



UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA
NACIONAL

Educadora de educadores

OPTIMIZACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA DE *CATTLEYA*
TRIANAE PARA SU CONSERVACIÓN Y POTENCIAL APROVECHAMIENTO

Nicole Rocio Benavides Angarita

2019210008

Universidad Pedagógica Nacional

Facultad de Ciencia y Tecnología

Departamento de Biología

Bogotá D.C. 2024



UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA
NACIONAL

Educadora de educadores

OPTIMIZACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA DE *CATTLEYA*
TRIANAE PARA SU CONSERVACIÓN Y POTENCIAL APROVECHAMIENTO

Nicole Rocio Benavides Angarita

Trabajo presentado como requisito para optar al título de Licenciada en Biología

Directora del trabajo de grado

Silvia Rosy Gómez Daza

M. Sc. Microbiología

Línea de Investigación:

Biodiversidad, Biotecnología y Conservación

Universidad Pedagógica Nacional

Facultad de Ciencia y Tecnología

Departamento de Biología

Bogotá D.C. 2024

Nota de Aceptación

Firma de director

Firma del jurado

Firma del jurado

Dedicatoria

A mi amada familia, a quienes les debo todo, por su amor incondicional, apoyo constante y por ser mi fuente inagotable de inspiración. A mi mamá Nubia Angarita y mi papá Libardo Benavides, por guiarme con su sabiduría y enseñarme el valor del esfuerzo, la disciplina y la dedicación. A mis queridas hermanas, Lady, Sol y Yaris, por compartir conmigo su complicidad, palabras de amor, aliento y alegrar cada momento de mi proceso académico y personal. A Juan Pablo, mi amor y cómplice, por ser mi apoyo y motivación en cada paso de este camino. Esta tesis está dedicada a todos ustedes, quienes han sido mi luz en los momentos más oscuros y mi razón para nunca rendirme. ¡Gracias por todo!

Agradecimientos.

Me agradezco a mí misma por no desfallecer cuando creí que no podía, por encontrar fuerzas en los momentos más difíciles. Por todos los momentos en que me motivé a sacar lo mejor de mí y continué avanzando a pesar de las adversidades. Por creer en mí y en mi capacidad para alcanzar mis metas, demostrando que, con perseverancia y determinación, todo es posible.

Agradezco a Dios por acompañarme en esta vida, por sus bendiciones y su guía constante.

A mi amada familia, por su apoyo incondicional que ha sido fundamental en esta etapa tan importante en mi vida. Sin ustedes, no habría sido posible llegar hasta aquí; son mi mayor motivación.

Agradezco a mi novio Juan Pablo por su inquebrantable apoyo, su amor y motivación han sido constantes, no solo en los momentos difíciles, sino también en los buenos. También a su familia, por el cálido amor de hogar que me han brindado y la voz de aliento al final.

A mis queridas amigas Juanita y Roxana, quienes siempre han estado a mi lado como verdaderas hermanas. Quiero agradecerles de todo corazón por su apoyo incondicional. Este logro también es de ustedes. Siempre las llevaré en mi corazón.

Agradezco a la profesora Pilar por su invaluable enseñanza y orientación en el mundo de la micropropagación y las orquídeas. Gran parte de mi éxito en este campo se lo debo a ella.

A la Universidad Pedagógica Nacional, agradezco por educarme a lo largo de mi formación académica. Gracias por enriquecer mi conocimiento de manera significativa y por brindarme la oportunidad de estudiar aquello que me apasiona.

Por último, agradezco a mi tutora y directora Silvia Rosy Gómez Daza, por ser la guía que encaminó mis ideas y me brindó ayuda en la conformación de mi trabajo de grado.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. General.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. ANTECEDENTES.....	19
4.1 Cultivos de tejidos in vitro de orquídeas	19
4.2 Estrategias de divulgación científica de los cultivos de tejidos in vitro..	25
5. MARCO TEÓRICO	31
5.1 Las orquídeas.....	31
5.1.1. Generalidades de las orquídeas	31
5.1.2 Morfología de la orquídea <i>Cattleya trianae</i> (flor de mayo)	33
5.1.3. Importancia de las orquídeas.....	35
5.2. Cultivo de tejidos in vitro.....	36
5.3 Divulgación científica	39
6. METODOLOGÍA.....	41
6.1. Paradigma hermenéutico interpretativo y enfoque mixto.....	41
6.2 Instrumentos y técnica de recolección de datos	42
6.3 Contextualización del laboratorio.....	43
6.4 Diseño metodológico	44
6.4.1. Fase 1: Contextualización.....	44
6.4.2. Fase 2: Experimental	45
6.4.3 Fase 3. Diseño del manual divulgativo: Manual de embriogénesis directa de la <i>Cattleya trianae</i>	45
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	46
7.1 Contextualización	46
7.1.1 Revisión documental.....	46

7.1.1.1	Divulgación científica sobre cultivo de tejidos vegetales	46
7.1.1.2	El cultivo de tejidos vegetales en <i>Cattleya trianae</i>	47
7.2	Fase experimental	48
7.2.1.	Obtención de material vegetal	49
7.2.2.	Protocolo de asepsia de frascos y cápsulas de <i>Cattleya trianae</i>	49
7.2.3.	Estandarización de los protocolos de los medios de cultivos.	52
7.2.4.	Identificación de las fases de crecimiento de <i>C. trianae</i> en el medio de cultivo 2	66
7.3.	Diseño del manual divulgativo.	70
8.	Conclusiones	76
9.	Recomendaciones.....	78
10.	Bibliografía.....	79
11.	ANEXO	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>Cattleya trianae</i> . Imagen tomada de orquídeas de Cundinamarca, conservación y aprovechamiento sostenible.....	33
Figura 2. Capsula de <i>C. trianae</i> . Imagen toda de orquídeas de Cundinamarca, conservación y aprovechamiento sostenible. (p.30).....	34
Figura 3. Cultivo de tejido in vitro. Elaboración propia.	39
Figura 4. <i>Fases de metodología. Elaboración propia</i>	44
Figura 5. Protocolo de asepsia de frascos para medios de cultivos. Benavides 2024.	50
Figura 6. Semillas de la orquídea en sus primeros 30 días en oscuridad. Mayo de 2023.	55
Figura 7. <i>Semillas amarillentas en formación de callo. Junio de 2023.</i>	55
Figura 8. <i>Embriones germinados al mes y medio. Julio 2023.</i>	56
Figura 9. <i>Embriones germinados de tres meses para extracción a caja de petri. Agosto de 2023.</i>	57
Figura 10. Embriones germinados tres meses después. Agosto de 2023.	57
Figura 11. Embriones de orquídea con apariencia polvorienta. Mayo de 2023. ..	58
Figura 12. Embriones de orquídea germinados al mes y medio. Junio de 2023 ..	58
Figura 14. Desarrollo del protocormo y rompimiento de la testa. Julio de 2023 (M2 del 24/05/2023)	59
Figura 13. Desarrollo del protocormo de <i>C. trianae</i> . Julio de 2023 (M2 del 28/04/2023).....	59
Figura 15. Desarrollo del primordio foliar y el inicio de hojas verdaderas. Agosto de 2023.	60
Figura 16. Desarrollo del primordio foliar. (Agosto de 2023)	60
Figura 17. Embriones cinco meses después. Septiembre de 2023.....	61
Figura 18. Embriones en recipiente de plástico. Octubre de 2023. Desarrollo de hojas y raíces.	61
Figura 19. Embriones con crecimiento de hojas y raíz. Octubre de 2023.	62
Figura 20. Embriones de seis meses. Noviembre de 2023.	62

Figura 21. Embriones de seis meses. Primeras plántulas con hojas fuertes y raíces. Noviembre de 2023	62
Figura 22. Embriones de siete meses. Diciembre de 2023.	63
Figura 23. Embriones de siete meses con formación de dos hojas y raíces. Diciembre de 2023.	63
Figura 24. Embriones de ocho meses ya con hojas y raíces fuertes. Enero 2024	64
Figura 25. Embriones de ocho meses en recipiente de plástico. Plántulas completa con nuevas hojas y raíces. Enero de 2024.	64
Figura 26. <i>Medio de cultivo con miel.</i>	66
Figura 27. Embrión hinchado bajo al microscopio.	67
Figura 28. Embrión de <i>C. trianae</i> rompiendo y emergiendo de la testa.....	67
Figura 29. Protocormo.	68
Figura 30. Protocormo con primordio foliar.....	68
Figura 31. Plántula con hojas.	68
Figura 32. Plántula con hoja y raíz	68
Figura 33. Plántula con hojas y dos raíces.	69
Figura 34. Masa embrionaria callosa. Benavides 2023.	69
Figura 35. Portada del manual.	71
Figura 36. Importancia de las orquídeas.	72
Figura 37. Generalidades sobre las orquídeas.....	72
Figura 38. Morfología de la planta de <i>Cattleya trianae</i>	73
Figura 39. Protocolo de asepsia para frascos.	73
Figura 40. Embriogénesis directa de <i>Cattleya trianae</i>	74
Figura 41. Descripción de los estadíos de germinación de las semillas de la <i>C. trianae</i>	74
Figura 42. Descripción de los estadíos de la semilla <i>C. trianae</i> . Plántula con hojas y dos raíces.	75
Figura 43. Glosario.....	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cápsula abierta y cerrada de <i>Cattleya trianae</i> . Benavides (2024)	49
Tabla 2. Protocolo de asepsia para cápsulas.....	51
Tabla 3. Medios de Cultivos y observaciones de la orquídea <i>Cattleya trianae</i> . Fotografías Benavides 2023 y 2024.....	55
Tabla 4. Descripción de estadios de germinación de las semillas de la <i>Cattleya trianae</i>	67

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) por componentes más suplementos.	88
--	----

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son conocidas por su belleza y estructuras únicas, a menudo deslumbrantes por sus colores vibrantes. Sin embargo, su reducido tamaño en el bosque a veces las hace pasar desapercibidas. Más allá de su atractivo estético, estas plantas desempeñan un papel crucial en los ecosistemas. Las orquídeas epífitas, situadas en la parte alta de los bosques, actúan como barreras que interceptan la neblina y las nubes, lo que aumenta la precipitación local y reduce el volumen de escurrimiento del agua. Además, estas orquídeas contribuyen al ciclo de nutrientes al albergar una gran cantidad de hongos formadores de micorrizas orquidioides. Por lo tanto, la conservación de las orquídeas no solo protege una especie en particular, sino que también garantiza la preservación de servicios ecosistémicos esenciales para la salud y la sostenibilidad de nuestros ecosistemas. Para lograrlo, es fundamental recurrir a diversas alternativas de conservación, como el uso de prácticas de laboratorio de biotecnología, incluida la técnica de la embriogénesis directa, así como la elaboración de un manual que permita la divulgación científica de esta investigación.

En la presente investigación se diseñó un manual titulado “*Cattleya trianae*: ¡Cultiva Orquídeas para Conservarlas!”, el cual representa un recurso fundamental para la divulgación científica sobre el cultivo de tejidos, especialmente en lo que respecta a la embriogénesis directa de esta especie. El manual abarca una variedad de temas relevantes, incluyendo generalidades sobre las orquídeas, información detallada sobre la morfología de la *C. trianae*, entre otros. Su objetivo principal es difundir de manera clara y accesible los procesos y técnicas necesarios para el cultivo exitoso de esta orquídea, contribuyendo así a su conservación y resaltando la importancia de la biotecnología en la preservación de especies en peligro crítico.

Para la investigación, se empleó un paradigma hermenéutico-interpretativo con un enfoque de naturaleza mixta, combinando elementos cualitativos y cuantitativos. Este enfoque se desplegó a lo largo de tres fases fundamentales en la ruta metodológica del estudio. La primera fase consistió en una exhaustiva revisión documental que permitió contextualizar el trabajo, construir el planteamiento del

problema, establecer los antecedentes, justificar la investigación, desarrollar el marco teórico, definir la metodología a seguir y analizar los resultados obtenidos. También se recopiló información relevante sobre la divulgación científica relacionada con el cultivo de tejidos in vitro de orquídeas, enriqueciendo así el contenido del estudio. La segunda fase se centró en la parte experimental, donde se llevó a cabo la estandarización de los protocolos de asepsia y medios de cultivo necesarios. Además, se procedió con la siembra de las semillas provenientes de las cápsulas y se realizó un registro fotográfico detallado, junto con la identificación de los diferentes estadios de desarrollo de los embriones, lo que contribuyó a la generación de datos cuantitativos y cualitativos fundamentales para el estudio. Finalmente, la tercera fase se dedicó al diseño del manual divulgativo, que se convirtió en una herramienta crucial para compartir los hallazgos y conocimientos adquiridos durante la investigación. Este manual no solo facilitó la divulgación científica sobre el cultivo de tejidos in vitro de orquídeas, sino que también representó un medio efectivo para comunicar a la comunidad científica y al público en general sobre la importancia de la conservación de estas especies en peligro crítico.

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La *Cattleya trianae* es una especie emblemática de orquídea exclusiva de Colombia, no solo es importante por su belleza y valor cultural, sino también por su papel crucial en los ecosistemas donde se encuentra, como polinizadora e indicadora de la salud ambiental; sin embargo, actualmente enfrenta una amenaza inminente de extinción debido a factores como el cambio climático, la deforestación, la contaminación y la sobreexplotación comercial. La gravedad de la situación se destaca por la reducción estimada de la población en más del 80% en los últimos 100 años, colocándola en la categoría de peligro crítico según los criterios de conservación (Calderón, 2006). Adicionalmente, se encuentra en un área mayor a 20,000 km², lo que subraya la gravedad de su disminución drástica a lo largo del último siglo. Dado lo anterior, se genera una preocupación en cuanto a su conservación debido a su disminución, también sobre la carencia de protocolos estandarizados para la embriogénesis directa, una prometedora técnica de cultivo in vitro, subrayan la urgencia de abordar esta problemática, por lo tanto, como docente en formación se resalta la necesidad de abordar los desafíos asociados con su preservación utilizando como una alternativa el cultivo de tejido in vitro.

Es importante mencionar, que la desaparición de esta especie se debe al uso descontrolado de “productos agroquímicos que tienen en riesgo a sus polinizadores, la deforestación, la contaminación, la recolección indiscriminada, el comercio ilegal, entre otros” (WWF., Constantino, 2018). Esta combinación de amenazas confirma la vulnerabilidad de la especie, disminuyendo significativamente sus probabilidades de supervivencia en su entorno natural. La falta de interés en su conservación también contribuye al problema, “el efecto de esta destrucción sobre las poblaciones de plantas en general y de orquídeas en particular es preocupante” (Gartner, 2010. p.5). Además, Calderón-Sáenz (2007) estimó, basado en el análisis de dieciocho géneros, que unas 371 especies (10%) de orquídeas de Colombia estarían amenazadas de extinción.

Por otra parte, después de realizar una revisión documental se evidencia pocos protocolos para la embriogénesis directa de la *Cattleya trianae*; la carencia de estos

puede atribuirse a diversos factores, primero la singularidad geográfica y su distribución restringida pueden haber llevado a un enfoque limitado en su investigación. Segundo, la complejidad biológica de esta especie y las características únicas de su entorno también pueden haber presentado desafíos para la estandarización de procedimientos. Tercero, la adaptación de la técnica de embriogénesis directa a las particularidades de la especie podría requerir un enfoque más personalizado y detallado. Esta escasez de información recalca la necesidad urgente de desarrollar procedimientos encaminados a la embriogénesis directa y de esta manera contribuir a los esfuerzos de conservación, asegurando así la preservación a largo plazo de esta especie emblemática en el contexto de la biodiversidad colombiana.

Dado a lo anterior en la presente investigación se plantea la siguiente pregunta problema

¿De qué manera el proceso de embriogénesis directa de la *Cattleya trianae* puede contribuir a la conservación de esta especie?

2. OBJETIVOS

2.1. General

Optimizar el proceso de embriogénesis directa de *Cattleya trianae* para su conservación y potencial aprovechamiento

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Estandarizar protocolos de embriogénesis directa de *Cattleya trianae* para mejorar los procesos de su introducción a in vitro.

2.2.2 Identificar las diferentes fases y estadios morfofisiológicos a nivel in vitro de *Cattleya trianae* para enriquecer el conocimiento de esta especie.

2.2.3 Diseñar un manual que promueva la divulgación científica del proceso de cultivo de tejidos in vitro de *Cattleya trianae*.

3. JUSTIFICACIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más grandes del reino vegetal y se destaca por su enorme valor ornamental, gracias a la belleza de sus flores, las cuales se caracterizan por su exuberancia y una amplia variedad de tamaños y colores (Pabst & Dungs, 1975). En los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, se ha observado un notable avance en el estudio de su biología, lo que abre nuevas oportunidades para próximas investigaciones. La aplicación de técnicas en la biotecnología como el cultivo de tejidos *in vitro*, ha permitido profundizar en el conocimiento de estas plantas, lo que es crucial para contribuir a la conservación de especies de orquídeas que se encuentran en peligro de extinción como la *Cattleya trianae*.

