



Determinación de un método para el  
establecimiento *in vitro* de orquídeas  
adaptado a condiciones y recursos de los  
estudiantes de la I.E Técnico Rural de Marinilla



# DETERMINACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS ADAPTADO A CONDICIONES Y RECURSOS DE LOS ESTUDIANTES DE LA I.E TÉCNICO RURAL DE MARINILLA

Yuliana Montoya Pérez<sup>a</sup>, Stefany González Suárez<sup>a</sup>, Valentina Suárez Giraldo<sup>a</sup>, Luisa Fernanda Serna Saraza<sup>a</sup>, Santiago Londoño Chica<sup>b</sup>, Liliana María Cardona Bermúdez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>SENA, Centro de la Innovación, la Agroindustria y la Aviación, Semillero de Investigación. Aprendiz Técnico en Sistemas Agropecuarios Ecológicos Articulación SENA Educación Media (ASEM), yuli02258@gmail.com, c.stefanygonsu@gmail.com, valensuarez84@gmail.com, luisaaferr15@gmail.com

<sup>b</sup>SENA, Centro de la Innovación, la Agroindustria y la Aviación, Semillero de Investigación ASEM, Instructor ASEM, slondono944@misena.edu.co

<sup>c</sup>SENA, Centro de la Innovación, la Agroindustria y la Aviación, Grupo de investigación Interacción Genotipo x Ambiente y calidad de Alimentos, Tecnoparque Nodo Rionegro, lilianacardona@misena.edu.co

## RESUMEN

Como una estrategia de conservación de las orquídeas, se determinó un método para producirlas *in vitro*. Se evaluaron diferentes protocolos de desinfección de la semilla con hipoclorito y peróxido de hidrógeno y medios artesanales: plátano, tomate, tomate + zanahoria hasta la aparición de protocormos. El método de desinfección más eficiente involucra el uso de hipoclorito de sodio al 5%. El medio artesanal más eficiente tiene como base el plátano, con porcentajes de germinación del 50%. Se evidenció contaminación que no impide el desarrollo de la planta. Este trabajo es la base para continuar con la estandarización de la producción *in vitro* de orquídeas en la I.E Técnico Rural de Marinilla.

**Palabras clave:** Biotecnología vegetal, epífitas, laboratorio, medios de cultivo

## 1. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son plantas epífitas que pueden ser cultivadas de manera simbiótica o asimbiótica con fines ornamentales lucrativos o recreativos. En el mundo existen alrededor de 1.000 géneros y 35.000 especies. Colombia es el país con mayor número de especies de orquídeas y en la actualidad tiene registradas alrededor de 4270 especies, de las cuales 1572 son exclusivas. La región Andina posee 944 especies endémicas que equivalen a más del 78% de las registradas en el territorio nacional (Betancur et al., 2015).

Existe un alto riesgo de extinción de diferentes variedades por actividades antrópicas que afectan los ecosistemas donde crecen estos organismos, incluyendo los polinizadores específicos existentes. Esas actividades son básicamente la deforestación para extracción de madera, establecimiento de cultivos y potreros para ganadería, minería y desarrollo urbano (Betancur et al., 2015). Es indispensable entonces enriquecer la investigación relacionada con producción in vitro con el fin de identificar protocolos como una estrategia para la conservación de diferentes especies y adicionalmente que permitan obtener rentabilidad en la producción con un enfoque sostenible. El objetivo del trabajo fue determinar un método para el establecimiento in vitro de orquídeas adaptado a condiciones y recursos de los estudiantes de la I.E Técnico Rural de Marinilla.

## 2. REFERENTE TEÓRICO

El cultivo in vitro se ha considerado como una herramienta que permite obtener material vegetal en masa ocupando espacios reducidos, con facilidad de transporte, uniformidad en la producción, control de diferentes condiciones ambientales que facilitan la investigación y estudios de diferentes procesos fisiológicos (Segretín, 2006). Su implementación se puede convertir en una de las más importantes estrategias para conservación ex situ y formar bancos de células, tejidos o plantas.

