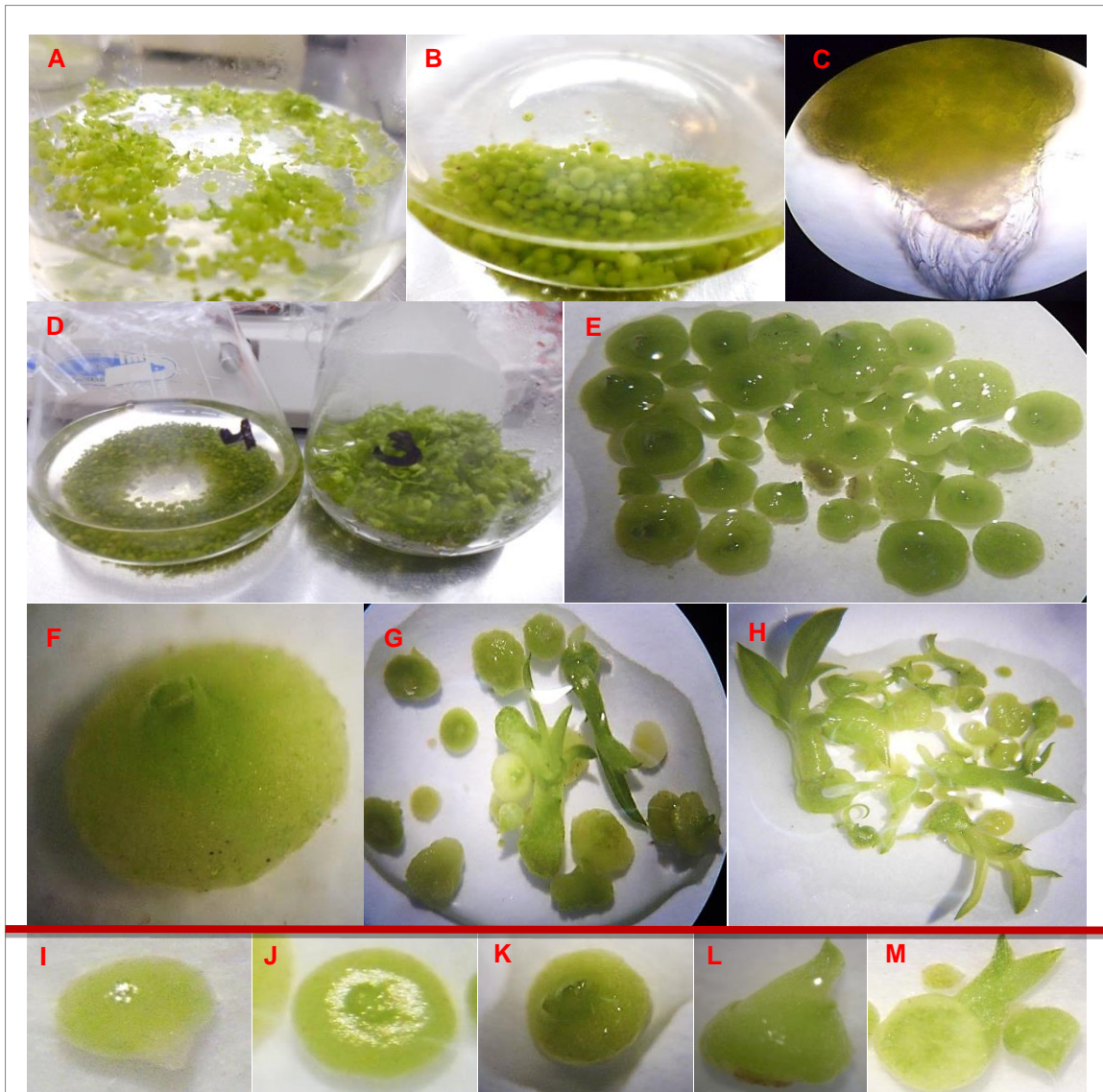


Figura 11. Desarrollo de protocormos después de 45 de iniciada la etapa de establecimiento. A y B) 90 días en sus respectivos tratamientos. C) 75 días, protocormo totalmente definido con presencia de rizoides (visto a 100x). D, E y F) Protocormos formados, inició una disminución considerable de protocormos, emergencia y elongación de hojas. G y H). 120 días, aparición de hojas desarrolladas y raíces, número muy reducido de semillas en imbibición y protocormos. I, J, K, L, M) desarrollo desde imbibición, protocormos, emergencia y desarrollo de hoja.

A los 120 días, la formación de protocormos se vio reducida considerablemente; para T1 se encontraron 78 protocormos, mientras que para T2, 98. Posiblemente esto sucedió debido a que muchos protocormos comenzaban a desarrollar vitroplantas.