Actualmente, la especie se encuentra en peligro crítico debido a la deforestación para obtener madera y ampliar la frontera agropecuaria. Esta actividad ha causado una transformación del paisaje, deteriorando la calidad del hábitat. Además, la especie ha sido objeto de recolección excesiva durante más de 150 años (Calderón, 2006). Por eso, ante esta problemática, la embriogénesis directa se presenta como una técnica innovadora y crucial, que se utiliza como una de las muchas alternativas no solo para preservar la especie en su hábitat natural, sino también para establecer un banco de germoplasma que garantice su supervivencia a largo plazo. De esta manera, este trabajo no solo aporta nuevos conocimientos a un campo de investigación poco explorado teniendo en cuenta la revisión documental, sino que también ofrece un enfoque para la conservación de la *Cattleya trianae* y la protección de su invaluable legado genético en los ecosistemas donde habita.

En este sentido, este proceso se lleva a cabo en condiciones controladas dentro del laboratorio de biotecnología, que cuenta con los recursos necesarios para llevar a cabo esta práctica de manera óptima. La preservación de condiciones asépticas en el laboratorio es esencial para la desinfección eficiente de posibles microorganismos que podrían tener un impacto adverso en el proceso. La aplicación de esta técnica no solo proporciona una ventaja significativa para la conservación de la semilla durante diversos estadios de crecimiento, sino que también permite explorar su

contribución potencial a la biodiversidad en el contexto más amplio del ecosistema, además, según (Zettler et al., 2001 y Salazar et al., 2013, como se citó en Flores et al., 2017) confirman que esta técnica “facilita la germinación y propagación de la mayoría de orquídeas, ya que se lleva a cabo en condiciones de asepsia, en presencia de una fuente de nutrientes y condiciones físicas controladas, lo que potencializa su capacidad de reproducción y crecimiento”. (p.2)

Por otro lado, este estudio fortalece mi formación docente en investigación en torno a la biotecnología vegetal, específicamente en el cultivo de tejidos de orquídeas. A través de este proceso, he tenido que planificar, organizar la información, analizar, experimentar, comparar y sistematizar los resultados en un manual. Este manual tiene como objetivo la divulgación de elementos esenciales sobre el cultivo de tejidos in vitro de *Cattleya trianae*, en relación con la técnica de embriogénesis directa, a la comunidad académica

4. ANTECEDENTES

A continuación, se presenta la revisión documental a nivel internacional, nacional y local de trabajos de grados, artículos científicos y manuales vinculados con dos categorías claves para la presente investigación: cultivos de tejidos in vitro de orquídeas y estrategias de divulgación científica de los mismos.

4.1 Cultivos de tejidos in vitro de orquídeas

Torres (2019), en su trabajo titulado "*Establecimiento de una metodología para Embriogénesis somática de la orquídea Drácula Vampira*" tuvo como objetivo estandarizar la embriogénesis somática de la orquídea Drácula. Para ello, utilizó plantas de 2 a 3 años y protocormos in vitro; algunas hojas de estos materiales fueron sometidos a 8 protocolos de desinfección para escoger el mejor que permitiera el desarrollo de la planta y evitara la contaminación del material. Se evaluaron la supervivencia y contaminación de los explantes, y se identificaron los mejores tratamientos efectivos mediante los análisis estadísticos utilizando ANOVA y la prueba de rangos múltiples de Duncan. Entre los resultados, se encontró que no hubo contaminación en ninguno de los tratamientos y que el tratamiento 7 (hipoclorito de sodio al 0.5% por 20 minutos) fue más efectivo con un 0% de explantes oxidados. En cuanto a la formación de callo de cicatrización en segmentos foliares se encontró que solo un pequeño porcentaje de explantes desarrolló callo embriogénico, y la mayoría no sobrevivió. Por último, en el desarrollo de callo embriogénico en protocormos, se observó una variedad en el peso fresco de los callos dependiendo de los tratamientos, y se logró la formación de embriones somáticos en algunos casos. La caracterización histológica reveló la evolución de las células y tejidos a lo largo del proceso de cultivo, incluyendo la formación de embriones somáticos y brotes foliares. En conclusión, el tratamiento 7 garantizó la supervivencia y desinfección efectiva de los explantes provenientes de las hojas de *Drácula vampira* y se observó que las secciones foliares no respondieron

positivamente a la aplicación de reguladores. Este estudio proporcionó información importante de la propagación in vitro de esta especie en Ecuador.

Flores, Robledo y Jimarez. (2017), en la investigación titulada “*Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de orquídeas*”, tuvieron como objetivo evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo y el uso de sustratos como sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de *Laelia anceps Lindl.* y *Epidendrum sp.*, con el fin de optimizar las condiciones de cultivo y reducir los costos asociados a esta técnica. Este estudio examinó diferentes sustratos y medios para el crecimiento in vitro de brotes adventicios incluyendo sales nutritivas MS al 50% y 100%, sacarosa, AG3, agar y mezclas de perlita-tezontle y fibra de coco-tezontle. Estos brotes se cultivaron en frascos limpios y se incubaron a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 16 horas. Se realizaron evaluaciones regulares de la longitud del brote, el número de hojas, el número de raíces y el peso fresco. El diseño del experimento fue completamente aleatorio con tres factores y para comparaciones, se utilizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey. En los resultados presentados por los autores, las orquídeas cambiaron con el tratamiento *Laelia anceps Lindl.* tuvo un mejor crecimiento en longitud del brote después de 45 días, mientras que *Epidendrum sp.* tuvo una respuesta más rápida al principio, pero *L. anceps* superó a la otra especie en etapas posteriores. Al principio, el perlita-tezontle fue efectivo en cuanto a los sustratos, pero el agar fue más efectivo a largo plazo. Los que tenían menos concentrados produjeron hojas similares, pero con menos raíces que los más concentrados. En resumen, el uso de medios de cultivo diluidos y sustratos en lugar del agar fue más efectivo y menos costoso para propagar ambas especies in vitro. En conclusión, al tener menos concentración de AG3 y sustratos, se evidenció un crecimiento eficiente de plantas de *L. anceps Lindl.* y *Epidendrum sp.*, comparable o incluso superior al método tradicional de cultivo con agar. El uso de sales diluidas sin AG3 y la sustitución del agar por sustratos mejoraron el crecimiento in vitro de las orquídeas, además de reducir los costos de producción de las plantas propagadas.

Pérez y Castañeda (2016), en el artículo científico “*Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ*” presentaron como objetivo “determinar las condiciones nutritivas para la germinación asimbiótica y el crecimiento in vitro de las orquídeas silvestres nativas *Epidendrum oxypetalum*, *Epidendrum chioneum*, *Epidendrum nocturnum*, *Oncidium pyramidale* y *Cyrtorchilum revolutum*”; en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Rama Científica del Jardín Botánico de Bogotá. Para ello, recolectaron cápsulas que se esterilizaron y se sembraron en dos medios de cultivos. El primero fue para germinación asimbiótica (germinación de semillas) que contiene sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) reducidas en un 50% (MS al 50%), enriquecido con mio-inositol, niacina, piridoxina, tiamina, glicina, sacarosa, carbón activado, canela en polvo, pulpa de banano, agar y opcionalmente con suplemento de ácido indol butírico (AIB) a 2.5 mg/L denominaron TG1 y TG2 dependiendo de la presencia o no de AIB. El otro medio de cultivo para el crecimiento in vitro a partir de protocormos se cultivaron en tres medios (TC1, TC2 y TC3), este posee sales MS al 50% y mio-inositol, niacina, piridoxina, tiamina y glicina. Para TC1 solo cambia la pulpa de Banano, para TC2 no tiene pulpa, pero si tiene bencilaminopurina, en el TC3 no posee ninguna de los dos anteriores. Los investigadores monitorearon la germinación de semillas durante dos meses y evaluaron el crecimiento de protocormos. Con respecto a la prueba usada para el análisis estadístico, se aplicó un diseño al azar para cada paso. Se realizó la transformación arco seno para las germinaciones registradas la última semana para normalizar los datos y establecer la homogeneidad de las varianzas. Luego, se utilizó el programa estadístico SAS 9.0 para someter los datos a un análisis de varianza ANOVA con la prueba de rangos múltiples de Duncan con una confianza del 95%, para determinar el efecto de los medios de cultivo. Entre los resultados se encontró que todos los medios de cultivo probados son favorables para la germinación de la mayoría de las especies estudiadas, con excepción de *E. oxypetalum*, cuyas semillas inmaduras no respondieron a los tratamientos experimentales, observándose que el mejor medio para germinar contenía la combinación específica de sales inorgánicas, mio-inositol, niacina, piridoxina, tiamina, glicina, sacarosa, pulpa de banano y carbón activado sin reguladores del

crecimiento. Por otro lado, el crecimiento in vitro de protocormos indujo la adición de pulpa de banano al medio de cultivo, sobresaliendo la combinación de composición MS al 50%, mio-inositol, niacina, piridoxina, tiamina, glicina, sacarosa, canela en polvo, carbón activado y pulpa de banano. Se determinó que los protocormos de *E. nocturnum* y *O. pyramidale* en crecimiento in vitro mostraron un mejor crecimiento en cuanto a longitud apical con un medio de cultivo que contenía MS al 50%, mio-inositol, niacina, piridoxina, tiamina, glicina, sacarosa incluido a 30 g/L, carbón activado, canela en polvo y pulpa de banano y, este último sin adición de ningún regulador del crecimiento. Además, se observó que el medio de cultivo con pulpa de banano estimula el crecimiento in vitro de protocormos y se determinó que el medio de cultivo con la siguiente composición MS al 50%, mio-inositol, niacina, piridoxina, tiamina, glicina, sacarosa incluido a 30 g/L, carbón activado, canela en polvo y pulpa de banano, es el más adecuado para el crecimiento en longitud apical en las especies *E. nocturnum* y *O. pyramidale*. En conclusión, el medio de cultivo MS modificado, junto con pulpa de banano y sin reguladores del crecimiento, resultó efectivo para la germinación asimbiótica de *E. chioneum*, *O. pyramidale*, *C. revolutum* y *E. nocturnum*, así como para su crecimiento in vitro en términos de longitud apical. Los resultados nulos en *E. oxysepalum* resaltan la importancia de la madurez fisiológica de las semillas

Cazarez. et al. (2016), en el artículo llamado "*Propagación in vitro de la orquídea Prosthechea citrina (La Llave & Lex.) W.E. Higgins nativa del estado de Durango, México.*" Tuvieron como objetivo la aplicación de técnicas o metodologías para propagar de una forma rápida y eficiente de la orquídea para aumentar su productividad sin afectar el entorno natural. El estudio se realizó en "La Puerta" de Durango, donde se recolectaron semillas maduras de tartrazina para cultivo in vitro. Utilizaron el medio MS que contenía además las hormonas BAP/ANA para la organogénesis y el enraizamiento. Los autores, utilizaron un diseño experimental de bloques al azar para evaluar los efectos del BAP/ANA en concentraciones de 0.1-1.0 y 0.3-3.0- mg/L respectivamente y los resultados fueron analizados mediante la prueba de Duncan en InfoStat 2008. Entre los resultados, se encuentran que las concentraciones de 1.0 a 3.0 mg/L se logró el proceso de brotación. Durante la etapa

de organogénesis mostraron hasta 6,75 germinaciones por explante. No se observaron diferencias significativas en el número de hojas y raíces entre los tratamientos. En cuanto a elongación y enraizamiento, la concentración de ANA 3.0/BAP 0.3 mg/L mostró mayores longitudes de hojas y raíces con un promedio de 20.6 mm y 38.27 mm respectivamente. Durante el proceso de aclimatación en invernadero se encontró que el sustrato S3 fue el más adecuado porque en el 85% de plántulas, aparecieron nuevos brotes y nuevas raíces. En conclusión, se estableció un protocolo de propagación in vitro mostrándose las mejores combinaciones entre BAP y ANA para la formación de hojas y raíces en las plántulas.

Barbery y Morales (2011) en su investigación "*Manual para el cultivo In Vitro de la Orquídea Cattleya nobilior; flor símbolo de Concepción*" tuvieron la intención de presentar un manual a la comunidad académica las técnicas para la multiplicación de las orquídeas. Este manual menciona las generalidades de las orquídeas, la siembra de las semillas en el laboratorio y en la casa, presentan diferentes medios de cultivos como el Knudson C. y caseros (plátano, tomate y su combinación) que permiten el desarrollo de la especie trabajada. El procedimiento detallado para el cultivo técnico de plantas en laboratorio muestra cómo llevar a cabo el proceso adecuadamente, incluyendo los resultados del desarrollo de la germinación y el crecimiento de las raíces de la planta. Esto se traduce en un crecimiento saludable de la orquídea en condiciones óptimas. En conclusión, presentan generalidades de las características de la especie y como llevar a cabo el cultivo in vitro de orquídea desde la introducción de la semilla hasta plántulas en viveros.

Francisco (2008) en su trabajo de maestría titulado "*Propagación In Vitro y establecimiento en invernadero de las Orquídeas Trichocentrum carthagenense (Jacq.) Sw y Laelia eyermaniana Rchb. f., Para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable*", tuvo como objetivo "estudiar algunas condiciones de regeneración in vitro y ex vitro de las orquídeas silvestres: *Trichocentrum carthagenense* (Jacq.) Sw y *Laelia eyermaniana* Rchb. f., para su conservación y potencial desarrollo. En su metodología utilizó cápsulas en madurez fisiológicas y

sembró las semillas distribuidas de forma homogénea en medios de cultivos con Murashige y Skoog (Ms) al 50%, suplementado con sacarosa 30g/L, carbón activado 0.5 g/L, agar 8 g/L, estos medios se incubaron a 25 + 1°C con un fotoperíodo de 16h luz e intensidad lumínica de 46 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de lámparas fluorescentes de 74 W a una altura de 50 cm. Realizó evaluación en la semillas en su proceso de germinación, basándose en las características como la del desarrollo y madurez de las estructuras vegetales con las descripciones y criterios realizadas por diversos autores y posteriormente los pasó a ex vitro. Entre los resultados relevantes encontró que después de los 5 meses de siembra se comenzó a evidenciar en ambas especies los estadios de desarrollo en protocormo y plántulas; además, al traspasarlas a un medio nuevo estas continuaban germinando. Adicionalmente, el patrón de desarrollo de la *T. carthagenense* fue asincrónico en cambio en la otra especie fue sincrónico. En ambos alcanzaron los 7 estadios hasta llegar a pasarlas a ex vitro, en este último paso la supervivencia para *T. carthagenense* fue de 53% en fibra de coco y en supervivencia acumulada tuvo un valor de 87%, y en cuanto a su mortalidad se registraron 100% en todos los sustratos y en plantas pequeñas, pero para la vermiculita 31, 2%. Respecto a *L. eyermanianiana* en hoja de palma y vermiculita no hubo sobrevivientes, pero en fibra de coco las plantas medianas un 50%. La mayor supervivencia se registró en plantas medianas con un 25% en fibra de palma y la mayor supervivencia acumulada total de 46,8%. En conclusión, el desarrollo de las dos especies se presentó desde el estadio 1 hasta el 7, se obtuvieron masas embrionarias somáticas lo cual garantiza mayor propagación masiva y supervivencia de las orquídeas. La metodología fue eficiente y los resultados en el presente trabajo muestran una alternativa de la micropropagación masiva de las orquídeas que están amenazadas o en vía de extinción.

Todos los antecedentes mencionados anteriormente, han sido fundamentales para el desarrollo del presente trabajo de grado. La revisión exhaustiva de artículos científicos, páginas web, trabajos de grado y manuales publicados por diversas entidades ha sido de gran ayuda para obtener información detallada sobre el cultivo de tejidos in vitro, en particular sobre la embriogénesis directa. Esta recopilación de

referentes teóricos ha sido esencial para la metodología porque proporcionan las bases necesarias para la realización de los protocolos de asepsia y la preparación de medios de cultivo específicos para el cultivo de tejidos in vitro de las orquídeas.

Además, permitieron identificar las limitaciones y desafíos encontrados por otros investigadores en el campo del cultivo de tejidos in vitro de orquídeas, lo que ha orientado la presente investigación hacia posibles soluciones y mejoras. Asimismo, el análisis crítico de la literatura existente ha ayudado a contextualizar el estudio en el marco de la conservación de especies de orquídeas en peligro de extinción, destacando la importancia del cultivo de tejidos como una herramienta clave para su preservación. En resumen, estos permitieron orientar y fundamentar el presente trabajo para contribuir al avance del conocimiento en el área del cultivo de tejidos de orquídeas.