México es un país líder en investigación para producción de orquídeas. Se han usado diferentes medios para la producción de orquídeas: Murashige and Skoog (Mendoza, 2016), este medio suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona, carbón activado y polivinil pirrolidona (Flores et al.,

2008) y el medio Knudson C, y el Dalla Rosa y Laneri modificados (Damon et al., 2004). Se encontraron porcentajes de germinación en los diferentes estudios entre 49.67% y 93.2%. Se mencionan soluciones desinfectantes con hipoclorito de sodio, tween 20 y soluciones jabonosas.

### 3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Se llevó a cabo una investigación aplicada de tipo descriptivo en el área de propagación in vitro de orquídeas.

#### 3.1 Localización

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio Biogestec perteneciente al Tecnoparque Sena Nodo Rionegro, ubicado en el municipio de Guarne, con una temperatura promedio de 17 grados centígrados y ubicado a 2150 m.s.n.m.

#### 3.2 Material vegetal

Se emplearon 2 cápsulas maduras completamente cerradas de una variedad mini de orquídea que fue donada por el Vivero Cielo Roto del municipio de Caldas (Antioquia). No se llevó a cabo una identificación taxonómica de la misma.

#### 3.3 Experimento

Se evaluaron diferentes medios artesanales: plátano, tomate, tomate + zanahoria. La formulación de dichos medios se observa en la tabla 1. Adicionalmente se evaluó el jugo de vegetales V8®, compuesto por agua y jugos concentrados de tomate, zanahoria, remolacha, apio, perejil, puerro, lechuga, espinaca, sales (menos del 2%), ácido ascórbico y ácido cítrico. En la preparación de los medios; los tomates y las zanahorias se lavaron con agua limpia, se pelaron y fueron sumergidos en una solución de Citrosan® a una razón de 3 ml por litro de agua durante 15 minutos y no se enjuagaron. Se utilizó licuadora para obtener pulpas, que fueron depositadas en tubos cónicos de 50 ml. Se sometieron a centrifugación a 4700 rpm durante 5

minutos para obtener el zumo. Esta operación se repitió hasta lograr el mayor volumen posible. El zumo fue filtrado en tela para retirar partículas de gran tamaño y posteriormente en papel filtro cualitativo grado medio rápido corrugado. Fueron llevados a cabina de flujo laminar y se filtraron con acrodiscos de 0.2  $\mu\text{m}$  diámetro de ojo, utilizando jeringas y tubos cónicos estériles, excepto el zumo de tomate por falta de disponibilidad de acrodiscos. Para este caso en particular se adicionó una gota del fungicida Tecnomyl®. Los demás componentes de los medios se pesaron, se homogenizaron en plancha de calentamiento con agitación magnética y se esterizaron a 121°C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Una vez alcanzaron una temperatura inferior a los 45°C, se mezclaron con los zumos y se vertieron en frascos de vidrio estériles hasta alcanzar los 30 ml por frasco. Se dejaron reposar dentro de la cabina de flujo laminar hasta que polimerizaron. Se realizó la determinación del pH de cada uno de los medios. Se evaluaron dos protocolos de desinfección: sumergir una cápsula de orquídea en hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, lavar con agua destilada estéril, sumergir en etanol al 70% y flamear. El otro procedimiento consistió en sumergir cápsula en peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos con los pasos sucesivos idénticos al mencionado anteriormente. Una vez desinfectadas; cada cápsula fue llevada a una caja de Petri estéril, se le hicieron cortes y con una pinza estéril las semillas fueron depositadas en los frascos con los medios. Posteriormente, se taparon con papel film (vinipel) y se almacenaron a temperatura ambiente sometidas a un régimen de fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

El diseño experimental consistió en evaluar 4 medios: V8, tomate, tomate + zanahoria y plátano. Cada medio se sembró con semillas sometidas a diferentes protocolos de desinfección: hipoclorito de sodio al 5% y peróxido de hidrógeno al 3%. Se tuvieron 4 repeticiones por medio, dos de los cuales correspondían a cada uno de las formas de desinfección. Adicionalmente para verificar la efectividad del protocolo de desinfección, se tuvo un control negativo consistente únicamente en medio artesanal. Las variables respuesta fueron el porcentaje de germinación y la contaminación encontrada. Dicha evaluación se llevó a cabo 50 días posteriores a la siembra. Se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo de los datos.