De manera general la sumatoria de protocormos formados en todos los muestreos para T1 resultó de 724 y para T2 de 852. Por tanto numéricamente se encontró una diferencia de 128 protocormos en los tratamientos.

De acuerdo a Pineda (2008), quien trabajó en la multiplicación *in vitro* de la orquídea *Ckuitlauzina pendula* Lex, logró la formación de cuerpos protocórmicos a los 60 días; utilizando medio basado en las sales de Murashige y Skoog sin reguladores de crecimiento.

Estadísticamente para la formación de protocormos no se encontraron diferencias en los tratamientos, brindando números aceptables para la variable en cuestión (ver tabla 2. a 2.5). La razón de esta similitud podría deberse a que todas las semillas de *T. tortilis* Lindl tienen la misma capacidad de absorber nutrientes no importando el estado físico del medio nutritivo.

Tabla 2. Prueba ANAVA para formación de protocormos (45 días)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.03	0.025	0.05	0.8225
REP	REPETIC	6	5.96	0.993	2.14	0.1879
Error		6	2.78	0.463		
	Non-additivity	1	0.61	0.608	1.40	0.2900
	Residual	5	2.17	0.434		
Total		13	8.76			

Coficiente de variación = 37.06%

Medias

Trat	Medias
Líquido	1.879
Sólido	1.794

Tabla 2.1. Prueba ANAVA para formación de protocormos (60 días)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.13	0.135	0.05	0.8268
REP	REPETIC	6	25.21	4.202	1.63	0.2847
Error		6	15.50	2.584		
	Non-additivity	1	3.02	3.017	1.21	0.3218
	Residual	5	12.48	2.497		
Total		13	40.85			

Coefficiente de variación = 46.80%

Medias

Trat	Medias
Líquido	3.336
Sólido	3.533

Tabla 2.2. Prueba ANAVA para formación de protocormos (75 días)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.50	0.499	0.19	0.6804
REP	REPETIC	6	10.21	1.702	0.64	0.6999
Error		6	15.98	2.664		
	Non-additivity	1	3.47	3.469	1.39	0.2920
	Residual	5	12.51	2.503		
Total		13	26.70			

Coefficiente de variación = 33.06%

Medias

Trat	Medias
Líquido	4.749
Sólido	5.126

Tabla 2.3. Prueba ANAVA para formación de protocormos (90 días)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.01	0.005	0.00	0.9529
REP	REPETIC	6	10.70	1.783	1.28	0.3869
Error		6	8.37	1.396		
	Non-additivity	1	1.54	1.543	1.13	0.3365
	Residual	5	6.83	1.366		
Total		13	19.08			

Coefficiente de variación = 22.38%

Medias

Trat	Medias
Líquido	5.297
Sólido	5.258

Tabla 2.4. Prueba ANAVA para formación de protocormos (105 días)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	2.06	2.061	1.28	0.3006
REP	REPETIC	6	8.01	1.335	0.83	0.5863
Error		6	9.64	1.607		
	Non-additivity	1	0.68	0.684	0.38	
	Residual	5	8.96	1.792		
Total		13	19.71			

Coeficiente de variación = 22.58%

Medias

Trat	Medias
Líquido	5.231
Sólido	5.998

Tabla 2.5. Prueba ANAVA para formación de protocormos (120 días)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	28.57	28.571	0.31	0.5992
REP	REPETIC	6	135.43	22.571	0.24	0.9455
Error		6	557.43	92.905		
	Non-additivity	1	47.77	47.765	0.47	
	Residual	5	509.66	101.933		
Total		13	721.43			

Coeficiente de variación = 7.67%

Medias

Trat	Medias
Líquido	11.143
Sólido	14.000

4.3. Porcentaje de germinación

A los 120 días, el ANAVA demostró en los tratamientos diferencias altamente significativas al $p \leq 0.01$ (ver tabla 3), el valor del coeficiente de variación se encontró de 4.83%, brindando certeza y credibilidad al ANAVA.

Según lo anterior T2 fue más eficiencia en la germinación de semillas de *T. Tortilis* Lindl con un 91.641%, contrario a T1 con 78.944%.

Tabla 3. Prueba ANAVA para porcentaje de germinación (120 días)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	564.26	564.261	33.22	0.0012
REP	REPETIC	6	243.54	40.589	2.39	0.1565
Error		6	101.91	16.985		
	Non-additivity	1	23.63	23.634	1.51	0.2739
	Residual	5	78.27	15.655		
Total		13	909.70			

Coeficiente de variación = 4.83%

Medias

Trat	Medias
Líquido	78.944
Sólido	91.641

Se han obtenido resultados aceptables para la germinación de *T. tortilis* Lindl, contrario a lo que menciona Mosqueda et al. (2010), Las semillas sembradas a partir de cápsulas que no han madurado lo suficiente podrían germinar lentamente o simplemente no germinar; Ellos obtuvieron promedios de germinación de semillas maduras en 70 a 90% empleando los medios VW (Vacin y Went, 1949), MS (Murashigue y Skoog, 1962), y MS a la mitad de su concentración, adicionando 0.1% de carbón activado a todos los medios.