4.2 Estrategias de divulgación científica de los cultivos de tejidos in vitro

Castiblanco (2024), en su trabajo de grado titulado: “*Diseño de una propuesta educativa por medio de cultivo de tejido de *Espeletia spp* que permita potenciar el desarrollo de habilidades científicas para estudiantes del grupo de biotecnología del Colegio Cafam.*” tuvo como propósito generar una propuesta educativa utilizando el cultivo de tejido de *Espeletia spp* para potenciar el desarrollo de habilidades científicas a estudiantes de Cafam. Aplicó en su metodología el paradigma hermenéutico interpretativo y enfoque cualitativo. La propuesta la dividió en 4 etapas; contextualización, estandarización de protocolos para el cultivo de tejidos in vitro de *Espeletia spp* y su paso a ex vitro, actividades con los estudiantes y el diseño del manual: del Páramo al laboratorio: Cultivando Frailejón. Los resultados de la investigación muestran que el medio de cultivo MS1 (1a, 1b) fue más efectivo en comparación con los medios MS 2 y MS3 ya que promovió la gelificación, una mayor germinación, crecimiento y desarrollo de los embriones y plántulas en contraste a los medios 2 y 3 que mostraron una pérdida gradual de gelificación con el tiempo, lo que dificultó que las semillas mantuvieran la estabilidad necesaria para absorber los nutrientes. Por otro lado, los medios MS4 y MS5, que contenían carbón activado,

demonstraron ser los más efectivos, favoreciendo la germinación, el crecimiento y el desarrollo de las plantas. En particular, el medio MS 5, que también incluía Pedialyte, mostró resultados superiores en términos de velocidad de crecimiento. Estos hallazgos sugieren que el uso de medios de cultivo con carbón activado puede ser crucial para mejorar el éxito del cultivo in vitro de *Espeletia spp*. En cuanto a su paso ex vitro sugiere seguir investigando sobre la germinación y propagación ex situ porque se ve un bajo porcentaje de viabilidad de sus semillas. Con respecto a la actividad teórico-práctica implementada permitió a los estudiantes desarrollar destrezas en el uso de instrumentos y equipos de laboratorio, así como habilidades científicas de observación, análisis y síntesis al realizar las siembras y dar seguimiento a las semillas en los medios de cultivo; además las actividades de escritura reflexiva y mapas conceptuales permitieron evidenciar el aprendizaje sobre la temática. Y por último presento el diseño un manual sobre las generalidades del frailejón, preparación de los medios y paso a ex vitro utilizando Canva. En conclusión, el autor menciona que el medio MS 5 que contenía carbón activado y Pedialyte fue el más eficaz para el crecimiento de embriones, pero sólo el 6,09% de las semillas se convirtieron en plántulas y que el material educativo “DEL PÁRAMO AL LABORATORIO: Cultivando *Espeletia spp* (FRAILEJÓN) se diseñó con propósito de divulgar la introducción de semillas y embriones procedentes de campo de *Espeletia spp* a cultivo in vitro y paso a ex vitro; al igual que generalidades de este género y el desarrollo de habilidades científicas.

Camargo (2023), en su trabajo de grado titulado “*La Ilustración Como Estrategia Para La Divulgación del Crecimiento In Vitro Del Arándano Azul en Pro de Fortalecer La Alfabetización Científica*” para ello empleó el paradigma hermenéutico interpretativo, el enfoque mixto y su diseño metodológico la planteo en 3 fases: la primera fue la contextualización que consta de una revisión exhaustiva sobre cultivo de material vegetal in vitro de arándanos, ilustración científica y generalidades, la segunda fue de experimentación la cual se dividió en dos momentos: selección de tipos de explantes, protocolos de desinfección y composición de los medios de cultivo. La tercera fue la del diseño de un manual ilustrativo presentando elementos

como introducción, generalidades, importancia de los arándanos, proceso de asepsia y de cultivos in vitro entre otros. En los resultados, el autor presentó una revisión documental con respecto a la alfabetización científica, la enseñanza de cultivo de tejidos (cultivo in vitro) y la ilustración. La fase experimental incluyó la selección del material vegetal, la desinfección con protocolos específicos y la utilización de cinco tipos de medios de cultivo. La micropropagación en el medio de cultivo 1 demostró ser eficaz, promoviendo el desarrollo de brotes y sistema radicular. Se implementaron con éxito procesos de embriogénesis y organogénesis y además, diseñó un "Manual Ilustrativo sobre el Cultivo In vitro del Arándano" como recurso educativo en Canva. En conclusión, el autor menciona que la micropropagación del arándano in vitro en el medio WPM con 2 ml/L de hormona 2 IP fue eficaz. Con relación a la embriogénesis, el protocolo 1 de desinfección y el medio 1 facilitaron la germinación en dos meses. Y con respecto a la organogénesis, a pesar de la eficiencia del protocolo 1, solo el 10% de los tallos en el medio 1 no presentaron necrosis. Además, resalta la relevancia del material educativo diseñado para la alfabetización científica en el cultivo in vitro de arándanos mediante ilustraciones.

Loaiza y Oliveros (2021) en el trabajo de investigación denominado "*Diseño de un material didáctico web para la enseñanza de cultivo de tejidos en orquídeas que permita el desarrollo de habilidades científicas en estudiantes de grados octavo y noveno*" haciendo uso de las TIC en el ámbito educativo presentaron un material didáctico web titulado "Cultivemos conocimiento a través de las orquídeas", este muestra la enseñanza del cultivo de tejidos vegetales y su relación con los documentos guía establecidos por el Ministerio de Educación Nacional para grados octavo y noveno: Derechos Básicos de Aprendizaje: Ciencias Naturales, Estándares Básicos de Competencias en Ciencias Naturales y Lineamientos curriculares en Ciencias Naturales y Educación ambiental del MEN. En su metodología emplean un paradigma hermenéutico y un enfoque cualitativo, donde realizaron una revisión documental como técnica de investigación y recopilación de datos de diversas fuentes como artículos científicos y libros. La población estudiada fueron

estudiantes de octavo y noveno grado de educación secundaria. El diseño metodológico se dividió en tres fases: contextualización, diseño del material didáctico web contenía cuatro módulos y la validación del material educativo con especialistas. Entre sus resultados, se identificaron varios factores que inciden en la enseñanza del cultivo de tejidos vegetales en las escuelas, incluyendo la falta de incentivos educativos para los docentes, su ausencia en los planes de estudio, y limitaciones en la infraestructura y los materiales de laboratorio. También se realizó un análisis exhaustivo de diferentes protocolos de cultivo de tejidos de orquídeas, seleccionando el más eficaz para su publicación en la página web. Esto se hizo con el objetivo de fomentar el desarrollo de habilidades científicas, como la observación, el análisis y la comunicación. Además, se diseñó un material educativo dividido en cuatro módulos: el primero aborda aspectos generales, morfológicos, de diversidad y distribución de las orquídeas; el segundo se centra en su importancia y estado de conservación, considerando aspectos ecológicos y socioeconómicos; el tercero detalla las condiciones físico-químicas y los parámetros necesarios para el cultivo de tejidos en orquídeas; y, finalmente, el cuarto módulo aborda el cultivo de tejidos en sí, tanto en su fase in-vitro (introducción y multiplicación) como en la fase ex-vitro (adaptación o aclimatación). La validación se hizo mediante una rúbrica evaluativa con cinco maestros de diferentes instituciones educativas, evaluando aspectos como la calidad del contenido, la motivación, el diseño y presentación, la usabilidad y accesibilidad y el valor educativo del material. Entre las conclusiones las autoras mencionan que este recurso educativo se creó como estrategia para mejorar la enseñanza de la biotecnología vegetal, especialmente en contextos de crisis sanitaria y está dirigido a estudiantes de octavo y noveno grado, el material abarca conceptos sobre orquídeas, conservación, cultivo de tejidos y prácticas de laboratorio, utilizando recursos como imágenes, videos y juegos para fomentar el aprendizaje interactivo. Los módulos diseñados tienen como objetivo desarrollar habilidades científicas, incluso en entornos con recursos limitados. La validación del material recibió una alta calificación, destacando su importancia y relevancia para la población objetivo.

Florian (2019) en su trabajo de grado *“Diseño de Una Unidad Didáctica Sobre Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro Que Permita La Enseñanza de Conceptos Relacionados Con El Desarrollo de Las Plantas, Para Estudiantes del Grupo De Biotecnología Del Colegio Cafam”* aplicó una metodología basada en el paradigma hermenéutico interpretativo y un enfoque cualitativo para diseñar una unidad didáctica en el campo de la biotecnología. El trabajo se dividió en tres fases: contextualización mediante revisión documental, diseño de la unidad con secciones para docentes y estudiantes, y la evaluación y validación tanto con estudiantes como con docentes del área de biología. En los resultados se evaluaron mapas mentales de 10 estudiantes de biotecnología sobre cultivo in vitro, y la mayoría resultaron ambiguos. En el laboratorio, los estudiantes demostraron comprender la importancia teórica de la asepsia en el cultivo in vitro, pero tuvieron dificultades en su aplicación práctica, causando contaminación. A pesar de algunos problemas, la unidad didáctica diseñada recibió una buena calificación de expertos. En general, se resalta la relevancia de las actividades prácticas en la enseñanza de ciencias. En conclusión, se creó una unidad didáctica para enseñar conceptos botánicos sobre cultivos de tejidos vegetales in vitro. Esta unidad se implementó con estudiantes de biotecnología, generando interés y ampliación de conocimientos. Los estudiantes la calificaron positivamente, al igual que los docentes de biología. La unidad se ve como un recurso valioso para la enseñanza de biotecnología y el desarrollo de habilidades cognitivas.

Varela., et al. (2017), en el artículo llamado: *“Desarrollo de material didáctico multimedia del cultivo de tejidos vegetales con aplicaciones agrarias y ambientales”*. tuvieron como objetivo explorar el uso de tecnologías digitales para mejorar el aprendizaje autónomo en áreas agrarias y ambientales, mediante el desarrollo y evaluación de un Material Didáctico Multimedia (MDM) para el aprendizaje de prácticas en laboratorios de cultivos vegetales. Los autores aplicaron la metodología de Ingeniería de Software Educativo (MeISE) propuesta por Abud (2009) para permitir que los usuarios (educadores y estudiantes) logran un aprendizaje

autónomo. Además, realizaron una entrevista a los estudiantes de Tecnología Agropecuaria y Licenciatura en Producción Agropecuaria con especialidad en Biotecnología y Propagación Vegetal de los semestres VII y VIII; donde las preguntas se centraron en identificar temas difíciles, los tipos de materiales de aprendizaje que les gustaría utilizar y aspectos del curso que mejorarían. También, examinaron el material educativo existente sobre el desarrollo de temas en los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales. El objetivo de este análisis fue conocer el contexto de uso del laboratorio virtual, teniendo en cuenta indicadores como el grupo objetivo, los temas de contenido, los principios pedagógicos aplicables y los patrones de uso de la aplicación. Entre sus resultados, se evidenció que el desarrollo de software educativo para el aprendizaje de técnicas en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales representa un avance significativo en la enseñanza de la biotecnología agrícola. Este fue diseñado para facilitar la adquisición de conocimientos y destrezas en estudiantes y educadores. Además, los usuarios pueden comprender conceptos complejos y desarrollar habilidades metacognitivas. Por último, este Material Didáctico Multimedia (MDM) fue elaborado con elementos de morfología e histología vegetal, logrando una experiencia exitosa al permitir al educando interactuar con el laboratorio de forma virtual sin perder la complejidad de la realidad. En conclusión, los autores mencionan que el uso de las tecnologías mejora la usabilidad y la experiencia en cuanto al aprendizaje sobre el cultivo de tejidos vegetales, debido a que la sincronización de animaciones, simulaciones y contenidos digitales, junto con la disponibilidad en la web, amplía el acceso a las temáticas estudiadas y mejora el rendimiento de los estudiantes en este campo.

Como se mencionó en los antecedentes, es importante destacar que la recopilación y revisión exhaustiva de información proporcionaron elementos clave para la construcción de un manual educativo. Estos recursos incluyeron manuales y el uso de tecnologías de la información y comunicación (TIC), que no solo brindan información detallada sobre el cultivo de tejidos vegetales, sino que también permiten una comunicación efectiva sobre esta técnica. Además, se identificaron

estrategias para mejorar la divulgación científica, como el uso de fotografías, textos cortos y otros recursos visuales e interactivos en línea. Estos hallazgos son fundamentales para la creación de un manual educativo que sea informativo, atractivo y accesible para el público objetivo.

5. MARCO TEÓRICO

En este apartado se presentan diferentes investigaciones encontradas en artículos, trabajos de pre y posgrado, relacionados con los elementos estructurantes: Las orquídeas y sus generalidades, cultivos de tejidos y divulgación científica.

5.1 Las orquídeas

5.1.1. Generalidades de las orquídeas

Las orquídeas son integrantes de la familia botánica Orchidaceae, conforman una asombrosa diversidad de entre 25 mil y 30 mil especies, así como posiblemente otros 6 mil híbridos. Su presencia se extiende por todo el planeta, si bien alcanzan su máxima abundancia en las regiones tropicales y cálido-húmedas. Este vasto grupo botánico, con su adaptabilidad a diversos entornos, revela una fascinante variedad que abarca desde hábitats montañosos hasta exuberantes selvas tropicales (Menchaca, 2011).

Por otra parte, cuando se habla de la historia de las orquídeas en Colombia, particularmente la *Cattleya trianae*, está estrechamente ligada a su uso. Según Castellanos y Torres (2018) “A fines del siglo XVIII y durante el siglo XIX, destacados exploradores como José Celestino Mutis, José Jerónimo Triana y exploradores europeos contribuyeron significativamente al conocimiento de estas plantas en el territorio colombiano” (p.19). Para el inicio del siglo XX, se había registrado más de 1,000 especies de orquídeas en el país, ganando renombre mundial por sus grandes flores, colores variados y formas diversas. Sin embargo, durante el auge de la recolección de orquídeas tropicales en Europa en el siglo XIX, se ejerció una intensa presión sobre las poblaciones silvestres, con prácticas poco éticas que

llevaban a la destrucción de bosques y poblaciones enteras de orquídeas (Castellanos y Torres, 2018).

La extracción de estas plantas, enviadas en grandes cantidades a Europa, tuvo consecuencias negativas, ya que la mayoría no sobrevivía al viaje debido a la falta de conocimiento sobre su biología. A partir de 1921, con el desarrollo de técnicas de propagación in vitro, se logró disminuir la extracción masiva de orquídeas. A pesar de la veda nacional de 1977, la actividad persiste y, aunque el cultivo de orquídeas tiene representantes destacados en Colombia, aún no ha alcanzado su potencial comercial completo. La extracción de plantas del medio silvestre y la amenaza de extinción persisten para algunas especies carismáticas (Castellanos y Torres; 2018).

Sin embargo, retomando al principio de la historia de la orquídea, esta planta pertenece a la familia *Orquidáceae* y a la clase *monocotiledóneas* que se caracterizan por una gran diversidad de flores, colores y aromas, además de las interacciones ecológicas que presentan con los agentes polinizadores y con hongos con los cuales forman micorrizas (Lecoufle, 2005). Según Linden & Rchb (1860) la *Cattleya trianae* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Clasificación taxonómica.

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Género: Cattleya

Epíteto específico: trianae

Especie: *Cattleya trianae*

Autor: Linden & Rchb. f.

5.1.2 Morfología de la orquídea *Cattleya trianae* (flor de mayo)

Las flores de las orquídeas (Figura 1) según Castellanos (2018) son “mayormente hermafroditas (ambos sexos en la misma flor), zigomorfas (con un solo plano de simetría) y trímeras (al tener tres sépalos y tres pétalos), con un pétalo modificado llamado labelo; de una amplia variedad de formas, colores y ornamentaciones” (p.29). Además, “las flores poseen un ginostemo donde se encuentran tanto las estructuras reproductivas masculinas (estambres) como las femeninas (pistilos). Los estambres y pistilos pueden estar total o parcialmente unidos, y en la mayoría de las orquídeas solo un estambre es fértil” (Castellanos, 2018. p.29). Asimismo, Lecoufle 2007, (como se citó en Castellanos, 2018) afirman que presentan un rostelo que evita la autopolinización y facilita la adhesión del polen a los polinizadores; los granos de polen están agregados en másulas llamadas polinios (p.29). A continuación, en la figura 1 se presenta la flor de la *C. trianae* con sus partes.

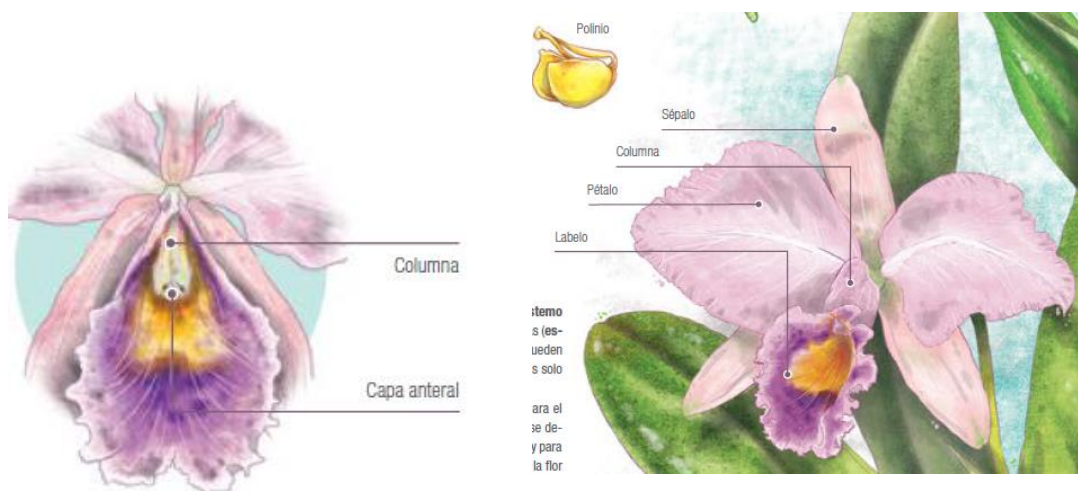


Figura 1. Flor de *Cattleya trianae*. Imagen tomada de orquídeas de Cundinamarca, conservación y aprovechamiento sostenible.