**Tabla 1.** Formulación de medios artesanales utilizados para un volumen final de 150 ml.

|                      | Zumo Plátano | Zumo Tomate | Zumo Tomate + Zumo zanahoria | V8      |
|----------------------|--------------|-------------|------------------------------|---------|
| Componente principal | 73 ml        | 80 ml       | 25 ml + 15 ml                | 150 ml  |
| Agar agar            | 2.4 gr       | 3,3 gr      | 2,4 gr                       | 2.25 gr |
| Sacarosa             | 3.3 gr       | 2,4 gr      | 3.75                         | 0       |
| Tiamina              | 300 mg       | 300 mg      | 300 mg                       | 0       |
| Agua destilada       | 77 ml        | 70 ml       | 110 ml                       | 0       |

Fuente: Elaboración propia.

#### 4. RESULTADOS

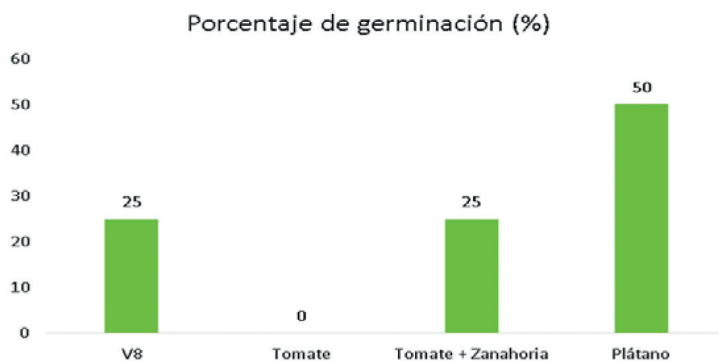
Con respecto a los medios, todos exhibieron un pH ácido. Se realizó la determinación para cada uno mostrando los siguientes valores: V8 5.7, tomate y zanahoria 5.2, tomate 4.8 y plátano 5.1. En términos generales, en el experimento se encontró un porcentaje de germinación de la orquídea de 25%, evidenciada con la formación de protocormos (masa tuberosa que corresponde a la forma embrionaria de la orquídea) de color verde. El porcentaje de contaminación fue del 45% en todo el ensayo (figura 1).



**Figura 1.** a y b. Formación de protocormos de orquídea in vitro. c. Contaminación de cultivo con hongos. Fuente. Elaboración propia

En la figura 2 se observa el porcentaje de germinación en cada medio de cultivo utilizado.

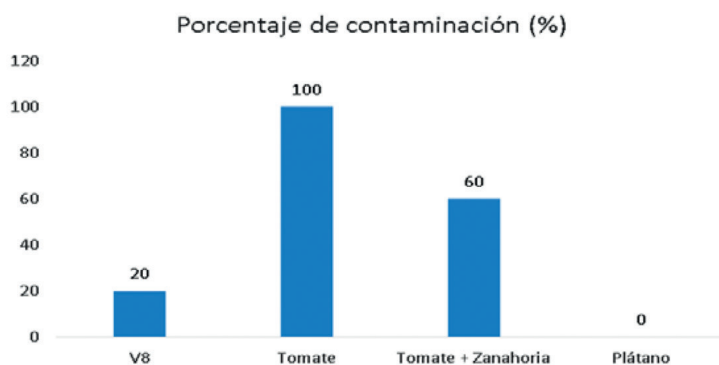




**Figura 2.** Porcentaje de germinación de orquídeas según el medio de cultivo

Fuente. Elaboración propia

La contaminación encontrada por medio de cultivo se muestra en la figura 3.



**Figura 3.** Porcentaje de contaminación de orquídeas según el medio de cultivo

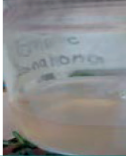
Fuente. Elaboración propia

En relación a los controles negativos usados para los protocolos de desinfección en cada medio de cultivo, la tabla 2 describe la presencia o ausencia de la misma.