Roura (2010), utilizó medio líquido para la germinación de *Oncidium stenotis*, obteniendo altos porcentajes de germinación, en los tratamientos del medio sólido se observó que cuando no hay interacciones entre los reguladores de crecimiento, ANA (Ácido Naftanel Acético), BAP (Bencil Amino Purina) y AIA (Ácido Indol Acético), se favorece la germinación entre un 83,33% a un 100% aproximadamente. La mayoría de las interacciones de estos reguladores a distintas concentraciones presentan bajos porcentajes de germinación.

Con lo antes mencionado y los resultados obtenidos en esta investigación, se comprueba que no hay una relación directa de estos reguladores de crecimiento con la germinación de semillas de orquídeas.

4.4. Desarrollo de vitroplantas

Según la tabla 4 a partir del muestreo 7, en T2 se comenzó a observar que algunos protocormos mostraban la emergencia de primordios foliares (figura 12A). Ambos tratamientos a los 90 días presentaban completo desarrollo del área foliar (figura 12B), encontrándose para T1 24 vitroplantas y para T2 27.

Posteriormente, en el muestreo 9 (105 días), los protocormos en T1 habían alcanzado mayor desarrollo que en T2, con 240 vitroplantas y 72 respectivamente (figura 13). Al término de la fase experimental, se logró observar en ambos tratamientos gran cantidad de vitroplantas totalmente desarrolladas con presencia de hojas y raíces (ver figura 12C y D).

Tabla 4. Número de semillas desarrolladas (vitroplantas).

Trat.	Rep.	Muestras									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9 [†]	10
T1 (Especie/Líquido)	7	0	0	0	0	0	0	0	24	240	154
T2 (Especie/sólido)	7	0	0	0	0	0	0	3	27	72	283

Nota: Trat. = Tratamientos. [†] = Contaminación de repetición.

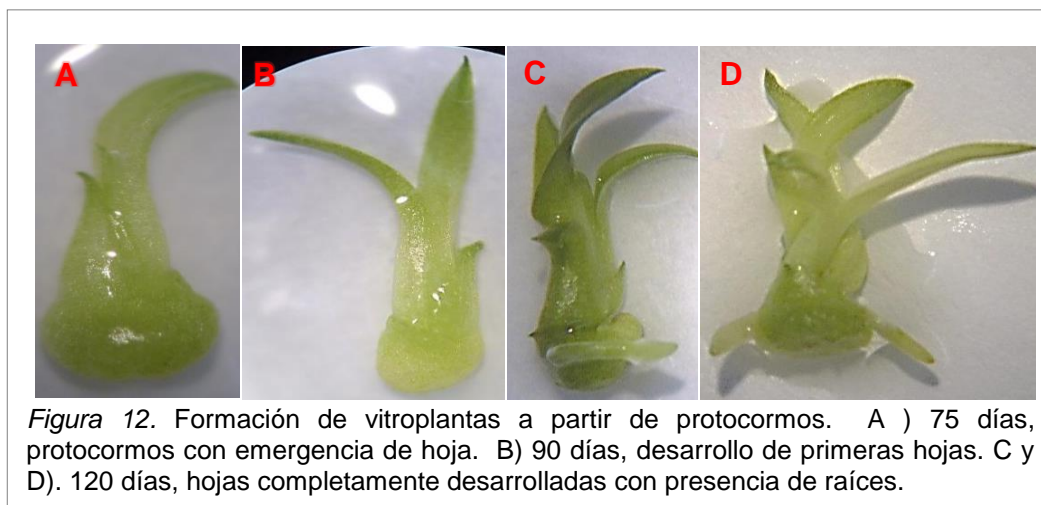


Figura 12. Formación de vitroplantas a partir de protocormos. A) 75 días, protocormos con emergencia de hoja. B) 90 días, desarrollo de primeras hojas. C y D). 120 días, hojas completamente desarrolladas con presencia de raíces.

