



Evaluación del proceso de propagación *in vitro* para la especie *Rodriguezia venusta* Rchb. F.

Emeli Loreth Baquero Mendoza. ID. 639523.

Brandon Smith Quintero Ardila. ID. 651425.

Andrés Julián Montes Montenegro. ID. 638666.

Corporación Universitaria Minuto de Dios

Vicerrectoría Regional Orinoquía

Sede Villavicencio (Meta)

Programa Ingeniería Agroecológica

octubre de 2022

Evaluación del proceso de propagación *in vitro* para la especie *Rodriguezia venusta* Rchb. F.

Emeli Loreth Baquero Mendoza. ID. 639523.

Brandon Smith Quintero Ardila. ID. 651425.

Andrés Julián Montes Montenegro. ID. 638666.

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero

Agroecológico

tutor/asesor externo

I.A. Msc. Natalia Andrea Romero Dávila.

Corporación Universitaria Minuto de Dios

Vicerrectoría Regional Orinoquía

Sede Villavicencio (Meta)

Programa Ingeniería Agroecológica

octubre de 2022

Dedicatoria

Este trabajo de grado lo dedicamos principalmente a Dios, por habernos dado la vida y permitirnos haber llegado a este momento tan importante de nuestra formación profesional.

A nuestros padres Nelson Quintero (QEPD), Yuli Ardila, Omar Baquero, Olga Mendoza, Hugo Montes y Julia Montenegro. Por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido el orgullo y privilegio de ser sus hijos, son los mejores padres.

A personas que conocimos en nuestro camino y volvimos amigos por estar siempre presentes acompañándonos y por el apoyo moral que nos brindaron a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.

A la corporación universitaria Minuto de Dios que nos ha apoyado y ha hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y nos compartieron sus conocimientos.

Agradecimientos

Queremos extender un profundo agradecimiento y respeto a quienes con su apoyo y dedicación aportaron para hacer posible este proyecto de grado, como primero a nuestra directora de tesis, la ingeniera Msc. Natalia Andrea Romero Dávila. Por otro lado, agradecemos al macro proyecto titulado “Estudios Preliminares Para Establecer La Viabilidad Agroeconómica En La Producción De Las Especies *Vanilla Phaeantha Rchb F Y Rodriguezia venusta Rchb. F.* Mediante La Micropropagación *In vitro*, Con Fines De Reconversión Productiva Del Departamento Del Meta” que hace parte de la IX CONVOCATORIA PARA EL DESARROLLO Y FORTALECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN EN UNIMINUTO. Por medio del cual obtuvimos la financiación de los materiales e insumos y el acompañamiento del investigador líder y de la co-investigadora, la ingeniera Msc. Nubia Cruz por brindarnos de su conocimiento, que, gracias a sus consejos, y correcciones, logramos culminar este trabajo.

Contenido

Lista de tablas	7
Lista de figuras.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción	11
CAPÍTULO I	13
1 Problema	13
1.1 Planteamiento del problema.....	13
1.2 Pregunta de investigación	15
1.3 Objetivos.....	16
1.3.1 Objetivo general.....	16
1.3.2 Objetivos específicos	16
1.4 Justificación	17
CAPÍTULO II.....	19
2 Marco referencial	19
2.1 Marco conceptual.....	20
2.1.1 Biotecnología para la conservación	20
2.1.2 Micropropagación sexual.....	20
2.1.3 Micropropagación <i>in vitro</i>	21
2.1.4 Ácido indol acético	23
2.1.5 Murashige & Skoog	23
2.2 Orquídeas	23
2.2.1 Generalidades.....	23
2.2.2 Distribución de las orquídeas.....	26
2.2.3 División taxonómica	27
2.2.4 Morfología de las orquídeas.....	27
2.2.5 <i>Rodriguezia</i>	29
2.2.6 Generalidades morfológicas de la <i>Rodriguezia</i>	29
2.2.7 Clasificación botánica de <i>Rodriguezia venusta L</i>	30
2.2.8 Etimología.....	31
2.3 Morfología de <i>Rodriguezia venusta L</i>	32

2.3.1	Hoja.....	33
2.3.2	Flor.....	34
2.4	Distribución General de <i>Rodriguezia venusta L</i> o <i>Rodriguezia bracteata V</i>	34
2.5	Marco de antecedentes.....	35
2.6	Marco legal.....	37
CAPÍTULO III.....		40
3	Metodología y Diseño Experimental.....	40
3.1	Ubicación geográfica del área de estudio.....	40
3.2	Caracterización biofísica en la granja agroecológica UNIMINUTO, Villavicencio-Meta.....	41
3.2.1	Metodología.....	44
3.2.2	Recolección de semillas.....	45
3.2.3	Proceso de micropropagación.....	46
3.2.4	Diseño experimental.....	47
3.3	Materiales y Métodos.....	48
3.3.1	Recursos de la investigación.....	48
3.3.2	Instrumentos y materiales.....	48
CAPÍTULO IV.....		49
4	Resultado.....	49
4.1	Análisis de Resultados.....	49
4.1.1	Fase de Laboratorio.....	49
4.1.2	Preparación de medios de cultivo.....	50
4.1.3	Tratamientos de desinfección de la capsula.....	51
4.1.4	Determinación de respuesta de las semillas de <i>Rodriguezia venusta L</i>	58
Conclusiones.....		64
Recomendaciones.....		65
Referencias.....		66