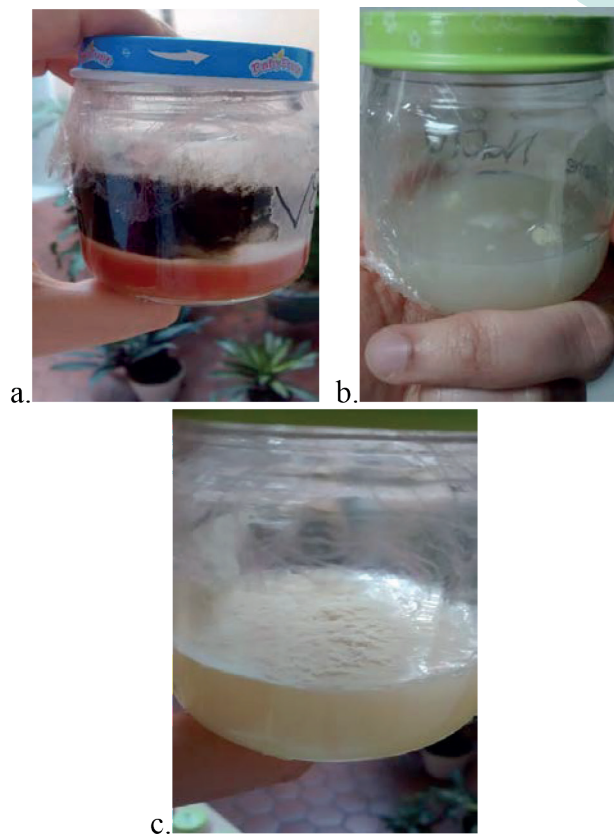
Se presentaron tres tipos de contaminación en los diferentes cultivos: hongos, caracterizados por su aspecto algodónoso, de color blanco o de color verdoso; bacterias con aspecto cremoso, de color blanquesino o marrón; en algunos medios se observó presencia de ambos tipos de microorganismos (figura 4). No se llevó a cabo ningún método de identificación de los mismos.

En los medios de cultivo cuyo control negativo no presentó contaminación con microorganismos, se determinó la efectividad del protocolo de desinfección, la cual se muestra en la figura 5.

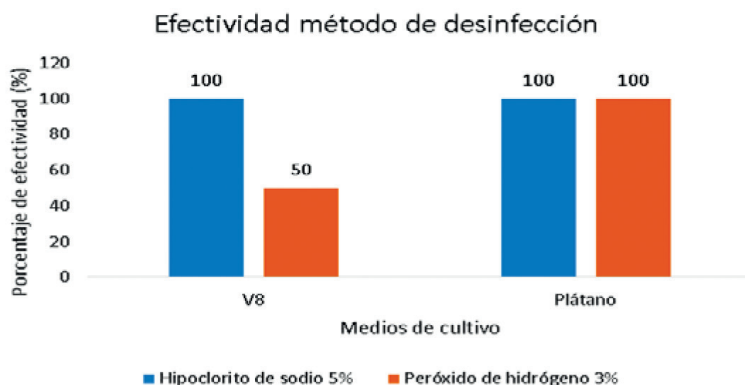
**Tabla 2.** Presencia o ausencia de contaminación en los controles negativos.

| Medio de cultivo   | Contaminación | Observación                                                                         |
|--------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| V8                 | Negativa      |    |
| Tomate             | Positiva      |   |
| Tomate + Zanahoria | Positiva      |  |
| Plátano            | Negativa      |  |

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 4.** Tipos de contaminación en diferentes medios de cultivo  
Fuente. Elaboración propia



**Figura 5.** Eficiencia del proceso de desinfección de semilla según el medio de cultivo

Fuente. Elaboración propia

Según los resultados del experimento, los pH de los medios se encontraron entre 4,8 y 5,7. Se ha reportado que la mayoría de orquídeas germinan a pH de 5.5 y algunas especies de la zona andina entre 5.5 y 5.9 (McKendrick, 2000). Si relacionamos esto con la germinación, no necesariamente el medio con valor de pH más cercano a 5.5 fue el mejor, ya que el medio con plátano mostró mejores resultados que el V8 que estaba en pH de 5,7. Lo anterior indica que la germinación es un evento mediado por diferentes variables entre las que se encuentran el estado de maduración de la semilla, la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, la presencia de factores de crecimiento, el fotoperiodo, la temperatura, entre otros.