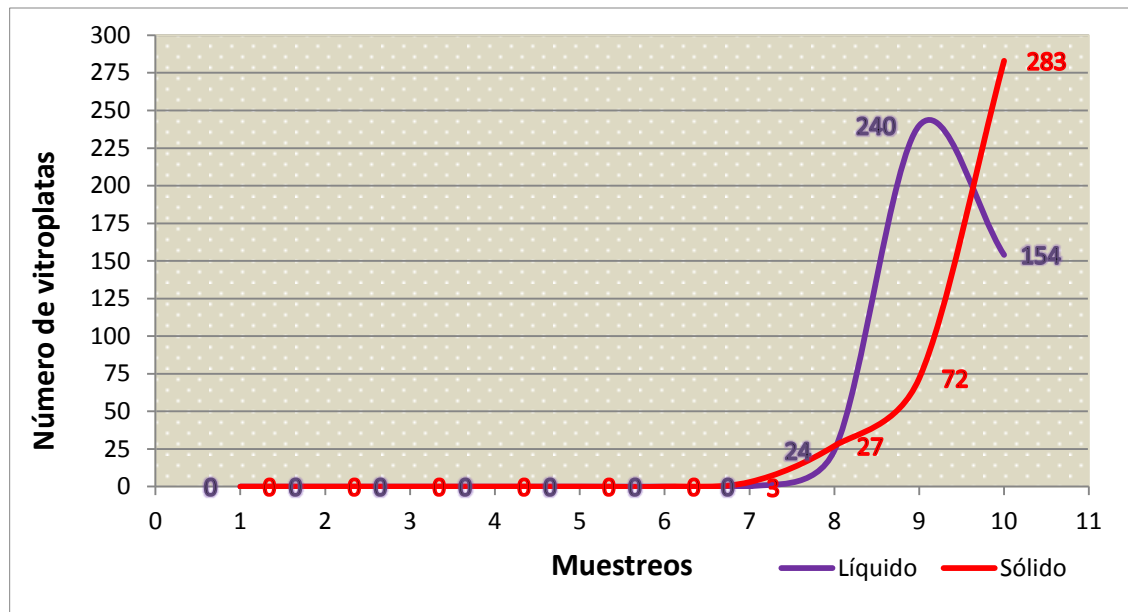


Figura 13: Desarrollo de vitroplantas en 120 días de muestreos.

El número total de vitroplantas para ambos tratamientos demostró una leve mayoría en T1, con 418 semillas con respecto a 385 en T2. A los 120 días aún se observaron semillas en imbibición y formación de protocormos, esto posiblemente sucedió debido a que no todas las semillas reaccionaron a los tratamientos al mismo tiempo.

Lo et al. (2004b) citado por Salazar y Cadavid (2008), evaluaron el medio MS (1962) completo para la inducción de germinación de la semilla de *Dendrobium tosaense*, encontrando la aparición de estructuras protocórmicas verdes y blancas a los 84 días después de realizada la siembra y desarrollo de vitroplantas a los 112 días.

Según los datos estadísticos, en los muestreos 8 y 9 no se encontraron diferencias entre los tratamientos (Ver tabla 4.1 y 4.2). Únicamente para el muestreo 10 se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.01$) en los tratamientos (tabla 4.3). En términos generales los tratamientos se comportaron de manera similar, obteniéndose números aceptables para el desarrollo de vitroplantas.

Tabla 4.1. Prueba ANAVA para el desarrollo de vitroplantas (muestreo 8)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	0.04	0.042	0.17	0.6928
REP	REPETIC	6	5.00	0.833	3.40	0.0812
Error		6	1.47	0.245		
	Non-additivity	1	0.00	0.001	0.00	
	Residual	5	1.47	0.294		
Total		13	6.51			

Coefficiente de variación = 24.23%

Medias

Trat	Medias
Líquido	1.989
Sólido	2.099

Tabla 4.2. Prueba ANAVA para el desarrollo de vitroplantas (muestreo 9)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	5.41	5.413	3.74	0.1013
REP	REPETIC	6	0.47	0.079	0.05	0.9987
Error		6	8.68	1.447		
	Non-additivity	1	3.44	3.436	3.27	0.1301
	Residual	5	5.25	1.049		
Total		13	14.57			

Coefficiente de variación = 46.07%

Medias

Trat	Medias
Líquido	1.989
Sólido	46.07%

Tabla 4.3. Prueba ANAVA para el desarrollo de vitroplantas (muestreo 10)

Fuente de Variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor-F	Prob
TRAT	TRATAMI	1	1188.64	1188.643	21.56	0.0035
REP	REPETIC	6	1382.86	230.476	4.18	0.0527
Error		6	330.86	55.143		
	Non-additivity	1	0.52	0.522	0.01	
	Residual	5	330.34	66.067		
Total		13	2902.36			

Coefficiente de variación = 23.79%

Medias

Trat	Medias
Líquido	22.000
Sólido	40.429

Cumplidos los 120 días de evaluación, se contabilizaron las semillas que se encontraban en sus diferentes estadios de desarrollo (figura 14), con la finalidad de conocer la cantidad que se habían sembrado en cada tratamiento; además observar la viabilidad y respuesta a los tratamientos.