Las hojas de las orquídeas son simples, no presentan divisiones, los márgenes son enteros y no tienen aserraduras ni espinas, por lo general son alargadas y angostas, las cuales se conservan durante muchos años. Las hojas de especies que viven en lugares muy calurosos son cilíndricas, lo que evita que se deshidraten rápido (Menchaca, 2011).

Los frutos de las orquídeas son cápsulas (Figura 2) de aspecto verde y consistencia fuerte, “se estima que una cápsula de *Cattleya* puede contener entre 200.000 y 600.000 semillas” (Sociedad Colombiana de Orquideología op cit) y solamente una porción bastante reducida de éstas germina las cuales son dispersadas principalmente por el viento cuando la cápsula se rompe. Las semillas casi no tienen sustancias de reserva y requieren asociarse obligadamente con un hongo micorrízico para poder germinar (Arditti y Ghani 2000, Valencia 2014).



Figura 2. Cápsula de *C. trianae*. Imagen toda de orquídeas de Cundinamarca, conservación y aprovechamiento sostenible. (p.30).

En cuanto a los tallos pueden ser de tres tipos principales: los tallos cilíndricos son alargados y erectos, semejantes a carrizos con entrenudos de donde salen las hojas e inflorescencias, los pseudobulbos son aéreos, engrosados, comprimidos y abultados en forma de papa. Por último, están los cormos que son subterráneos gruesos, casi esféricos con entrenudos (Menchaca, et al. 2011).

Las raíces de las orquídeas aéreas están forradas por unas fundas de células muertas y esponjosas llamadas velamen. Poseen clorofila bajo esa cubierta, lo que les permite realizar la fotosíntesis, y facilita la absorción de agua y minerales, ya que estas plantas dependen para su nutrición de las lluvias periódicas, nieblas y

ramas húmedas; pueden crecer en todas direcciones y sirven para sujetarse al tronco o ramas de los árboles (Menchaca et al., 2011).

5.1.3. Importancia de las orquídeas

Aunque las orquídeas son conocidas por su belleza, varias de ellas carecen de características que las harían comercialmente atractivas y podrían pasar desapercibidas debido a su reducido tamaño para alguien que camina por el bosque. Además, ayudan con “el mantenimiento y el flujo de algunos servicios ecosistémicos, como es el aumento de la cantidad de masa vegetal en el dosel (parte alta de los bosques) y, asociada a esta, la regulación hídrica” (Castellanos., Torres. 2018. p.24), y de acuerdo con (Zotz et al. 2002, como se citó en Castellanos 2018) “las estomas de las hojas capturan y fijan CO₂ de la atmósfera por medio del proceso de fotosíntesis, siendo este uno de los gases responsables del fenómeno del cambio climático global” (p.24).

También se ha evidenciado que las orquídeas epífitas, se encuentran ubicadas en la parte superior de los bosques y funcionan como una barrera que intercepta la neblina y las nubes a baja altitud, provocando un incremento en la precipitación local y, por ende, una reducción en el volumen y en la influencia del escurrimiento del agua. Este proceso, a su vez, contribuye a disminuir la erosión y facilita la retención e infiltración del agua en el suelo. Luego, se crea un gradiente de humedad y evapotranspiración lo que ayuda a que se enfríe el dosel y la condensación del agua (Stuntz et al. 2002 como se citó en Castellanos, 2018). Por otro lado, existe una contribución ecosistémica ya que hay “un gran número de hongos formadores de micorrizas orquidiodes, las cuales tienen funciones importantes en el ciclo de nutrientes.” (Castellanos., Torres. 2018. p.24). Adicionalmente ayudan a dar refugio y alimento a una gran cantidad de organismos, como es el caso de hormigas, abejas, avispas, mariposas, aves (por ejemplo, colibrí) y mamíferos (por ejemplo, murciélagos) (Ospina 1996).

En cuanto a los hábitos de crecimiento, “la mayoría son epífitas y viven sobre otros árboles (no son parásitas); algunas son terrestres, otras son rupícolas o litófitas al vivir sobre rocas, y algunas pocas especies son acuáticas, pues viven asociadas a fuentes de agua” (Catellanos, 2018. p.29). Considerando la crucial importancia de las orquídeas epífitas en los ecosistemas, se torna esencial la implementación de medidas efectivas para su conservación. Estas plantas, estratégicamente ubicadas en la cima de los bosques, desempeñan un papel fundamental al interceptar neblina y nubes a baja altitud, generando un impacto positivo en la precipitación local y reduciendo el volumen de escurrimiento de agua. Este proceso no solo contribuye a mitigar la erosión, sino que también favorece la retención e infiltración del agua en el suelo, promoviendo la salud general del ecosistema. Además, la presencia de hongos formadores de micorrizas orquidiodes, con sus funciones críticas en el ciclo de nutrientes, resalta la interconexión intrincada de estos organismos en la red biológica. Asimismo, las orquídeas ofrecen refugio y sustento a una diversidad de vida, desde insectos hasta aves y mamíferos, contribuyendo así a la biodiversidad y al equilibrio ecológico. La conservación de estas orquídeas no solo protege una especie en particular, sino que garantiza la preservación de servicios ecosistémicos cruciales para la salud y la sostenibilidad de nuestros ecosistemas.

5.2. Cultivo de tejidos in vitro

El cultivo de tejidos in vitro es una técnica avanzada de propagación vegetal que se realiza en condiciones de laboratorio. Este método implica el cultivo de células, tejidos u órganos de la planta en un medio de cultivo artificial, proporcionando un entorno controlado para su desarrollo. Además, este proporciona ventajas significativas, como la capacidad de propagar genotipos específicos, superar barreras de reproducción y obtener plantas en condiciones óptimas de crecimiento. Lo anterior lo afirma Sedano, et al. (2015) a continuación:

La propagación y cultivo de orquídeas experimentó una revolución gracias a las investigaciones pioneras de Knudson en 1922. Trabajando con semillas, logró su germinación en un medio básico con azúcar. Estos estudios no solo permitieron la propagación exitosa de numerosas orquídeas a partir de segmentos de hoja, nodos de plántulas germinadas in vitro, nudos florales, ápices, rizomas y secciones apicales, sino que también sentaron las bases para avances significativos en la horticultura de orquídeas (p.454).

En el ámbito del mejoramiento genético, el cultivo de tejidos in vitro ha facilitado la selección y multiplicación de individuos con características genéticas específicas, como resistencia a enfermedades, tolerancia a condiciones adversas o mejor calidad nutricional. “A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo y su manejo en espacios reducidos” (Camarena et al, 2014, p.203). Además, se ha convertido en una herramienta valiosa para la conservación de germoplasma, especialmente para especies en peligro de extinción o con baja viabilidad en su entorno natural. La posibilidad de almacenar y regenerar material genético bajo condiciones controladas ofrece una salvaguardia efectiva contra la pérdida de diversidad genética. Lo anterior lo afirma Durán & Méndez (2010):

Esta estrategia presenta ventajas diferentes a las de las colecciones vivas en campo: proporciona mayor seguridad al germoplasma en conservación (al tenerlo confinado en instalaciones seguras, en resguardo y vigilancia constantes) ante el efecto de desastres naturales y eventualidades que en campo no pueden ser controladas; mantiene el germoplasma libre de patógenos por medio de su propagación en condiciones asépticas. (p.402)

En adición, la técnica de micropropagación es una práctica que contribuye significativamente a la conservación de plantas en peligro. Dado lo anterior, Olmos (2023) afirma que esta técnica:

Es de gran importancia en la agricultura, la conservación de la biodiversidad, la producción de compuestos valiosos y la investigación científica. Su versatilidad y valor radican en su capacidad para abordar diversos desafíos relacionados con las plantas, lo que la convierte en una herramienta valiosa para beneficio de la sociedad (párr. 9).

Añadiendo a lo anterior, existen diferentes técnicas de cultivo de tejidos como: embriogénesis, organogénesis y micropropagación (figura 3). Para esta investigación se empleó la embriogénesis somática directa que implica la formación de embriones a partir de células somáticas, sin requerir la fusión de gametos. Esta capacidad de generar embriones in vitro ofrece la posibilidad de reproducir la *C. trianae* de manera rápida y controlada, contribuyendo así a su conservación y estudio

A continuación, en la figura 3 se presentan los factores físicos, químicos y biológicos necesarios para cultivo de tejidos in vitro además de las diferentes técnicas que se pueden realizar.

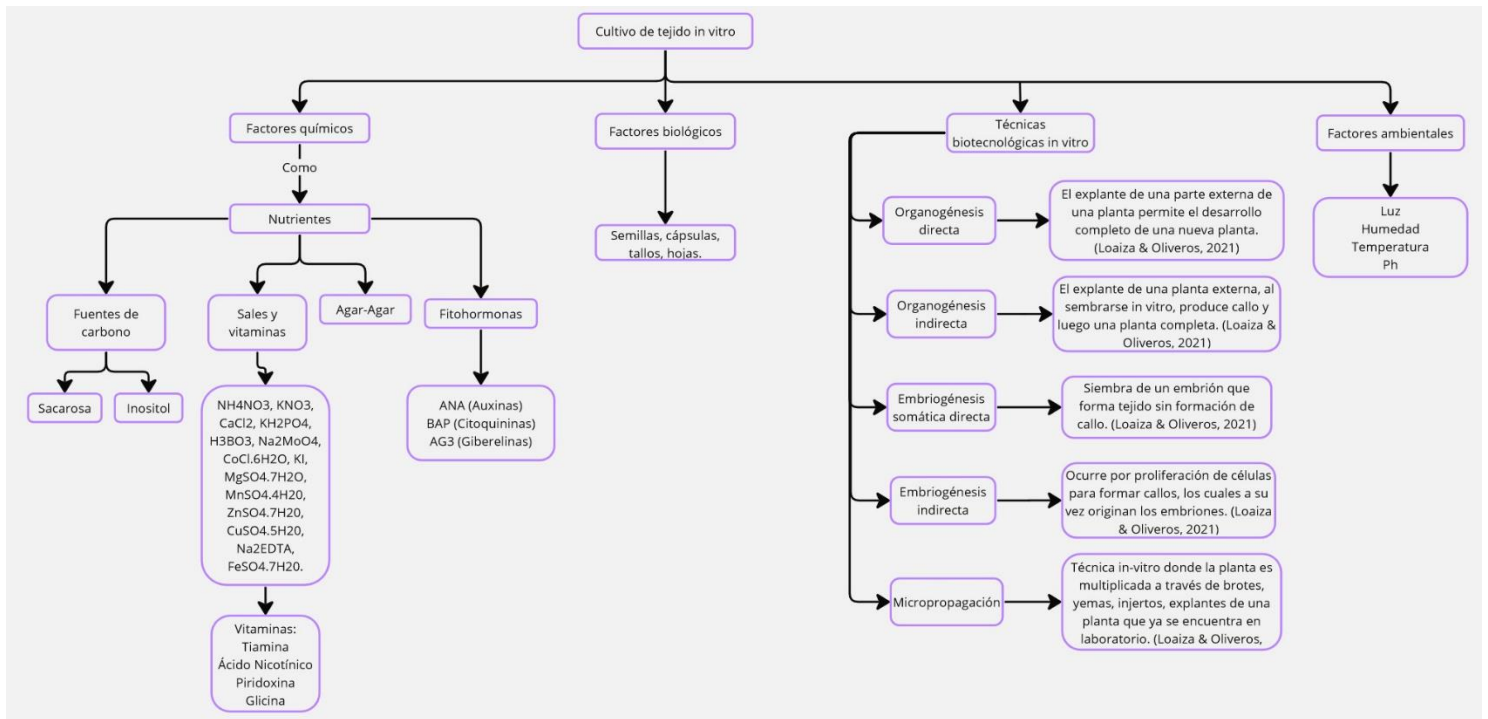


Figura 3. Cultivo de tejido in vitro. Elaboración propia.

5.3 Divulgación científica

La divulgación científica tiene un papel crucial al hacer que el conocimiento científico sea accesible y comprensible para todos. Según Sánchez (2011) “la divulgación científica es acercar la ciencia al público general, no especializado; es toda actividad de explicación y difusión de los conocimientos, la cultura y el pensamiento científico y técnico (p.92), su importancia radica en cerrar la brecha entre la comunidad científica y la sociedad, promoviendo la comprensión pública de los avances científicos y sus implicaciones. Dentro de los múltiples métodos de difusión científica de acuerdo con López (2024):

La ilustración desempeña un papel fundamental en la divulgación al proporcionar claridad visual, atraer y cautivar al público, trascender barreras culturales y estimular la creatividad. Al incorporar imágenes efectivas en el lenguaje divulgativo, podemos hacer que la ciencia sea más accesible,

interesante y relevante para todos (párr. 6). En esta situación, la creación de guías ilustradas, protocolos y manuales es una manera eficaz de comunicar información científica de manera clara y atractiva

Siguiendo esta línea, también se utiliza la fotografía porque permite acercarse más a la ciencia, es una de *“las áreas que ha estado relacionada con la imagen; la fotografía ha resultado ser una herramienta multidisciplinar de primer orden, no sólo para registrar lo que el ojo percibe, sino también, para aquello que resulta imposible de ver”* (Cancela, 2002. párr. 4) y en los últimos años la fotografía digital se ha convertido en un medio de información que despierta el interés por el conocimiento y conservación de temas relacionados con la biodiversidad, cobrando así, un lugar privilegiado en el área de la comunicación y divulgación científica (Yory, 2021).

En este sentido, la divulgación científica es necesaria en el mundo académico para poder enseñar y compartir el conocimiento, ya que los fortalece y genera mayor equidad de la sociedad que necesita comunicarse constantemente para afrontar con éxito a los problemas mundiales que azota a la humanidad (Auris., et al. 2023), además, según (Wongo et al, 2020, como se citó en Auris et al, 2023) *“la visibilidad científica tiene que ver con proporcionar alternativas de cambio al mundo desde todos los espacios digitales e impresos con el objetivo de globalizar la información e incrementar la productividad científica en el mundo construyendo un conocimiento colectivo”* (p. 469)

6. METODOLOGÍA

En la presente investigación se da a conocer la metodología que se utilizó a partir del paradigma hermenéutico interpretativo y el enfoque mixto.

6.1. Paradigma hermenéutico interpretativo y enfoque mixto.

El paradigma hermenéutico interpretativo reconoce la diferencia fundamental entre los fenómenos sociales y naturales. “Este enfoque busca resaltar la complejidad y el carácter inacabado de los fenómenos sociales, los cuales están siempre condicionados por la participación humana” (Barrero, et al., 2011, p. 106). Además, enfatiza “la descripción y comprensión de aspectos particulares y singulares de los fenómenos, en lugar de buscar generalizaciones” (Barrero, et al., 2011, p. 107). En el contexto de este estudio, este paradigma permite profundizar y contextualizar la embriogénesis directa de *Cattleya trianae*, teniendo en cuenta no solo sus aspectos técnicos sino también su significado e importancia para la conservación de la especie.

Por otro lado, el enfoque empleado en la investigación fue mixto, combinando elementos cuantitativos y cualitativos de manera complementaria. Esta elección se basó en la necesidad de fortalecer tanto los conocimientos teóricos como prácticos, lo que ofrece ventajas significativas al lograr una perspectiva más amplia. Según (Newman et al, 2002, como se citó en Hernández., et al. 2014) esta metodología proporciona una percepción más integral, completa y holística del fenómeno. Asimismo, (Chen 2006, citado en Hernández, et al, 2014) menciona que el enfoque mixto es la integración sistemática de los métodos cuantitativo y cualitativo en un solo estudio, para obtener una “fotografía” más completa del fenómeno. Este enfoque permite que las aproximaciones cuantitativa y cualitativa conserven sus estructuras y procedimientos originales. (Hernández., et al. 2014. p.534)

En cuanto al enfoque cualitativo Hernández et al. (2014) mencionan que este “se enfoca en la recolección y análisis de datos para refinar las preguntas de investigación o plantear nuevas interrogantes durante la interpretación” (p.7) y

“evidencia o da información simbólica verbal, audiovisual o en forma de texto e imágenes” (p. 9). En este sentido, se emplea este enfoque para el diseño del manual para divulgar el proceso de cultivo de tejidos in vitro de *Cattleya trianae*.

Con relación al enfoque cuantitativo Hernández et al. (2014) señalan que en este se implica "la recolección de datos para probar hipótesis mediante la medición numérica y el análisis estadístico, con el objetivo de establecer pautas de comportamiento y verificar teorías" (p. 4). En otras palabras, busca "acotar" intencionalmente la información (medir con precisión las variables del estudio, mantener un "foco") (Hernández et al., 2014). De acuerdo con esta premisa, los resultados de este estudio muestran los diferentes estadios morfofisiológicos a nivel in vitro de *C. trianae* y la estandarización de los protocolos de desinfección y medios de cultivo.

Al vincular estos enfoques con el paradigma hermenéutico interpretativo, este permite interpretar los datos recopilados de manera que se resalta la importancia de la técnica de embriogénesis directa no solo como una alternativa para conservar sino para preservarla a futuro en un banco de germoplasma.