En el presente trabajo no se consideró la especie de orquídea que se trabajó debido al desconocimiento y falta de herramientas para hacerlo. Adicionalmente tampoco se definió el estado de madurez de la cápsula; únicamente por el cambio de coloración de verde a marrón que sufrió desde la recolección hasta la siembra, se asumió que se presentó este evento fisiológico.

La maduración es un factor que influye en la germinación. De igual manera el fotoperiodo. En el momento de la evaluación, algunos de los cultivos no habían germinado aún pero posiblemente estaban en proceso. Algunos factores desconocidos pueden tener influencia en este aspecto. Se

sometieron los cultivos a un fotoperiodo 12:12 luz:oscuridad. Damon et al (2004) trabajaron en algunas especies de orquídea 16:8 con una intensidad de luz de 3,500 lux utilizando lámparas de luz día. En este mismo trabajo la temperatura osciló entre 25 a 28 °C. En el presente estudio fue de 20°C aproximadamente.

El medio de cultivo con plátano fue el que mayor porcentaje de germinación exhibió. Es probable que el contenido de solutos que tiene favorece el desarrollo hasta la formación de protocormos. El tomate siempre ha sido referenciado en el conocimiento ancestral como benéfico para las orquídeas. En este estudio el medio basado en tomate no germinó posiblemente por la contaminación. Si bien se observó en el experimento germinación a pesar de la contaminación, es posible que el tipo de hongos y/o bacterias presentes produzcan algún tipo de inhibición en el desarrollo del material vegetal.

Se ha reportado que la adición de factores de crecimiento como ANA (ácido 1-naftalenacético) y BAP (6-bencilaminopurina), aumentan el porcentaje de germinación y el número de brotes (Villa y Arbeláez, 2015).

En cuanto a la contaminación, el medio con tomate exhibió el mayor porcentaje ya que el zumo no fue filtrado con acrodisco y la cantidad de fungicida adicionado no fue suficiente. Las bacterias son el tipo de microorganismo más observado en el experimento. Si bien se quiso probar un protocolo de desinfección, hay que considerar que una mala manipulación del material y herramientas contribuye a la contaminación. Esto se evidencia en los medios con tomate y tomate + zanahoria, donde se encontró que los controles negativos salieron positivos para presencia de bacterias y hongos respectivamente. Es necesario entonces mejorar en ese aspecto. Se presentó una mayor efectividad en los protocolos de desinfección con hipoclorito de sodio. Se requiere el uso de herramientas estadísticas que ayuden a determinar la interacción de los medios con los desinfectantes, ya que en el caso del V8 la efectividad del peróxido disminuyó un 50% comparada con la del plátano.

## 5. CONCLUSIONES

Los medios artesanales pueden ser una buena alternativa para el cultivo in vitro de orquídeas ya que se evidencia la formación de protocormos. El medio artesanal evaluado más eficiente tiene como base el plátano. Los cultivos deben de estar sometidos a una temperatura promedio de 20°C y a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El método de desinfección más eficiente y económico de la cápsula es el que involucra el uso de hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, seguido por lavado con agua destilada estéril, inmersión en etanol al 70% y flameado. El desarrollo del protocormo en algunos casos puede darse en presencia de microorganismos.

## 6. REFERENCIAS

- Betancur, J., Sarmiento, H., Toro-González, L., & Valencia, J. (2015). Plan para el estudio y la conservación de orquídeas en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Naturales y Ministerio de Ambiente.
- Damon, A., Aguilar, G. E., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 195-203.
- Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. T. (2008). Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(3), 347-353.
- McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito.
- Mendoza, I. (2016). Eficiencia de los medios nutritivos basales: sólido y líquido en la etapa de establecimiento in vitro de la orquídea “Tripita” *Trichopilia tortilis* Lindl. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 5, 43-57.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A Revised Medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Rodríguez, L. et al. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. [En línea]. Cuba. 2005. ISBN 959-250-156-4. Disponible en: [www.dama.gov.co](http://www.dama.gov.co).

Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología.

Villa Ramírez, R, & ARBELAEZ, L. (2015). Establecimiento in vitro de orquídeas “*Cattleya mendelii*” a partir de semillas. [En línea] Recuperado de: <http://repositorio.uniquindio.edu.co/handle/123456789/520> [Consultado en noviembre de 2016]