Como se observa en la tabla 6, los resultados finales para el T1 mostraron un aproximado de 7,146 entre semillas en imbibición, protocormos, vitroplantas; de las cuales 625 resultaron semillas no viables y muertas. Brevedan et al. (2010), consideran que semilla viable es aquella que tiene su embrión sano y potencial capacidad germinativa.

Además en tres repeticiones se encontró presencia de contaminación (hongo-bacteria), descartándose inmediatamente del ensayo. Como dato final 6,521 continuaran el proceso de micropropagación, luego de haber salido de la etapa evaluada (establecimiento).



Tabla 5. Cuento final de repeticiones del T1 (medio líquido).

Rep.	Imbibición	Protocormos	Vitro plantas	Semillas muertas	Semillas no germinadas
1	89	377	411	55	29
2	33	131	455	23	17
3	52	321	429	33	23
4	180	338	47	63	17
5	133	245	369	38	21
6	21	61	122	12	17
7	62	315	137	43	63
8	14	445	111	9	12
9	180	338	47	63	17
10	95	382	15	7	16
11	11	78	22	9	3
12	13	85	354	29	6
+	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-
Sub totales	883	3,116	2,519	384	241
TOTAL	7,146				

Nota: Los números totales reflejan la cantidad de semillas encontradas en cada repetición después de los 10 muestreos (120 días). Trat.= Tratamiento. Rep. = repeticiones. † = contaminación.

Los resultados finales para el medio sólido mostraron un aproximado de 8,266 entre semillas en imbibición, protocormos, vitroplantas; de las cuales 864 resultaron semillas no viables y muertas. Además en cuatro repeticiones se encontró presencia de contaminación (hongo-bacteria), descartándose inmediatamente del ensayo. Obteniéndose un número final 7,402.

Tabla 6. Conteo final de repeticiones del T2 (medio sólido).

Rep.	Imbibición	Protocormos	Vitro plantas	Semillas muertas	Semillas no germinadas
1	45	128	310	62	17
2	127	267	463	74	66
3	23	128	118	13	7
4	202	649	132	39	27
5	79	194	55	15	79
6	62	101	9	53	43
7	31	311	172	16	77
8	46	147	289	22	56
9	21	65	133	19	43
10	19	107	228	65	23
11	86	55	112	31	17
+	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-
Sub totales	741	2,152	2,021	409	455
TOTAL	5,778				

Nota: Los números totales reflejan la cantidad de semillas encontradas en cada repetición después de los 10 muestreos (120 días). Trat.= Tratamiento. Rep. = repeticiones. † = contaminación.

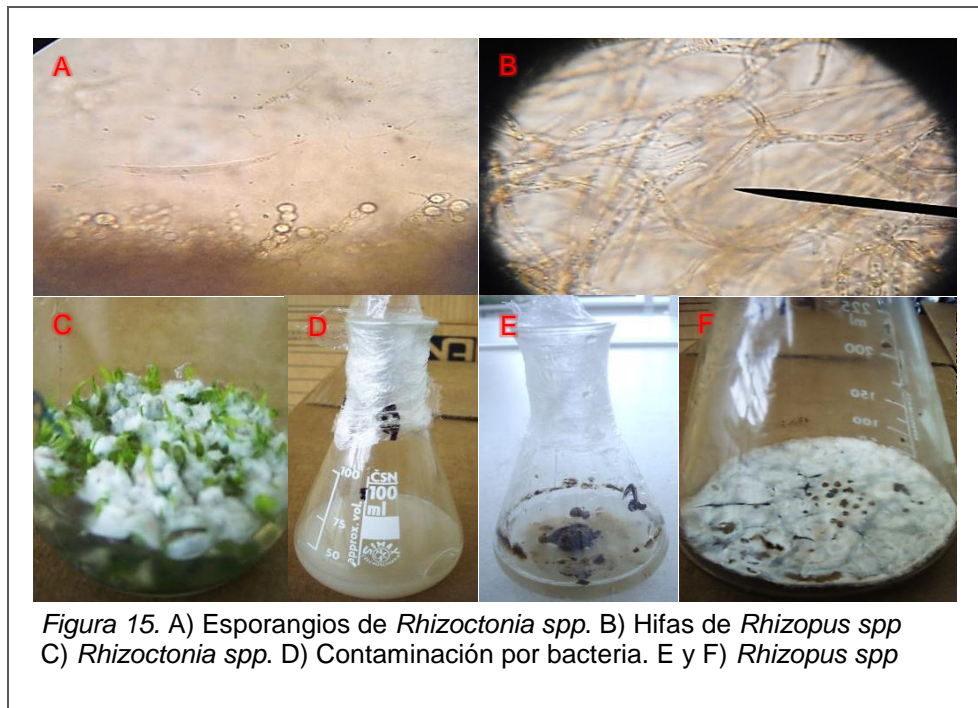
En 120 días en ambos tratamientos se obtuvieron alrededor de 13,000 individuos, según la prueba ANAVA ambos tratamientos son eficientes para la etapa de establecimiento *in vitro* de la orquídea “Tripita” *T. tortilis* Lindl.