6.2 Instrumentos y técnica de recolección de datos

Las técnicas y la revisión documental en el presente trabajo fueron sistemática y rigurosa, se incluyó una búsqueda de trabajos de grado, artículos científicos y manuales relevantes a nivel internacional, nacional y local. Las fuentes seleccionadas se centraron en dos categorías principales: cultivos de tejidos in vitro de orquídeas y estrategias de divulgación científica. Se incluyeron estudios que proporcionan información sobre técnicas de cultivo in vitro, métodos de desinfección, medios de cultivos y divulgación científica. Dicho lo anteriormente, Núñez y Villamil (2017) citado de Hurtado (2008) “afirma que una revisión documental es una técnica en donde se recolecta información escrita sobre un determinado tema, teniendo como fin proporcionar variables que se relacionan indirectamente o directamente con el tema establecido” (p.9).

Respecto a la organización de la información, se categorizaron en secciones dependiendo a su relevancia y relación con cada categoría clave del presente estudio, detallándolo con un resumen en cada antecedente el cual se destaca el título, objetivos, metodologías, resultados y conclusiones principales. Por último, se realizó un análisis para identificar similitudes y diferencias en las metodologías usadas en los estudios revisados, permitiendo establecer patrones comunes en el cultivo in vitro. Esta aproximación metodológica garantiza que el desarrollo del manual y los protocolos propuestos estén basados en evidencia científica sólida, lo que fortalece la validez y fiabilidad de los resultados obtenidos.

Además, se utilizó el diario de campo para registrar todas las observaciones y anotaciones importantes. Esto es reafirmado por Roa y Vargas (2009), citando a Rubiano (1999), quien afirma que "tiene como principal propósito que los estudiantes aprendan a registrar observaciones y experiencias de índole subjetiva y científica" (p. 82).

6.3 Contextualización del laboratorio

Los experimentos de esta investigación se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología del Colegio CAFAM, ubicado en la AK 68 #64-45, en el barrio Bosque Popular, localidad 10 de Engativá, Bogotá D.C. Este laboratorio fue elegido para el estudio debido a su enfoque especializado en el cultivo de tejidos vegetales in vitro, lo cual es fundamental para llevar a cabo el proceso de embriogénesis directa. Además, el laboratorio cuenta con las condiciones adecuadas y los recursos necesarios, incluyendo los nutrientes y medios de cultivo esenciales para el desarrollo de la especie, proporcionando un entorno controlado y adecuado para el éxito de los experimentos.

6.4 Diseño metodológico

En la figura 3 se presentan las tres fases de la presente investigación y posteriormente se detallarán

Figura 3. Diseño metodológico

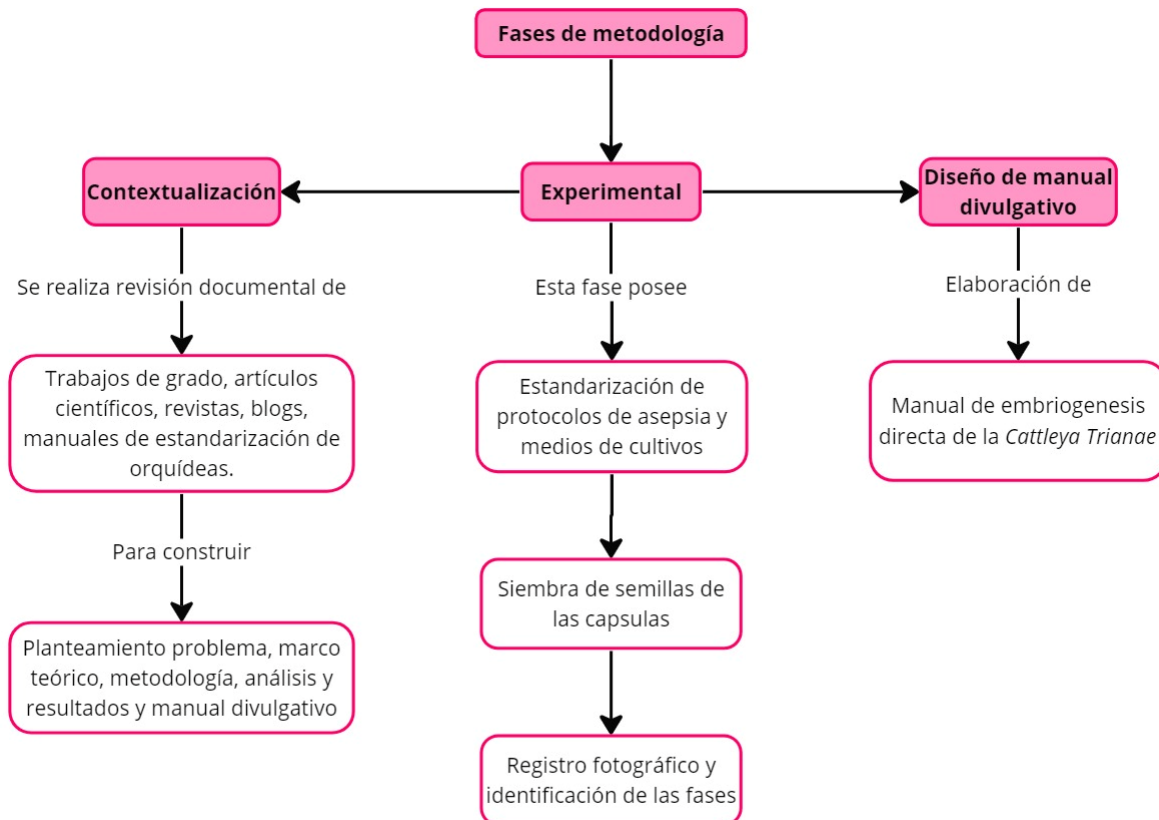


Figura 4. Fases de metodología. Elaboración propia

6.4.1. Fase 1: Contextualización

En esta fase se realiza una revisión documental de trabajos de grado y artículos asociada al cultivo de tejido in vitro mediante embriogénesis directa de la *Cattleya trianae*, generalidades de orquídeas y divulgación científica. Esto permitió la

elaboración del planteamiento del problema, antecedentes, justificación, objetivos, marco teórico y metodología.

6.4.2. Fase 2: Experimental

Durante esta fase se llevaron a cabo dos etapas fundamentales: en la primera, se procedió a la colecta de cápsulas en madurez fisiológica que fueron recolectadas en un vivero local de Santandercito, Cundinamarca. La segunda etapa consistió en la estandarización de protocolos de asepsia de la cápsula que en su interior contenía las semillas de la orquídea y adicionalmente, se realizó la siembra en dos medios de cultivo (MS) seguido del registro fotográfico, la identificación de las fases y estadios de germinación, desarrollo y madurez de las estructuras vegetales con descripciones específicas de la *Cattleya trianae* a nivel in vitro. Este seguimiento se realizó cada 15 días.

Cabe destacar que los dos medios de cultivos que se realizaron se utilizaron 20 frascos donde en cada uno se llevó a cabo la siembra, y para el traslado de las semillas ya germinadas se emplearon 10 frascos con el medio de cultivo (MS) que contenía hormonas, carbón activo y otros suplementos. (anexo 1) Todos los embriones fueron introducidos en medios de cultivos que se incubaron a una temperatura que oscila entre 23°C y 25°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 14 horas de oscuridad.

6.4.3 Fase 3. Diseño del manual divulgativo: Manual de embriogénesis directa de la *Cattleya trianae*.

En esta etapa, se diseñó un manual que abarca diversos aspectos, como la introducción, los métodos para el cultivo de tejidos vegetales in vitro, específicamente la embriogénesis directa. También se incluyen detalles sobre las características morfológicas de la especie, generalidades sobre orquídeas, protocolos de asepsia y los medios de cultivos usados, así como una descripción

detallada de los estadios de crecimiento de la semilla. Cabe resaltar que este manual se ha estructurado con textos cortos y fotografías para mejorar la comprensión y se basa en los parámetros propuestos por Camargo (2023) los cuales son similares a este pero enfocado en el cultivo de tejidos de arándanos.

Se diseñó el manual con la siguiente información: introducción, objetivos, materiales y métodos para el trabajo en cultivos de tejidos vegetales a nivel in vitro (embriogénesis directa), características morfológicas de la especie, generalidades de la orquídea, protocolos de asepsia y el medio de cultivo donde se obtuvieron los mejores resultados y descripción de los estadios de crecimiento de la semilla. En este se presenta textos cortos y fotografías para una mayor comprensión.

Cabe resaltar que el manual fue elaborado de acuerdo con el parámetro propuesto por Camargo (2023) el cual va en la misma línea de este pero enfocado sobre en un manual ilustrativo sobre los arándanos por medio del cultivo in vitro.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A continuación, se presentan los resultados y análisis de la siguiente investigación.

7.1 Contextualización

7.1.1 Revisión documental

Se construye a partir de dos categorías:

7.1.1.1 Divulgación científica sobre cultivo de tejidos vegetales

La divulgación científica es una labor multidisciplinaria que es fundamental para el proceso de investigación porque según Rivas (2017) “permite que el mundo académico pueda apreciar, comparar, cuestionar o quizá reinterpretarlos resultados de las investigaciones que le interesen, permitiendo entre otras opciones iniciar nuevos estudios y proyectos.” (p.1), por eso la información de este estudio se

comparte a través de un manual que describe paso a paso la embriogénesis directa, método utilizado en biotecnología, especialmente en técnicas de cultivos de tejidos vegetales.

Existen diversas investigaciones, como la de Menchaca (2011), que ha desarrollado un manual para la propagación de orquídeas, difundiendo técnicas y métodos adecuados para producirlas en un entorno controlado. De manera similar, Cortez (2013) elaboró un manual práctico sobre la producción y manejo de orquídeas Phalaenopsis, con el objetivo de proporcionar a los estudiantes las bases técnicas necesarias para reproducir y cuidar las orquídeas. Asimismo, el manual ilustrativo de Camargo (2023) presenta el desarrollo y crecimiento de arándanos a nivel in vitro. Estos ejemplos evidencian que la divulgación científica, a través de diversas estrategias de enseñanza, fortalece habilidades en observación, análisis, identificación y aplicación de técnicas adecuadas en cultivos de tejidos vegetales.

7.1.1.2 El cultivo de tejidos vegetales en *Cattleya trianae*

Muchas especies de orquídeas se encuentran en peligro de extinción por ello es crucial explorar diversas estrategias para su conservación. Entre estas opciones, el cultivo de tejidos es una alternativa importante, y según Perea (2009) "se fundamenta en la capacidad de las células vegetales para regenerar una planta completa idéntica a la original" (p. 7). Existen diversas técnicas que se emplean para este fin, y una de ellas es la embriogénesis somática directa, que se centra en la formación de embriones sin necesidad de la fusión de gametos. Esto implica que se obtienen estructuras bipolares a partir de células de diferentes tejidos de la planta. En el caso específico de la *Cattleya trianae*, que se encuentra en peligro de extinción, se aplica la técnica mencionada anteriormente. Es importante destacar que esta especie presenta desafíos adicionales para la embriogénesis, ya que la cantidad de hormonas influye en su crecimiento y dependiendo los objetivos de investigación pueden ralentizar el proceso o aumentar el riesgo de contaminación del material.

Dada la importancia de mantener condiciones estériles en los cultivos *in vitro*, es relevante considerar la contaminación microbiana como un problema común. Según Vargas y Abdelnour (2010), en su procedimiento de desinfección utilizaron etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 5.25%, sustancias efectivas contra bacterias y hongos. Sin embargo, durante el establecimiento *in vitro* del material vegetal, a pesar del uso de estos desinfectantes, se presentó una alta contaminación bacteriana que alcanzó valores cercanos al 90%. Por otro lado, “el material establecido asépticamente mostró una contaminación bacteriana del 6,1% en ápices y del 9,3% en estacas, mientras que la contaminación por hongos fue menor al 2%” (Vargas y Abdelnour, 2010, p. 76). Estos resultados resaltan la importancia de mantener condiciones estrictamente estériles para evitar la contaminación en los cultivos *in vitro*.

7.2 Fase experimental

Durante esta fase se recolectaron dos cápsulas en madurez fisiológica (blanda y con manchas oscuras) que contenían las semillas de la *Cattleya trianae* para su posterior introducción en cultivo *in vitro*, específicamente utilizando el método de Embriogénesis Somática Directa (ESD). Este proceso marcó el inicio de la estandarización del protocolo de asepsia para las cápsulas, así como la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios para el desarrollo de las plántulas.

Es relevante destacar que la práctica se inició el 28 de abril de 2023 en el laboratorio de Biotecnología del Colegio CAFAM y durante este período, se llevó a cabo un monitoreo cada 15 días de los diferentes frascos que contienen el medio de cultivo (MS) con las semillas de orquídea, manteniendo condiciones ambientales óptimas con una temperatura que oscilaba entre 23°C y 25°C, y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Durante el proceso, se prestó especial atención a las posibles contaminaciones, ya que las esporas de hongos no simbióticos presentes en el aire podrían afectar los medios de cultivo y, en consecuencia, llevar al descarte del material. Además, se

controló cuidadosamente la cantidad de hormonas utilizadas en los medios de cultivo, lo que influyó en el desarrollo de las estructuras durante el proceso de crecimiento.

7.2.1. Obtención de material vegetal

Para la obtención de la cápsula se hizo el desplazamiento a un vivero Local ubicado en el pueblo Santandercito, Cundinamarca, donde se recibieron por donación dos cápsulas de *Cattleya trianae*. (Tabla 1)

Tabla 1. Cápsula abierta y cerrada de *Cattleya trianae*. Benavides (2024)

Cápsula abierta con semillas	Cápsula cerrada
	

7.2.2. Protocolo de asepsia de frascos y cápsulas de *Cattleya trianae*.

En la figura 5 se presenta el protocolo de asepsia de los frascos donde se sirvieron los medios de cultivos.

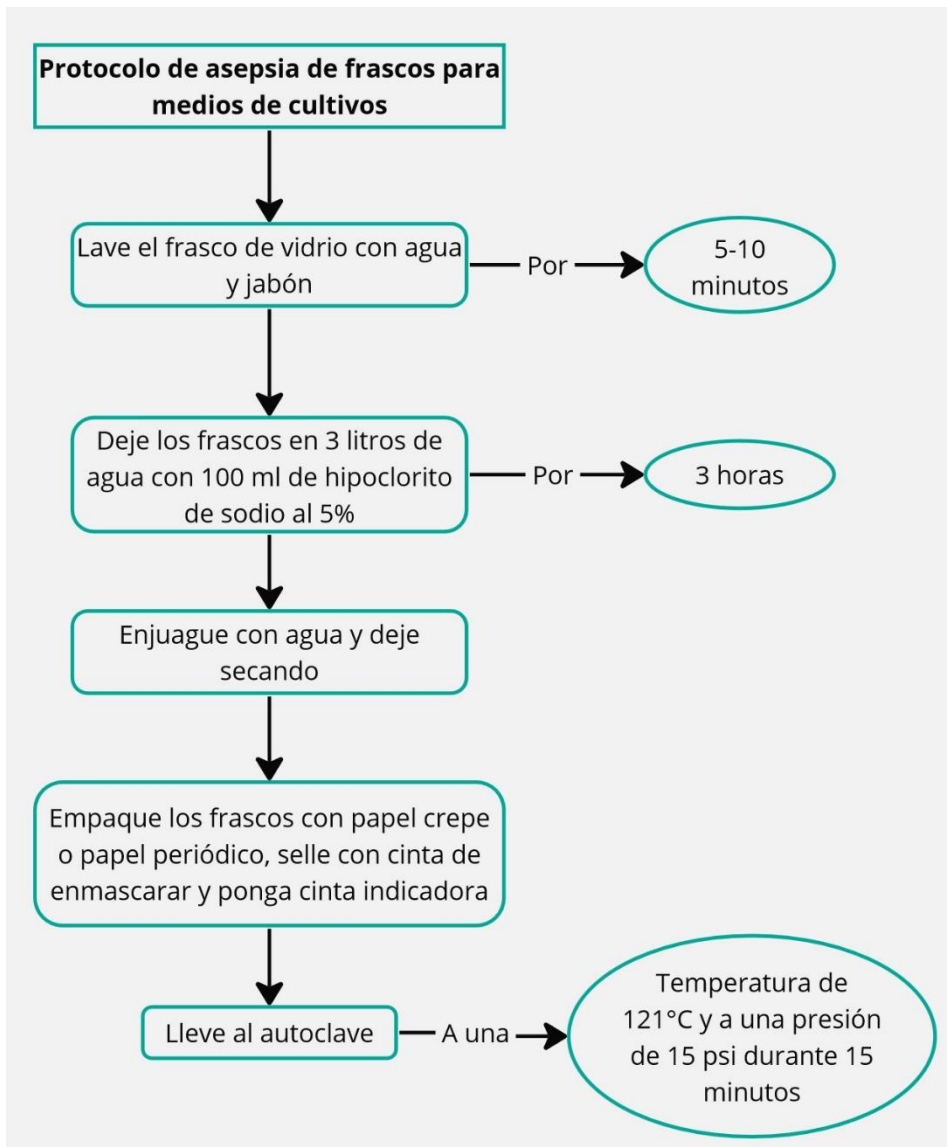


Figura 5. *Protocolo de asepsia de frascos para medios de cultivos. Benavides 2024.*

Dado que las capsulas llegaron muy contaminadas debido a que provenían del campo se le hacen 2 momentos de desinfección; el primero, fuera de la sala de incubación y para ello se probaron 2 protocolos que se presentan en la tabla 2

Tabla 2. Protocolo de asepsia para cápsulas.