Los resultados en este estudio permiten, demostrar que el establecimiento *in vitro* de semillas provenientes de una capsula verde, es viable para la micropropagación masiva de la orquídea “Tripita” *T. tortilis* Lindl. Como también lo es la utilización de las sales Murashigue y Skoog, ya sea en medio nutritivo sólido como líquido.

4.5. Contaminación

En todos los muestreos no se observó oxidación fenólica y los niveles de contaminación (hongo-bacteria) se mantuvieron constantemente bajos, en el T1 se contaminaron 3 frascos, mientras que para el T2 fueron 4 frascos. Posiblemente la contaminación se produjo manipulación mecánica. Smith (2000) citado por Castañeda (2008), escribió: La contaminación *in vitro* ocurre por diversos factores tales como: el explante que se emplea, la manipulación del mismo por parte de la persona, el medio nutritivo, insectos, condiciones de trabajo dentro de la cámara de flujo laminar y por las condiciones de incubación.

La figura 15 muestra la contaminación por hongos (*Rhizoctonia spp* y *Rhizopus spp*), y por bacterias.



5. CONCLUSIONES

- ✓ La germinación de la orquídea *T. tortilis* Lindl se efectuó con éxito en ambos tratamientos utilizando las sales de Murashige y Skoog.
- ✓ De acuerdo al análisis estadístico el comportamiento del medio líquido y sólido en la formación de protocormos, fue muy semejante.
- ✓ El porcentaje de germinación fue mayor en el medio sólido que en el medio líquido.
- ✓ Estadísticamente el desarrollo de las vitroplantas fue muy similar en ambos tratamientos.
- ✓ Los niveles de contaminación (hongo-bacteria) en ambos tratamientos fueron bajos, posiblemente a la cuidadosa desinfección superficial de la cápsula y del instrumental utilizado en toda la etapa de establecimiento.
- ✓ En términos generales la eficiencia de los medios nutritivos en la etapa de establecimiento *in vitro*, basándonos en los datos estadísticos fue muy similar. Pero numéricamente (cantidad) el medio nutritivo líquido fue superior al medio nutritivo sólido.

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Utilizar las sales de Murashige y Skoog, en medio nutritivo líquido o sólida para la micropropagación masiva de semillas de orquídeas.
- ✓ Investigar con diferentes especies de orquídeas, la eficiencia de medios nutritivos basales sólidos y líquidos para la formación de protocormos y desarrollo de vitroplantas.
- ✓ Utilizar la técnica de asepsia realizada en la investigación, debido a que mantuvo la contaminación en niveles que no interfirió en la toma de datos.
- ✓ Utilizar medios nutritivos orgánicos de consistencia líquida y sólida en orquídeas, para la etapa de establecimiento *in vitro*.
- ✓ Utilizar las diferentes técnicas del cultivo de tejidos vegetales como herramienta biotecnológica para propagación de orquídeas que se encuentren en peligro de extinción en nuestro país.

7. REFERENCIAS

- Arditti, J. (1967). *Factors affecting the germination of orchid seeds*. Bot. Rev. Vol. 33 (1). Recuperado de https://www.academia.edu/890112/Factors_affecting_the_germination_of_orchid_seeds
- Ávila, I., Salgado, R. (2006). *Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas Mexicanas, para colaborar en su conservación*. Biológicas. Vol 8.
- Brevedan, R., Curvetto, N., Baioni, S., Fioretti, M., Moroni, I.F, y Bongiovanni, M. (2010). *Guía de trabajos prácticos de fisiología vegetal*. Departamento de Agronomía Universidad Nacional del Sur Bahía Blanca. Argentina.
- Castañeda, Z.M. (2008). *Propagación y conservación del lirio de todos los santos Laelia anceps Lindl. Subsp. Anceps f. semialba (Orquidaceae) a través del cultivo de tejidos*. (Tesis inédita de Licenciatura en Biología) Universidad Veracruzana, México.
- Conabio. (s.f). *Genero Trichopilia*. Recuperado de <http://conabio.inaturalist.org/taxa/140299-Trichopilia>.
- Escobar, F.G., Solano, J.P., Vásquez, G., & Colinas, M.T. (2008). *Propagación in vitro de Oncidium stramineum Lindl*. Chapingo, México.
- Esquivel, A.A. y Escalante, J.V. (1994). *Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

- FAO. (2014). *Cultivo de Tejidos Vegetales: Principios Básico, Metodologías Y Técnicas*. Recuperada de <http://teca.fao.org/es/read/4290>.
- Gómez, M.M. (2002). *Biotecnología aplicada a mejora de Pelargonium*. (Tesis inédita Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España. Recuperado de versión en PDF.
- Infojardin. 2013. IV Foro orquidiadictos en la Republica Dominicana. Recuperado de <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?p=7839039>.
- Junta de Andalucía. (2010). Recuperado de http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural._Uso_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpa/orquideas_grazalema/03_orquideas.pdf
- Kessler, R., & Stuppy, W. (2009). *Semillas la vida en cápsulas de tiempo*. Winterbourne, Berkshire, GB. Recuperado de www.clh.es/docs/semillas_web_bueno.pdf
- Labollita, E. (2000). *Orquídeas para principiantes*. Buenos Aires, Argentina: Atlántida S.A de C.V.
- MARN. (2013). *Dirección General del Observatorio Ambiental, Gerencia de Meteorología. Anuario Climatológico San Andrés*. La Libertad, El Salvador.
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la Germinación in vitro de Orquídeas*. Colombia: Ceiba Foundation for Tropical Conservation.

- Molina, J.X., y Cabrera, J.J. (2013). *Evaluación de dos métodos de Micropropagación masal en piña (ananas comosus L. Merr.) Variedad Golden*. (Tesis inédita de Ingeniería agronómica). Universidad de El Salvador, San salvador, El Salvador.
- Morales, G.I., Vanegas, L.E., Ortega, D.G., Cano, J.A., & Ramírez, L.A. (2009). *Propagación In vitro de Orquídeas*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia Especialización en Biotecnología Agraria, Bogotá, Colombia.
- Mosqueda, A.M., Camero, J.G., Lázaro, E.C., & Hernández, A.F. (2010). *Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Munguía, J. (2007). *Producción de orquídeas, gardenia, anturio y ave del paraíso*. Universidad Veracruzana, México.
- Muñoz, M.I. (2011). *Evaluación de medios de cultivo para la germinación “in vitro” de las orquídeas cyrtochilum macranthum y epidendrum jameisonic rchb.f.* (Tesis inédita de ingeniería agronómica). Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ingeniería Agronómica, Ecuador.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*. *Physiol , Plant.* v. 15, p. 437-97.
- Pacheco, R.A. (2001). *Cultivo de tejidos vegetales aplicable a la conservación de orquídeas*: Bogotá, Colombia.

- Pierik R.L.M. (1989). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Recuperado de [www.lamolina.edu.pe/facultad/agronomia/horticultura1/pro-pagacion/biotecnología/ cuya.doc](http://www.lamolina.edu.pe/facultad/agronomia/horticultura1/pro-pagacion/biotecnologia/cuya.doc).
- Pineda, U. (2008). *Multipliación in vitro de la orquídea Cuitlauzina pendula Lex.* (Tesis inédita de ingeniería agronómica). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/5533/1/M.pdf>
- Ramsay, B.J. (2007). *Trichopilia tortilis*. Smithsonian, Washington DC. Recuperado de <http://www.pbase.com/image/85787928>.
- Rivera, G.R. (1993). *Orquídeas Generalidades y Cultivo*. Costa Rica.
- Roca, W. & Mroginski, L. A. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura*. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali.
- Rodríguez, L., González, R., Díaz, A., Fajardo, E., Sánchez, E., & Hernández, J. (...) González, J. (2003). *Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica in vitro de semillas de Cattleya labiata*. Biotecnología vegetal Vol. 3. Centro de Desarrollo de la Montaña Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo, Cuba.
- Salazar, S.A., Cadavid, I.C. (2008). *Micropropagación de Cattleya quadricolor*. (Tesis inédita de ingeniería agronómica). Universidad Eafit, Medellín, Colombia.
- Sampieri, R., Fernández, C., y Baptista, L. (2006). *Metodología de la investigación*. 4ª, ed. Mc Graw Hill, México.

- SNDB. (2010). *Catálogo de la Vida*, Catalogue of Life. recuperado de <http://datos.sndb.mincyt.gob.ar/portal/datasets/resource/80> .
- Usui, K., Okabe, K., Victores, R., & Ramírez, A.E. (1996), *Principios Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Guatemala.
- Vidalie, H. (1992). *Producción de flores y plantas ornamentales*. Ed. Mundi-presa. España.
- Valverde, V.S. (2007). *Establecimiento in vitro de explantes foliares de tres genotipos de Dendrobium sp.* Zamorano, Honduras.
- Zárate, M.C. (2008). *Propagación y conservación de Lirio de Todos Santos Laelia anceps Lindl. Subsp. Anceps f. semialba (Orquidaceae)* a través del cultivo de tejidos. (Tesis inédita de licenciatura en Biología). Universidad Veracruzana, México.

8. APENDICE

Apéndice A: Glosario de términos.