Protocolo 1	Protocolo 2
Paso 1. Lavado con agua potable y jabón durante tres minutos para eliminar microorganismos, polvo y residuos de sustratos presentes en las cápsulas.	Paso 1. Lavado con agua potable y jabón durante tres minutos para eliminar microorganismos, polvo y residuos de sustratos presentes en las cápsulas.
Paso 2. Enjuague con agua potable y Tween-20 durante cinco minutos.	Paso 2. Enjuague con agua potable y Tween-20 durante cinco minutos.
Paso 3. Enjuague con agua destilada tres veces.	Paso 3. Se atomizó ácido acético y se esperó 3 minutos.
	Paso 4. Enjuague con agua destilada tres veces.

Los protocolos mencionados en la tabla 2 fueron llevados a cabo fuera de la cámara de flujo laminar, y se determinó que el más eficaz fue el protocolo dos, que además de tener Tween-20 que se utiliza para ayudar a reducir la tensión superficial y facilitar una mejor penetración de otras sustancias en la cápsula aumentando la eficacia del proceso. Este protocolo dos contiene ácido acético al 5% (vinagre), que presenta “propiedades químicas comparables con otros desinfectantes, como el hipoclorito de sodio, en aspectos como el efecto antibacteriano contra microorganismos patógenos causantes de diferentes infecciones” (Cáceres et al., 2021, p. 4). Además, según Omar (2016), se ha demostrado que el efecto antibacteriano in vitro del vinagre de manzana a concentraciones de 2.5% y 5%, y del hipoclorito de sodio al 5.25%, sobre una muestra inoculada con *Enterococcus faecalis*, resaltando que el efecto bactericida del ácido acético se debe a su capacidad para acidificar el medio donde se aplica, proporcionando propiedades antibacterianas.

Posteriormente, se realizó el segundo protocolo de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar, proceso durante el cual se llevó a cabo una nueva desinfección con los siguientes pasos:

- **Paso 1.** En un frasco grande se agregó alcohol etanol al 70% por tres minutos.
- **Paso 2.** En tres frascos grandes se agregó en cada uno agua destilada estéril y se enjuagó la capsula tres o 4 veces.
- **Paso 3.** En un frasco grande se agregó hipoclorito de sodio NaClO al 5.25% por cinco minutos.
- **Paso 4.** Por último, se enjuagó las capsulas en agua destilada estéril tres o cuatro veces.

7.2.3. Estandarización de los protocolos de los medios de cultivos

Una vez esterilizada la cápsula de la orquídea, se procedió a realizar la embriogénesis directa de las semillas en dos medios de cultivo de MS (Murashige & Skoog, 1962) (Anexo 1). En cada uno de los 20 frascos se introdujeron las semillas de *Cattleya trianae*. Es importante señalar que estas semillas no pueden contarse individualmente, ya que cada cápsula contiene millones de semillas en forma de polvo, lo que dificulta su conteo.

A las semillas que están en los medios de cultivos se le realizó el seguimiento durante los primeros tres días para observar si había contaminación de microorganismos como bacterias o hongos. Posteriormente, el seguimiento se llevó a cabo cada ocho días durante un período de treinta días, y luego cada veinte días para observar el desarrollo morfofisiológico de la planta. Es importante mencionar que las condiciones ambientales de los medios de cultivos en el laboratorio fueron de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Los medios de cultivo (anexo 1), presentados en la tabla 3 están acompañados de fotografías y observaciones del desarrollo de las semillas, se dividieron en dos

momentos de siembra: uno a finales de abril de 2023 y otro durante la última semana de mayo de 2023. Ambos se prepararon con MS (Murashige & Skoog), 400ml de suero de coco, 300ml de agua de cebolla, hormonas vegetales como el ácido naftalenacético (ANA) que en concentraciones de 2ml se utiliza para estimular la formación de raíces adventicias (Couvillon, 1988), 2ml de AG3 (ácido giberélico) que es un fitoregulator de acción hormonal que “promueve el crecimiento vegetativo del embrión durante la germinación y activa la producción de enzimas hidrolíticas especialmente α -amilasa, enzima involucrada en la solubilización de las reservas del endospermo” (Santacruz, F., et al. 2014) y q en los embriones de la *C. trianae* favoreció positivamente en la germinación y el desarrollo a protocormo y 1 ml de BAP (N⁶-bencilaminopurina) que ayuda a la “activación de la división celular en el embrión contribuyendo a su desarrollo y promoviendo la germinación en algunas especies” (Kucera et al. 2005, Moradi y Otroshy 2012).

Estos medios de cultivos también contenían reactivos como el inositol, que ha demostrado tener un efecto estimulante significativo en las plantas. El inositol está involucrado en la síntesis de fosfolípidos y en la formación de sistemas de membranas (Miller y Erston, 2010). Estudios realizados por Smith et al. (1990) sugieren que el inositol puede actuar como un mensajero secundario en las vías de señalización celular de las plantas, lo que podría influir positivamente en procesos como la germinación de semillas, el desarrollo de raíces y la resistencia al estrés.



Otro reactivo importante fue la sacarosa ya que sirve como fuente de carbono durante la embriogénesis somática (Kim y Kim, 2002) y también como un regulador osmótico (Biahoua y Bonneau, 1999). Además, este se adiciona al medio de cultivo de las plantas *in vitro* para permitir un rápido crecimiento heterotrófico ya que la producción de energía y carbohidratos por la fotosíntesis *in vitro* es muy poca debido a que los niveles de iluminación en las habitaciones destinadas a su crecimiento generalmente son bajos y no garantizan que se desarrolle adecuadamente este proceso (Leifert et al., 1995). Por último, está el agar-agar que ayuda a solidificar el medio y es una “sustancia inhibidoras o estimulantes del crecimiento” (Rodríguez, A. 2013. p.12)


Es importante mencionar que el agua de cebolla es “rica en flavonoides y en compuestos azufrados” (Block, 1985; Lim, 2014), este último compuesto tiene propiedades antimicrobianas que ayuda a prevenir el crecimiento de hongos u otros patógenos en el medio de cultivo, además de que posee quercetina que “es el flavonoide más abundante y es el que presenta mayor actividad antioxidante” (Jerez., et al. 2017. p. 8). Además, el suero de coco contiene ribósidos de zeatina, los que poseen un efecto similar a una citoquinina que se consideran promotores del crecimiento vegetal (Arditti *et al.* 1982., Yong et al., 2009; Hicks, 2007).

Con relación al medio de cultivo 1, este se caracterizó por la ausencia de carbón activado, a diferencia del medio 2, que contenía este elemento como agente antioxidante (Anexo 1). Esta diferencia permitió estimular el crecimiento y desarrollo de las semillas de orquídeas en el medio 2, fomentando la formación de callos y embriones para su posterior germinación. Después de 4 meses, todos los materiales del M1 y del M2 se trasladaron al M2, que contenía carbón activado; pues según Arditti y Ernst (1992), el carbón activado tiene un efecto positivo en el cultivo de orquídeas, ya que aumenta la aireación del medio de cultivo y adsorbe el etileno, el cual puede inhibir el crecimiento y la diferenciación. Además, como afirma Pedroza (2009), el carbón activado es un agente químico que controla positivamente la oxidación en el medio de cultivo y en el tejido vegetal, reduciendo la pérdida de material vegetal por necrosis consecuente a la oxidación. En adición, en estudios realizados por Vij et al. (1994) y Chen et al. (1999), se destaca la importancia del carbón activado en el desarrollo de los protocormos y las plántulas de orquídeas, especialmente cuando se utiliza en concentraciones inferiores a 2 g/L. Estas investigaciones subrayan que el crecimiento foliar y radicular de los protocormos no sería posible sin la presencia de carbón activado en el medio de cultivo.

A continuación, se presenta la tabla 3 de medios de cultivos y observaciones de la orquídea *Cattleya trianae*.

Tabla 3. Medios de Cultivos y observaciones de la orquídea *Cattleya trianae*.
Fotografías Benavides 2023 y 2024.

Medio	Compuestos	Observaciones	Fotografías/ mes
M1	MS (Murashige & Skoog) CAFAM. 400 ml de agua de coco y 300 ml de agua de cebolla por cada litro.	La primera semana de siembra se observó que no tenía agentes contaminantes. En esta fase las semillas se observan en forma de polvo amarillento.	 <p data-bbox="959 869 1395 1066">Figura 6. Semillas de la orquídea en sus primeros 30 días en oscuridad. Mayo de 2023.</p>
M1		El primer mes de la siembra las semillas, tienen un aspecto polvoriento de color más amarillento y verde (Estadio 1). De 10 medios sembrados se contaminaron 2.	 <p data-bbox="971 1407 1395 1591">Figura 7. Semillas amarillentas en formación de callo. Junio de 2023.</p>

M1		<p>Pasado mes y medio del estadio 1 las semillas germinaron y se observó el rompimiento de la testa donde el protocormo va saliendo y su aspecto se asemeja a gránulos de color verde (Estadio 2).</p>	 <p>Figura 8. <i>Embriones germinados al mes y medio.</i> <i>Julio 2023.</i></p>
----	--	--	---

M1

Después de 3 meses de germinadas las semillas se extrajo el medio de cultivo y se observó que los protocormos (Estadío 3) estaban adheridos; algunos estaban más sueltos, pero aquellos que no se despegaban formaban una masa callosa, mostrando estructuras asimétricas.

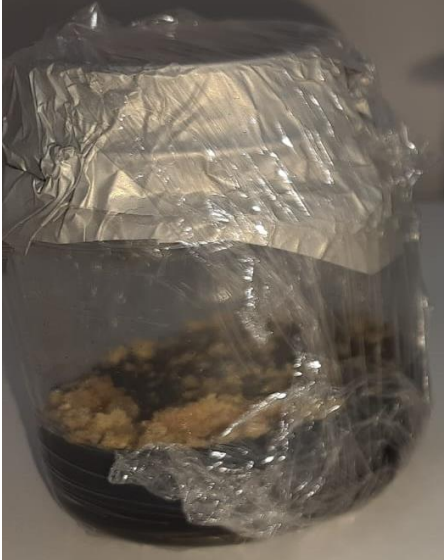

En esta etapa se trasladaron todas al medio 2



Figura 9. *Embriones germinados de tres meses para extracción a caja de petri. Agosto de 2023.*



Figura 10. *Embriones germinados tres meses después. Agosto de 2023.*

<p>M2</p>	<p>MS (Murashige & Skoog) CAFAM. Contiene carbón activado, 400 ml de agua de coco y 300 ml de agua de cebolla por cada litro.</p>	<p>Pasada la primera semana no se observó contaminación del material.</p> <p>Las semillas son de color amarillento y tienen apariencia de polvo.</p>	 <p>Figura 11. <i>Embriones de orquídea con apariencia polvorienta. Mayo de 2023.</i></p>
<p>M2</p>		<p>Después de mes y medio de sembradas las semillas germinaron mostrando signos de ruptura en la testa y revelando el desarrollo inicial del protocormo. (Estadio 2)</p>	 <p>Figura 12. <i>Embriones de orquídea germinados al mes y medio. Junio de 2023</i></p>

M2

Un mes después se presenció el desarrollo del protocormo (Estadio 3). El crecimiento fue asincrónico y se observó rizoides en el polo basal.



Figura 13. Desarrollo del protocormo de *C. trianae*. Julio de 2023 (M2 del 28/04/2023)



Figura 14. Desarrollo del protorcorno y rompimiento de la testa. Julio de 2023 (M2 del 24/05/2023)

M2

Todos los protocormos que estaban en formación del primordio foliar (Indicador de inicio de hojas verdaderas. (Estadio 4.) sembrados en diferentes fechas se trasladaron a un nuevo medio 2 debido a que estaba hacinadas.



Figura 16. *Desarrollo del primordio foliar. (Agosto de 2023)*

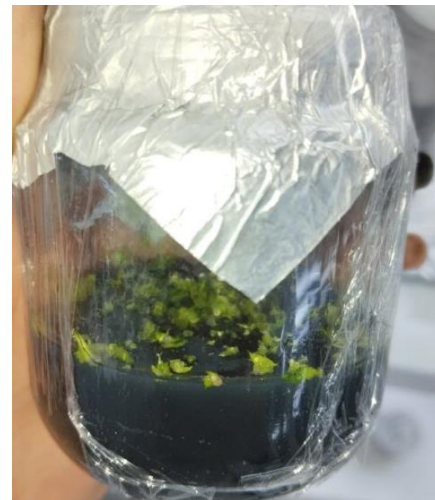






Figura 15. *Desarrollo del primordio foliar y el inicio de hojas verdaderas. Agosto de 2023.*

M2		<p>Pasados los cuatro meses de la siembra se observó plántulas con hojas. (Estadío 5). El crecimiento fue asincrónico porque hacía los bordes del vidrio habían protocormos sin hojas.</p>	 <p>Figura 17. Embriones cinco meses después. Septiembre de 2023.</p>
M2		<p>Al quinto mes de la siembra se trasladaron algunas semillas que se encontraban hacinadas. Se utilizó un recipiente de plástico transparente que permitía el paso de luz por todos los lados, lo que aceleró su crecimiento hasta que desarrollaron hojas y raíz. (Estadío 6)</p>	 <p>Figura 18. Embriones en recipiente de plástico. Octubre de 2023. Desarrollo de hojas y raíces.</p>

			 <p>Figura 19. <i>Embriones con crecimiento de hojas y raíz. Octubre de 2023.</i></p>
M2		<p>Al sexto mes de la siembra los materiales presentaban hojas y raíces (Estadío 7).</p> <p>Las que estaban en el frasco de plástico siguieron creciendo rápidamente.</p>	 <p>Figura 20. <i>Embriones de seis meses. Noviembre de 2023.</i></p>  <p>Figura 21. <i>Embriones de seis meses. Primeras plántulas con</i></p>

			<p><i>hojas fuertes y raíces. Noviembre de 2023</i></p>
<p>M2</p>		<p>Después de siete meses en los medios de cultivo, las semillas germinaron y se formaron plántulas con raíces, algunas de las cuales ya tenían dos o tres hojas emergiendo.</p>	<div data-bbox="964 323 1365 810" data-label="Image"> </div> <p>Figura 22. <i>Embriones de siete meses. Diciembre de 2023.</i></p> <div data-bbox="964 961 1373 1325" data-label="Image"> </div> <p>Figura 23. <i>Embriones de siete meses con formación de dos hojas y raíces. Diciembre de 2023.</i></p>

M2

Al octavo mes se observó que ya todas las semillas desarrollaron su primera raíz y pasaron a ser plántulas que generaban más raíces y nuevas hojas.



Figura 24. Embriones de ocho meses ya con hojas y raíces fuertes. Enero 2024

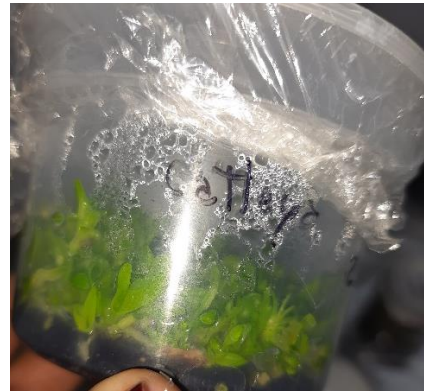


Figura 25. Embriones de ocho meses en recipiente de plástico. Plántulas completa con nuevas hojas y raíces. Enero de 2024.

Al comparar los resultados presentados en la tabla 3, se observó que en ambos medios todas las semillas germinaron aproximadamente a los 35 días, coincidiendo con Rodríguez (2013), quien logró porcentajes de germinación del 83%. Con relación al tiempo, Lee y Lee (1991) reportaron que la germinación ocurrió entre los 30 y 60 días de cultivo, mientras que para Zurita et al. (2014) fue a los 30, 60 y 90 días, dependiendo del medio de cultivo empleado. Por otro lado, en la presente investigación, el inicio del protocormo se dio a los 2 meses alcanzando el estadio 3, y a los meses posteriores, llegaron a los estadios 6 y 7, lo cual concuerda con Rodríguez (2013) que en diferentes tratamientos alcanzó al estadio 4 a los 70, 77 y 84 días, el estadio 5 a los 91 y 119 días y en los dos últimos estadios alcanzó las primeras plántulas completas con hojas y raíz a los 84 y 119 días.

A esto se añade, un experimento preliminar (prueba piloto) donde algunas semillas que crecían en M2 se trasladaron a un nuevo medio que contenía M&S, inositol, sacarosa, agar agar, carbón activado, 2ml de AG3, 2ml de ANA, 1ml de BAP, agua de coco y miel, (Figura 26). Este procedimiento sólo se realizó en dos frascos con medios de cultivos a los cuales se le hizo seguimiento a los protocormos y se observó que en mes y medio alcanzaron al estadio 5 con un mayor tamaño, mientras que en los otros medios se demoraban 2 meses para llegar a este estadio, esto se puede explicar con lo que menciona Vilchez., et al. (2019) que “la miel de abeja debido a su elevado contenido en azúcares simples su asimilación digestiva es rápida, altamente calórica por lo cual resulta útil como fuente de energía, además de contener calcio, cobre, magnesio, manganeso zinc, fósforo y vitaminas principalmente vitamina A, D, E, C, B6, B12 y E” (p.123), por esta razón, el desarrollo del protocormo hasta llegar a plántula con raíz fue excelente y como lo afirma Torres., et al (2001):

Desde la germinación hasta la emergencia de las hojas verdaderas; cuando esto ocurre, las reservas de la planta se agotan, entonces la posibilidad de aportar carbohidratos y otros nutrimentos a través de la miel permitiría obtener plantas más grandes, mejor nutridas y con mayor vigor. (p. 98)



Figura 26. *Medio de cultivo con miel.*



Es fundamental profundizar en la investigación sobre el uso de miel en medios de cultivo de orquídeas, dado que los resultados obtenidos hasta ahora justifican su incorporación porque reduce el tiempo de los estadíos con estructuras más grandes.