- 1. Asepsia:** Sin infección o contaminación de microorganismos.
- 2. Biotecnología.** Aplicación de principios científicos y de ingeniería al procesamiento de materiales por agentes biológicos para producir bienes y servicios.
- 3. Cámara/campana de flujo laminar:** Dentro de esta se practica el tratamiento aséptico de materiales para cultivos de tejidos. En esta se genera un flujo de aire estéril que contribuye a las condiciones asépticas del área de trabajo.
- 4. Cultivo aséptico:** Estéril, libre de organismos contaminantes (bacterias y hongos).
- 5. Desarrollo:** Puede decirse que es un proceso gradual que toma tiempo para lograrse completamente, generalmente está acompañado por incrementos en peso y tamaño, involucrando la aparición de nuevas estructuras y funciones y la pérdida de las originarias.
- 6. Desinfección:** Eliminar selectivamente microorganismos (de manera artificial), que se encuentren en los materiales como en las herramientas.
- 7. Estéril:** a) Sin vida. b) inhabilidad de un organismo de producir gametos viables.
- 8. Etapa i:** Etapa en la propagación "*in vitro*" caracterizada por el establecimiento de un cultivo de tejido aséptico (no contaminado).
- 9. Explanto:** Llamado también "masivo" "vitroplanta", es un tejido obtenido de su sitio original y transferido a un medio artificial para crecimiento (proliferación) o mantenimiento.

10. *In vitro*: Cultivo de parte de un organismo o microorganismos en vidrio. Por ejemplo: en tubos de ensayo o en frascos, en un medio artificial y bajo condiciones asépticas.

11. Medio nutritivo: Solución sólida, semisólida o líquida contiene las sustancias nutritivas necesarias para el crecimiento *in vitro* de células o tejidos.

12. Medio líquido: Solución líquida de cultivo sin agente solidificante para el crecimiento celular *in vitro*.

13. Medio sólido: Solución nutritiva solidificada por la adición de un agente gelificante, generalmente agar.

14. Micropropagación: Propagación clonal "*in vitro*" de plantas a partir de brotes apicales o explantos nodales, usualmente con proliferación acelerada de brotes durante los subcultivos.

15. Primordio: Estado todavía rudimentario de un órgano que empieza a formarse.

16. Propagación "*in vitro*": Multiplicación de plantas en un ambiente artificial controlado, usando recipientes plásticos o de vidrio, técnicas de asepsia y un medio de crecimiento definido.

17. Reguladores de crecimiento o fitohormonas: Los agentes que controlan el crecimiento del cuerpo vegetal tales como: auxinas, citocinas, Giberelinas, etc.

18. Tween 20: Surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas y farmacológicas.

9. ANEXOS

Anexo 1. Material de laboratorio necesario para realizar la etapa de establecimiento *in vitro*.

2 Matraz Erlenmeyer de 2000 ml

7 Matraz Erlenmeyer de 100 ml

8 Balones volumétricos de 125 ml

15 frascos de 200 ml

1 Beaker de 250 ml

1 Beaker de 100 ml

5 Cajas de Petri

1 probeta 50 ml

5 pipetas de 0.5 ml

1 Dosificador de precisión para pipetas

2 Piseta de 500 cc

Papel aluminio

Plástico transparente para embalaje (cling-film)

2 Espátulas de metal

4 Pinzas de varios tamaños

4 Bisturís (hojas desechables)

EQUIPOS

Cámara de flujo laminar

Autoclave

Potenciómetro

Balanza analítica

Agitador magnético

con calentamiento

Estereoscopio

REACTIVOS

Etanol al 70% y 90%

HCl 1.0 N

NaOH 1.0 N

NaClO 10%

Tween 20

Phytigel

ANEXO 2. Soluciones madre MS (Murashige – Skoog, 1962).

Componente	Fórmula	Nombre común	Sol. madre	g/lit	Agua destilada Lts
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1	165.0000	2
	KNO ₃	Nitrato de potasio	2	190.0000	2
	KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio dibásico	3	17.0000	1
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio 2H ₂ O	4	44.00 * (34.150)	1
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	5	37.0000	1
	FeSO ₄ - 7H ₂ O	Sulfato de hierro heptahidratado	6	2.7800	1
	Na ₂ - EDTA	EDTA disódico		3.7300	
Microelementos	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso 4H ₂ O		2.23 * (1.690)	
	H ₃ BO ₃	Ácido bórico		0.6200	
	ZnSO ₄ - 7 H ₂ O	Sulfato de zinc 7 H ₂ O		0.8600	
	KI	Yoduro de potasio	7	0.0830	1
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio dihidratado		0.0250	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado		0.0025	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado		0.0025	
Componentes orgánicos		Mio inositol		20.000	
		Ácido nicotínico		0.100	
		Tiamina	8	0.100	1
		Piridoxina		0.020	
		Glicina		0.400	

Fuente: ENA