7.2.4. Identificación de las fases de crecimiento de *C. trianae* en el medio de cultivo 2

A los dos meses y medio, todos los explantes fueron trasladados al medio de cultivo M2 para identificar las fases de crecimiento morfofisiológicas de las semillas de la *C. trianae*. Durante este proceso, se observó un desarrollo asincrónico en el frasco de vidrio; dado que, en el borde del frasco se encontraron protocormos no fotosintéticos (segundo estadio) y protocormos fotosintéticos (Estadio 3), mientras que más hacia el centro del frasco se encontraba el protocormo en diferenciación (Estadio 4) y en el centro, plántulas con hojas y dos raíces (Estadio 5, 6 y 7).

En la tabla 4 se presenta la descripción y las fotografías de cada una de las 7 fases de estadio de desarrollo y crecimiento de *C. trianae*

Tabla 4. Descripción de estadios de germinación de las semillas de la *Cattleya trianae*

Descripción	Imágenes tomadas por Benavides 2023.
<p>Embrión hinchado (Estadio 1)</p> <p>A los primeros 15 días se observa el embrión hinchado de color verde y dentro de la testa de las semillas.</p>	 <p>Figura 27. Embrión hinchado bajo al microscopio.</p>
<p>Embrión rompiendo la testa (Estadio 2)</p> <p>Al mes y medio se observó hinchamiento del embrión y formación de la estructura globular formada por células. El embrión inicia a romper la testa. Se evidencia el primer cuerpo (protocormo) de color verde transparente y con un aspecto granuloso.</p>	 <p>Figura 28. Embrión de <i>C. trianae</i> rompiendo y emergiendo de la testa.</p>

<p>Protocormo (Estadio 3)</p> <p>A los 2 meses se observa mejor su forma esférica ovoide con presencia de protocormo y en su polo apical va formando una protuberancia.</p>	 <p>Figura 29. <i>Protocormo.</i></p>
<p>Protocormo en diferenciación (Estadio 4)</p> <p>A los 3 meses su forma cambia de esférica a pera de color verde, se observó los primordios foliares (precursor de hojas verdaderas) que inician en la periferia del meristemo con rizomas y sin raíces verdaderas.</p>	 <p>Figura 30. <i>Protocormo con primordio foliar.</i></p>
<p>Plántulas con hojas (Estadio 5)</p> <p>A los 4 meses se observa la primera hoja, denominado como plántula, su aspecto se ve alargado con una base sin raíces verdaderas, su color verde se intensifica.</p>	 <p>Figura 31. <i>Plántula con hojas.</i></p>
<p>Plántula con hojas y raíz (Estadio 6)</p> <p>A los 5 meses se observa la formación de dos hojas alargadas de color verde intenso y crecimiento rápido de raíces.</p>	 <p>Figura 32. <i>Plántula con hoja y raíz</i></p>

**Plántula con hojas y dos raíces
(Estadio 7)**

A los 6 meses las primeras plántulas completas con hojas y raíces, (que se siguieron generando con el tiempo) la semilla exhibe dos formaciones de hojas que han alcanzado un desarrollo notable, presentando un aspecto alargado y robusto.



Figura 33. *Plántula con hojas y dos raíces.*

Durante la observación del crecimiento de los protocormos se notó la formación de estructuras asimétricas en forma de masas callosas de color verdoso transparente (Figura 34). Este fenómeno fue detectado desde la fase de Protocormo (Estadio 3), aportando un indicio importante de los procesos internos de diferenciación y crecimiento de la planta en desarrollo. Estas masas embrionarias callosas presentan una consistencia dura y aspecto globoso y granuloso, y se encuentran en una fase intermedia entre protocormo y plántula. Al realizar el traspaso al medio de cultivo 2 y después de un mes, la masa embrionaria continuó generando esta formación callosa, hasta llegar a la etapa de plántula.



Figura 34. *Masa embrionaria callosa. Benavides 2023.*

El fenómeno anterior, también fue observado por Francisco, et al. (2011) en su estudio sobre la morfología de *Laelia eyermaniana* Rchb.f. que mencionan "algunos de los protocormos en crecimiento formaron cúmulos de masa callosa amorfa en un periodo de 15 días, a los que se les denominó masa embrionaria somática (MES)" (p.2). Es importante, destacar que esta formación fue temporal y que en el caso de *C. trianae* fue similar, ya que luego de ser trasladadas al medio M2, pudieron crecer más. Por lo tanto, se comprende que al germinar muchas semillas al mismo tiempo tienden a formar esta masa, la cual no afecta el proceso de desarrollo y crecimiento de la plántula, según los resultados obtenidos en el presente estudio de *C. trianae* y los resultados de Francisco, et al (2011).

7.3. Diseño del manual divulgativo.

En esta etapa, se ha diseñado un manual con el propósito de servir como material divulgativo para la introducción de las semillas contenidas en la cápsula de la orquídea *C. trianae* en medios de cultivo in vitro. Este manual proporciona información sobre las generalidades e importancia de esta especie en peligro de extinción, convirtiéndose en un recurso crucial para su conservación. Es fundamental destacar que para llevar a cabo este tipo de investigaciones se requiere trabajar en condiciones óptimas que garanticen los mejores resultados, por lo tanto, se realizan en laboratorios de Biotecnología especializados en cultivos de tejidos vegetales. El desarrollo de estas investigaciones es costoso y requiere de los recursos necesarios para su realización.

El manual, titulado "*Cattleya trianae*: ¡Cultiva Orquídeas para Conservarlas a nivel in vitro!", se encuentra disponible en el siguiente enlace https://www.canva.com/design/DAGFI4M9w9Q/ZAb5UvWJ5zRt0RdV-P6-Yw/view?utm_content=DAGFI4M9w9Q&utm_campaign=designshare&utm_medium=link&utm_source=editor. Este material, diseñado mediante la plataforma en línea llamada Canva, incluye fotografías acompañadas de textos cortos y concisos que facilitan al lector su comprensión. Presenta una tabla de contenido, introducción,

clasificación taxonómica, estructuras morfológicas, generalidades e importancia de las orquídeas, materiales y elementos para trabajar en cultivo de tejido in vitro, como la técnica de la embriogénesis directa, protocolos de asepsia, preparación de los medios de cultivo, un glosario y bibliografía.

Desde la figura 35 a la 43 se presentan algunos apartados del manual divulgativo:



Figura 35. Portada del manual.

06

Importancia de las orquídeas

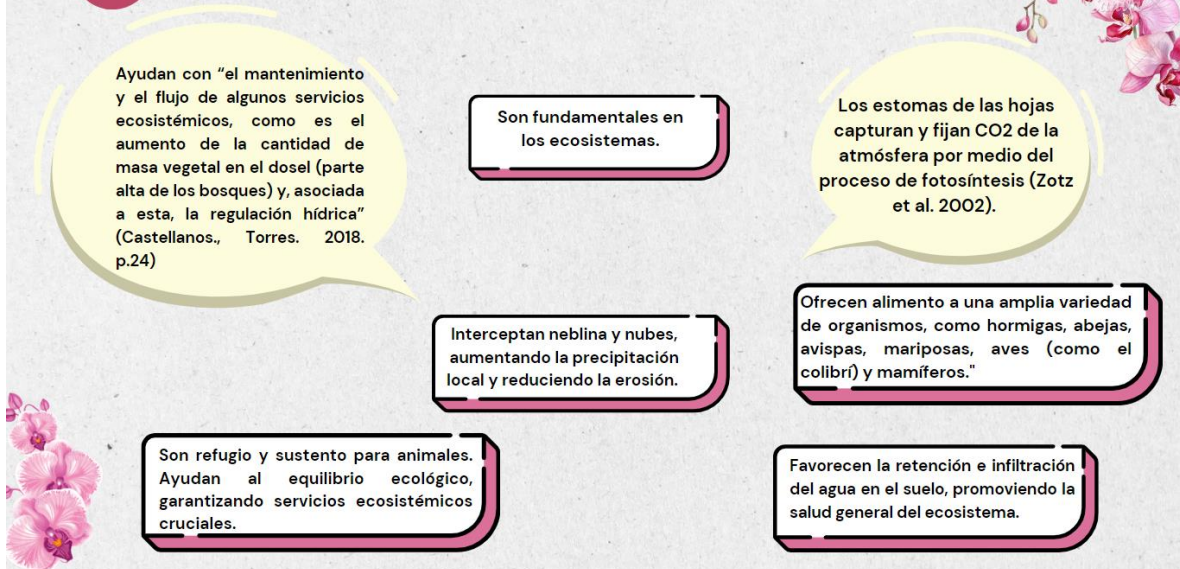


Figura 36. Importancia de las orquídeas.

07

Generalidades sobre las orquídeas



Imagen 1. Flor de mayo (*Cattleya trianae*). [Swimlor \(2023\)](#).

- Las orquídeas pertenecen a la familia botánica Orchidaceae.
- Se estima que existen entre 25 mil y 30 mil especies de orquídeas, además de posiblemente otros 6 mil híbridos.
- Las orquídeas se encuentran en todo el mundo, pero son más abundantes en regiones tropicales y cálido-húmedas.
- Este grupo botánico muestra una adaptabilidad impresionante a diferentes entornos, desde hábitats montañosos hasta exuberantes selvas tropicales.

Figura 37. Generalidades sobre las orquídeas.

12

Tallo



Pseudobulbos
Imagen 5. Tallo.
 (Castellanos & Torres. 2018.)

Pueden ser delgados y teretes (cilíndricos o redondos) o engrosados como los pseudobulbos. (Castellanos, 2018)

Los frutos: cápsulas



Imagen 6. Los frutos, cápsula.
 (Castellanos & Torres. 2018.)

Los frutos de las orquídeas son cápsulas que contienen entre 200.000 y 600.000 semillas (Sociedad Colombiana de Orquideología op cit). Las semillas casi no tienen sustancias de reserva y requieren asociarse obligadamente con un hongo micorrízico para poder germinar (Arditti y Ghani 2000, Valencia 2014, Ministerio del Ambiente de Perú 2015).

Figura 38. Morfología de la planta de Cattleya trianae.

18

Protocolo de asepsia para frascos

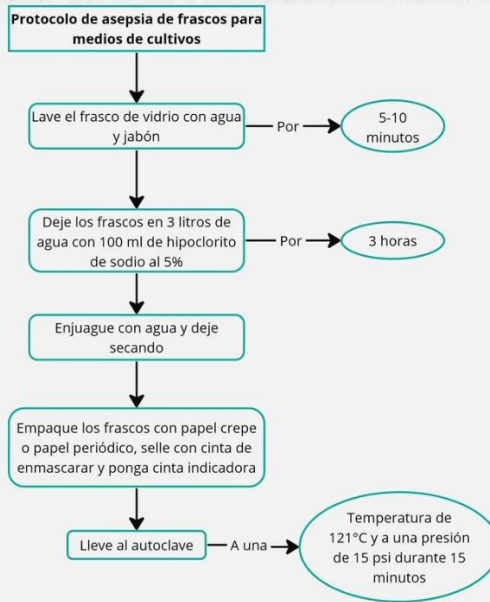


Imagen 8. Protocolo de asepsia de frascos para medios de cultivos. Elaboración propia.

Figura 39. Protocolo de asepsia para frascos.

Embriogénesis directa de *Cattleya trianae*

Paso 1. Tomar la cuchilla y colocarla en el mango para poder cortar la cápsula.

Paso 2. Con una pinza sujete en la mitad de la cápsula y corte con mucho cuidado los extremos.

Paso 3. Retire el material cortado para no contaminar las semillas.

Paso 4. Vuelva y tome la pinza y cuchilla y desinfecte con alcohol al 70%.

Paso 5. Acerque la pinza y la cuchilla al mechero para flamear.



Imagen 9. Cápsula abierta con semillas.

Imagen 10. Cápsula cerrada.

Figura 40. Embriogénesis directa de *Cattleya trianae*.

Descripción de los estadios de germinación de las semillas de la *C. trianae*.

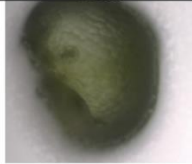
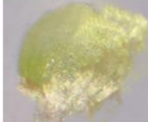
Descripción	Imágenes tomadas por Benavides 2023.
<p>Embrión hinchado (Estadio 1)</p> <p>A los primeros 15 días se observa el embrión hinchado de color verde y dentro de la testa de las semillas.</p>	 <p>Imagen 12. Embrión hinchado bajo al microscopio.</p>
<p>Embrión rompiendo la testa (Estadio 2)</p> <p>Al mes y medio se observó hinchamiento del embrión y formación de la estructura globular formada por células. El embrión inicia a romper la testa. Se evidencia el primer cuerpo (protocormo) de color verde transparente y con un aspecto granuloso.</p>	 <p>Figura 13. Embrión de <i>C. trianae</i> rompiendo y emergiendo de la testa.</p>

Figura 41. Descripción de los estadios de germinación de las semillas de la *C. trianae*.

Plántula con hojas y dos raíces (Estadio 7)

A los 6 meses las primeras plántulas completas con hojas y raíces, (que se siguieron generando con el tiempo) la semilla exhibe dos formaciones de hojas que han alcanzado un desarrollo notable, presentando un aspecto alargado y robusto.



Imagen 18. Plántula con hojas y dos raíces.

Figura 42. Descripción de los estadios de la semilla C. trianae. Plántula con hojas y dos raíces.

Glosario

Hormonas vegetales: Compuestos químicos producidos naturalmente por las plantas que regulan el crecimiento y desarrollo. En el cultivo de tejidos, se utilizan hormonas sintéticas para inducir la formación de brotes, raíces u otros tejidos.

Auxinas: Hormonas que promueven el crecimiento de raíces y la formación de callos.

Citocininas: Hormonas que estimulan la división celular y la formación de brotes.

Giberelinas: Hormonas que regulan el crecimiento de tallos y hojas.

Ácido abscísico: Hormona que inhibe el crecimiento y promueve la dormancia de las yemas.

Estadio 1: Embrión hinchado

Estadio 2: Embrión rompiendo la testa

Estadio 3: Protocormo

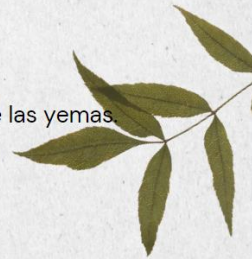


Figura 43. Glosario.

8. Conclusiones

- La revisión documental desempeñó un papel fundamental en la recopilación y organización de información esencial para este trabajo, incluyendo el planteamiento del problema, la justificación, los antecedentes, el marco teórico, la metodología, el análisis y los resultados, así como el diseño del manual.
- La embriogénesis directa del material vegetal resultó exitosa, especialmente con el protocolo 2 de desinfección que incluye ácido acético. Este protocolo fue efectivo en la prevención de la contaminación por microorganismos, asegurando así un ambiente estéril para el desarrollo de los embriones.
- El medio de cultivo 2, que contiene MS, 2 ml de ANA, 1 ml de BAP, 2 ml de AG3, 100 mg/L de inositol, 30 g/L de sacarosa, 6 g/L de agar agar, 400 ml de suero de coco, 300 ml de agua de cebolla y 8 g/L de carbón activado, resultó ser más efectivo. Este medio permitió el desarrollo de plántulas con hojas (estadio 5) en tan solo 4 meses, lo que fue fundamental para seleccionar las condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo de las semillas, garantizando así su adecuada nutrición.
- La identificación de los diferentes estadios morfológicos de la *Cattleya trianae* permitió una descripción detallada de cada uno de ellos, proporcionando información clave sobre su desarrollo y crecimiento in-vitro.
- El manual "*Cattleya trianae*: ¡Cultiva Orquídeas para Conservarlas! se presenta como una guía accesible y didáctica que busca divulgar de manera clara y comprensible el proceso del cultivo de tejidos in vitro de esta especie. Además, de proporcionar información detallada sobre las generalidades e importancia. Este estudio contribuye significativamente a la conservación de la *Cattleya trianae* al explorar y promover el uso de técnicas de biotecnología como la embriogénesis directa. Estas técnicas ofrecen alternativas valiosas para la conservación de especies en peligro.
- En resumen, este trabajo de grado ha sido una experiencia enriquecedora que ha fortalecido mis habilidades de análisis, observación e investigación,

así como mis conocimientos en botánica, técnicas de cultivo de tejidos vegetales, protocolos de desinfección, estandarización de medios de cultivo, entre otros aspectos, tanto a nivel personal como profesional.

9. Recomendaciones

- Se sugiere profundizar en la investigación sobre la incorporación de miel de abeja en los medios de cultivo, dado que se observó un incremento en el crecimiento con el tiempo. Este hallazgo podría resultar rentable en términos de costos de producción.
- Se recomienda aumentar la proporción de agua de cebolla y agua de coco en suero, como el Pedialyte, ya que las orquídeas responden positivamente a estas soluciones, lo que se traduce en una mejor nutrición y un crecimiento más rápido.
- Es importante profundizar en la investigación del protocolo de asepsia para cápsulas con el fin de prevenir contaminaciones en la cámara de flujo laminar.

10. Bibliografía

- Arditti, J and Ernst, R. 1992. Micropropagation of Orchids. Ed. John Willey & sons, Inc., NY, U.S. A.
- Arditti, J.; Clements, G.; Fast, G.; Hadley, G.; Nishimura, G.; Ernst, R. 1982. Orchid seed germination and seedling culture - manual. En: Arditti, J.; Clements, G.; Fast, G.; Hadley, G.; Nishimura, G.; Ernst, R. (eds.). Orchid biology: Reviews and Perspective II. New York: Cornel University. 390p
- Auris Villegas, D., Vilca Arana, M., Saavedra Villar, P., Leiva Aguilar, N., & Arritola Fernández, S. . (2023). Divulgación científica: arte de visibilidad y alto impacto. *Horizontes. Revista De Investigación En Ciencias De La Educación*, 7(27), 468–480. <https://doi.org/10.33996/revistahorizontes.v7i27.530>
- Barbery, K., Morales, I. (2011). Manual para el cultivo In Vitro de la Orquídea *Cattleya nobilior*. CEPAD. Santa Cruz, Bolivia.
- Barrero, et al. (2011). La hermenéutica en el desarrollo de la investigación educativa en el siglo XXI. *Itinerario Educativo • Año xxv, n.º 57*. Bogotá, D.C.
- Biahoua, A. and Bonneau, L. 1999. Control of in vitro somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Rep.* 19(2):185-190.
- Block, E. (1985). Química del ajo y de la cebolla. [Científico]. *Investigación y Ciencia*, 104, 98 - 104.
- Cáceres, J., et al. (2021). Efecto bactericida del ácido acético presente en el vinagre, una alternativa a desinfectantes sintéticos o químicos. *REVISITABOLETÍN REDIPE* 11 (1): 440 - 451.
- Calderón E. (2006). Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 3: Orquídeas, Primera Parte. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. Instituto Alexander von Humboldt - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 828 p

- Calderón-Sáenz, E. (ed) (2007). Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 6: Orquídeas, Primera Parte. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá: Instituto Alexander von Humboldt. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 820 p.
- Camarena, F., Chura, J., Humberto, R. (2014). Mejoramiento Genético y Biotecnológico de Plantas. Colección Agrosaber. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Camargo, D. M. (2023). *La ilustración como estrategia para la divulgación del crecimiento in vitro del arándano azul en pro de fortalecer la alfabetización científica*. <http://hdl.handle.net/20.500.12209/18446>.
- Cancela, J. (2002). Euskonews y Ciencia. <https://www.euskonews.eus/0161zbk/gaia16103es.html>
- Castellanos & Torres. 2018. Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible. Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humbolt. Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánica de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. 328 p.
- Castiblanco, Samuel. (2024). Diseño de una propuesta educativa por medio de cultivo de tejido de *Espeletia spp* que permita potenciar el desarrollo de habilidades científicas para estudiantes del grupo de biotecnología del Colegio Cafam. Universidad Pedagógica Nacional.
- Cazarez favela, T. L., Graciano Luna, J. J., solís González, s., Díaz Ramírez, B., Nájera Luna, J. A., Montoya Ayón, J. B. (2016) Propagación in vitro de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguas calientes. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2016672269>

- Chen, L.; Pan, R.; Chen, R. 1999. Effects of media, growth regulators and dividing on the growth of *Cymbidium sinense* protocorm cultured in vitro. *J. Trop. and Subtrop. Bot.* 7:59-64
- Creswell, J. W., Plano Clark, V. L. (2017). *Designing and conducting mixed methods research* (3rd ed.). Sage Publications.
- Couvillon, G.A. 1988. Rooting response to different treatments. *Acta Hort.* 227, 187-196.
- Durán, R., Méndez, M. (2010). *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*. CICY. PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. 496 pp. Yucatán, México.
<https://www.cicy.mx/sitios/biodiversidad-y-desarrollo-humano-en-yucatan>
- Flores-Hernández, Luis Antonio, Robledo-Paz, Alejandrina, & Jimarez-Montiel, María Josefina. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de orquídeas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(6), 1315-1328.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342017000601315&lng=es&tlng=es.
- Florian, A. K. (2019). *Diseño de una unidad didáctica sobre cultivo de tejidos vegetales in vitro que permita la enseñanza de conceptos relacionados con el desarrollo de las plantas, para estudiantes del grupo de biotecnología del Colegio Cafam*. <http://hdl.handle.net/20.500.12209/10745>.
- Francisco Nava, Juan José, Jiménez-Aparicio, Antonio Ruperto, De Jesús-Sánchez, Antonia, Arenas-Ocampo, Martha Lucía, Ventura-Zapata, Elsa, & Evangelista-Lozano, Silvia. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas in vitro. *Polibotánica*, (32), 107-117.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682011000200006
- Francisco, J. (2008). Propagación In Vitro y establecimiento en invernadero de las Orquídeas *Trichocentrum carthagenense* (Jacq.) Sw y *Laelia eyermaniana*

- Rchb. f., Para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, México.
- G. F. Pabst, F. Dungs. (1975). *Orchidaceae brasilienses*. Kurt Schmersow, Hildesheim, Alemania.
- Hernández., et al. (2014). *Metodología de la investigación Sexta edición*. McGRAW-HILL / INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V. México D.F.
- Hicks, A. J. 2007. *Orchid seed germination media, a compendium of formulations*. The Orchid Seed Bank Project, Chandler, USA. 210 p.
- Jerez., et al (2017). ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BENÉFICAS EN LA CEBOLLA (*Allium Cepa L.*) EN EL DEPARTAMENTO DE TARIJA. *Revista Boliviana*. http://revistasbolivianas.umsa.bo/pdf/rvc/v8n13/v8n13_a03.pdf
- Kim, S. H. and Kim, S. K. 2002. Effect of sucrose level and nitrogen source on fresh weight and anthocyanin production in cell suspension culture of 'Sheridan' Grape (*Vitis spp.*). *J. Plant Biotech.* 40(4):2327-2330.
- Kucera B, MA Cohn, G Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307.
- Lee, J. y Lee H. 1991. Micropropagación de orquídeas a partir de semillas. *Boletín informativo de FIRA XXIV* 2:15-30.
- Leifert, C, Murphy K P y Lumsden PJ (1995) Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2): 83-109
- Lim, T. K. (2014). *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Modified Stems, Roots, Bulbs* (Vol. 9). Netherlands: Springer.
- Loaiza, D. C. & Oliveros, D. (2021). *Diseño de un material didáctico web para la enseñanza de cultivo de tejidos en orquídeas que permita el desarrollo de habilidades científicas en estudiantes de grados octavo y noveno*. <http://hdl.handle.net/20.500.12209/16743>.

- López, M. (2024). La Importancia de la Ilustración en la Divulgación Científica: Más Allá de las Palabras. Universidad Isabel I. Burgos, España. <https://www.ui1.es/blog-ui1/la-importancia-de-la-ilustracion-en-la-divulgacion-cientifica-mas-alla-de-las-palabras>
- Menchaca, R., Moreno, D. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. Comisión Nacional Forestal. México.
- Miller, A. y Erston, J.V. 2010. Fisiología Vegetal. Disponible en <http://www.aspaperu.org/boletines/bolfeb/tecnologia1.htm>
- Moradi K, M Otroshy. 2012. A combination of chemical scarification and 6-Benzylaminopurine (BAP) treatment promote seed germination in *Dracocephalum kotschy* seeds. *Trakia Journal of Sciences* 10(3): 26-29.
- Morales I. (2011). Manual para el cultivo In Vitro de la Orquídea de *Cattleya nobilior* "Flor símbolo de Concepción". Centro para la participación y el desarrollo humano sostenible CEPAD. Santa Cruz, Bolivia.
- Núñez, W., Villamil, L. (2017). Revisión documental: el estado actual de las investigaciones desarrolladas sobre empatía en niñas y niños en las edades comprendidas entre los 6 a 12 años de edad surgidas en países latinoamericanos de habla hispana, entre los años 2010 al primer trimestre del 2017. Universidad Minuto de Dios. Bogotá. D.C.
- Olmos, L. (2023). Cultivo de tejidos vegetales, una técnica de gran importancia en la agricultura actual. Tecnología Hortícola. <https://www.tecnologiahorticola.com/cultivo-tejidos-vegetales-tecnica-propagacion-importancia-agricultura-actual/>
- Omar C. (2016). Efecto antibacteriano comparativo in vitro del vinagre de manzana y del hipoclorito de sodio como agentes irrigadores de conductos radiculares para eliminar *Enterococcus faecalis*.

Orejuela Gartner, J. E., (2010). La conservación de orquídeas en Colombia y un caso en proceso en la cuenca del río Cali, municipio de Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia. *El Hombre y la Máquina*, (35), 53-66.

Orejuela, J. (2010). La conservación de orquídeas en Colombia y un caso en proceso en la cuenca del río Cali, municipio de Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia. *El Hombre y la Máquina*, núm. 35. Cali. Colombia.
<https://www.redalyc.org/pdf/478/47817140007.pdf>

Pedroza-Manrique (2009) Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. [Vista de Efecto del carbón activado, ácido indolacético \(AIA\) y bencil amino purina \(BAP\) en el desarrollo de protocormos de Epidendrum elongatum Jacq bajo condiciones in vitro | Revista Colombiana de Biotecnología \(unal.edu.co\)](#)

Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Manual de prácticas de laboratorio.

Pérez, Martínez, B., & Castañeda, Garzón, S. (2016). Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología Vegetal*, 16(3). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/519>

Rivas. F. (2017). La importancia de la Divulgación Científica en la investigación. Universidad de los Andes.
<https://www.redalyc.org/journal/5530/553056607011/html/>

Roa, P., Vargas, C. (2009). El Cuaderno de Campo como Estrategia de Enseñanza en el Departamento De Biología de la UPN. *Bio-grafia: Escritos sobre la Biología y su Enseñanza* Vol2 No3 ISSN 2027-1034. Bogotá. D.C.

- Roa R., Valbuena E. (2013). Incursión de la biotecnología en la educación: Tendencias e implicaciones. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/41274/43810>
- Rodríguez, A. (2013). Inducción de la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* Pav. Ex Lindl. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. <https://ru.dgb.unam.mx/handle/20.500.14330/TES01000705765>
- Salazar, M. A. S.; Amaya, N. Z. A. y Barrientos, R. F. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de Phalaenopsis (Orchidaceae). Rev. Colomb. Biotecnol.15:97-105. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752013000200012&script=sci_arttext
- Santacruz, F., Castañeda, J., Gaspar, A., Núñez, N., y Mora, S. (2014). Rompimiento de la dormancia en semillas y propagación *in vitro* de (*Cordia elaeagnoides*) A. DC. Revista mexicana de ciencias forestales, 5(25), 84-97. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322014000500007
- Sedano, G. C., Alejandro Manzo, G., Reymundo Roldán, H., & Castellanos S., J. A. (2015). Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 1(), 451-456.
- Smith, J. T., Sridara, S., Hagemann, R., & Harmon, A. (1990). Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and partially purified myo-inositol monophosphatase isoenzymes encoded by AtIMP1 and AtIMP2. The Journal of Biological Chemistry, 265(29), 17897-17904.
- Tashakkori, A., Teddlie, C. (Eds.). (2010). Handbook of mixed methods in social and behavioral research. Sage Publications.
- Torres Yáñez, A. D. (2020). Establecimiento de una metodología para la embriogénesis somática de la orquídea *Dracula vampira* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte]. Recuperado de <https://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/9892>

- Valera, O. et al. (2017). Desarrollo de material didáctico multimedia del cultivo de tejidos vegetales con aplicaciones agrarias y ambientales. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental – Volumen 8 Número 2*.
<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2043/2295>
- Vargas-Castillo, M. D. P., & Abdelnour-Esquivel, A. (2010). CULTIVO IN VITRO DE *Geophila macropoda* (RUIZ & PAV. DC) A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 73-83.
- Vega, G., et al. (2014). PARADIGMAS EN LA INVESTIGACIÓN. ENFOQUE CUANTITATIVO Y CUALITATIVO. *European Scientific Journal*.
<https://core.ac.uk/reader/236413540>
- Vij, S. P., Kondo, K., Pathak, P. 1994. Regeneration potential of *Cymbidium pendulum* (Roxb) Sw. Nodal explants: a study in vitro. *J Orch Soc India* 8: 19-23
- Vilchez, H., Cervantes, L., Inocente, M. (2019). Uso de la miel de *Apis mellifera* en agar base para diferenciar cepas bacterianas con característica oxidativa-fermentadora. *Ars Pharm.* 2019; 60(2): 119-124.
<https://scielo.isciii.es/pdf/ars/v60n2/2340-9894-ars-60-02-119.pdf>
- Villegas Torres, O. G., Rodríguez Mendoza, M. D., Trejo Téllez, L. I., & Alcántar González, G. (2001). Potencial de la miel de abeja en la nutrición de plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana*, 19(1), 97-102.
<https://www.redalyc.org/pdf/573/57319112.pdf>
- Villegas, David Auris, Arana, Miriam Vilca, Villar, Pablo Saavedra, Aguilar, Nolberto Leyva, & Fernández, Sandra Arritola. (2023). Divulgación científica: arte de visibilidad y alto impacto. *Horizontes Revista de Investigación en Ciencias de la Educación*, 7(27), 468-480. Epub 09 de enero de 2023.
<https://doi.org/10.33996/revistahorizontes.v7i27.530>
- Wongo Gungula, E., Artigas, W., y Faustino, A. (2020). La difusión de la ciencia en Angola a través de revistas científicas: una alternativa de mejoramiento del

proceso investigativo. Revista General de Información y Documentación, 30(2), 357-377. <https://doi.org/10.5209/rgid.72812>

Yong, J. W.; Ge, L.; Ng, Y. F.; y Tan, S. N. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14:5144 - 5164.

Yory, L. (2021). LA FOTOGRAFÍA COMO ESTRATEGIA PEDAGÓGICA PARA LA ENSEÑANZA DE LAS CIENCIAS NATURALES EN ESCUELA NUEVA. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Duitama, Boyacá. https://repositorio.uptc.edu.co/bitstream/handle/001/3724/La_fotografia_como_estrategia_pedagogica.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Zettler, L. W.; Stewart, S. S.; Bowles, L. M. and Jacobs, A. K. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera Leucophaea* (Nuttall) Lindley. *The Am. Midland Nat.* 145:168-17. [https://bioone.org/journals/The-American-Midland-Naturalist/volume-145/issue-1/0003-0031\(2001\)145\[0168:MFCAS\]2.0.CO;2/Mycorrhizal-Fungi-and-Cold-assisted-Symbiotic-Germination-of-the-Federally/10.1674/0003-0031\(2001\)145\[0168:MFCAS\]2.0.CO;2.short](https://bioone.org/journals/The-American-Midland-Naturalist/volume-145/issue-1/0003-0031(2001)145[0168:MFCAS]2.0.CO;2/Mycorrhizal-Fungi-and-Cold-assisted-Symbiotic-Germination-of-the-Federally/10.1674/0003-0031(2001)145[0168:MFCAS]2.0.CO;2.short)

Zurita, V, Gómez, C., J., Atrián, M., Hernández, G., Granados, G., García, M., Salgado, G., Sánchez, V., Nahum M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*tilia mexicana* schlecht.) (*tiliaceae*). *Polibotánica*, (38), 129-144. Recuperado en 05 de mayo de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200007&lng=es&tlng=es.

11. ANEXO

Anexo 1. Preparación del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) por componentes más suplementos.

Solución	Sales	Concentración de Stock	Cantidad de Stock por 1L
A	NH ₄ NO ₃ (Nitrato de Amonio)	82.5	20 ml
B	KNO ₃ (Nitrato de potasio)	95.0	20 ml
C	CaCl ₂ (Cloruro de calcio)	88.0	5 ml
D	KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potasio)	34.0	5 ml
E	H ₃ BO ₃ (Ácido Bórico)	1.24	5 ml
	Na ₂ MoO ₄ (Molideno de Sodio)	0.05	
	CoCl ₂ .6H ₂ O (Cloruro de Cobalto)	0.005	
	KI (Yoduro de Potasio)	0.166	
F	MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de Magnesio)	74.0	5 ml
		4.46	
	MnSO ₄ .4H ₂ O (Sulfato de Magnesio) (5ml)	1.72	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de Zinc)	0.005	
	CuSO ₄ .5H ₂ O (Sulfato de Cobre)		
G	Na ₂ EDTA (*) (Sodio)	7.46	5 ml
	FeSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de Hierro)	5.57	
H	Tiamina	0.02	5 ml
	Ácido Nicotínico	0.1	
	Piridoxina	0.1	
	Glicina	0.4	

Reactivo	Cantidad
Inositol	100 mgr/L
Sacarosa	30 gr/L
Agar Agar	6-10 gr/L
Suero de coco	400 ml
Agua de cebolla	300 ml

Hormonas	Cantidad
ANA (Auxinas)	2 ml
BAP (Citoquininas)	1ml
AG3 (Giberelinas)	2 ml

NOTA: todo lo mencionado anteriormente están en los dos medios; sin embargo, el medio 2 contiene además 8g/L de carbón activado.