Lista de tablas

Tabla 1.....	27
Tabla 2.....	30
Tabla 3.....	30
Tabla 4.....	32
Tabla 5.....	38
Tabla 6.....	53
Tabla 7.....	56

Lista de figuras

Figura 1	26
Figura 2	28
Figura 3	32
Figura 4	33
Figura 5	33
Figura 6	34
Figura 7	35
Figura 8	40
Figura 9	42
Figura 10	43
Figura 11	45
Figura 12	46
Figura 13	47
Figura 14	51
Figura 15	52
Figura 16	54
Figura 17	60
Figura 18	60

Resumen

La sobre explotación de las orquídeas impulsa la búsqueda de nuevas alternativas que permitan la preservación y conservación de especies en condición de vulnerabilidad, por diferentes factores antrópicos; La siguiente investigación evaluó el proceso de reproducción *in vitro* por semilla de la orquídea *Rodriguezia venusta* Rchb. F. estableciendo el tiempo de respuesta morfogénica del embrión de la semilla, para los diferentes estudios de desarrollo *in vitro*. Por medio de la utilización de dos reguladores de crecimiento (Ácido Indolacético, Giberelina) suplementados en medio de cultivo *in vitro* en concentraciones equivalentes a 10, 50 y 100 mg-10/litro para cada uno de ellos. Por otro lado, el porcentaje de formación de protocormos logrados a partir de la utilización de estos bioreguladores de crecimiento al mismo tiempo, complementados en medio de cultivo con las mismas equivalencias, para cada uno de estos; sin embargo, bajo las condiciones del laboratorio de la granja agroecológica y las semillas recolectadas allí, no presentaron desarrollo de protocormos ni variación morfofisiológica en las semillas, durante los 4 meses de evaluación.

Palabras clave: Semillas, Micropropagación *in vitro*, Conservación, Preservación, Acido Indolacético, Giberelina, Reguladores.

Abstract

The overexploitation of orchids drives the search for new alternatives that allow the preservation and conservation of species in vulnerable conditions, due to different anthropic factors; The following research evaluated the in vitro reproduction process by seed of the orchid *Rodriguezia venusta* Rchb. F. establishing the morphogenic response time of the seed embryo, for the different in vitro development studies. By means of the use of two growth regulators (Indolacetic Acid, Gibberellin) supplemented in in vitro culture medium in concentrations equivalent to 10, 50 and 100 mg-10/liter for each one of them. On the other hand, the percentage of protocorms formation achieved from the use of these growth bioregulators at the same time, supplemented in culture medium with the same equivalences, for each one of them; however, under the conditions of the laboratory of the agroecological farm and the seeds collected there, did not present protocorms development nor morpho-physiological variation in the seeds, during the 4 months of evaluation.

Keywords: Seeds, In vitro micropropagation, Conservation, Preservation, Indolacetic acid, Gibberellin, Regulators.

Introducción

Colombia por su topografía revela características especiales, predominada principalmente por la cordillera de los andes (occidental, central y oriental) la cual nos brinda un componente de biodiversidad amplio teniendo en cuenta que el país tiene los mayores índices de biodiversidad en el mundo. (Andrade Correa, 2011) Debido a su localización, se generan una gran variedad de micro y meso climas en varias regiones del país, ya que se encuentra en una zona tropical y esto hace que en diferentes regiones el clima tenga un cambio respecto a la situación geográfica y en relación con el nivel del mar. (IDEAM - UNAL, 2018) Gracias a estas condiciones generadas por la localización geográfica, Colombia es reconocido mundialmente como uno de los países con el mayor número de orquídeas en el mundo con 4.270 ejemplares, (Calderón-Sáenz, 2006) debido a su variedad climática y topografía, se evidencia una gran tasa de heterogeneidad de hábitats establecidos en las regiones; según Sarmiento Téllez & Betancur (2006) en Colombia se han encontrado 1.572 especies de orquídeas endémicas, representando un valor alto y significativo en relación con la biodiversidad que se encuentra en las regiones y que por factores antrópicos se han ido perdiendo a través de los años. (Ministerio de ambiente y desarrollo, 2015)

Según Espejo et al, (2002, citado por Duarte,2014) las orquídeas se consideran las plantas más evolucionadas del reino vegetal porque muestran una gran complejidad y experiencia en la morfología de las flores y los tipos de polinización; lo anterior es el resultado de muchos ajustes estructurales y funcionales, algunos de las más interesantes son los relacionados con sus semillas y los procesos relacionados con la germinación y el desarrollo de las plántulas, del mismo modo, las formas de vida en la familia son muy diversas, desde el punto de vista ecológico, muchos miembros de la familia son componentes importantes de la variada vegetación.(Espejo et al, 2002)

Las orquídeas tienen altos requerimientos respecto a sustratos, hospederos, polinizadores y hongos micorrícicos, también son muy específicos en términos de condiciones climáticas (Espinosa-Moreno et al., 2000) por lo tanto, existe un mayor conocimiento de los factores bióticos y abióticos que determinan la distribución y el desarrollo de las orquídeas en su entorno, lo cual nos permite saber en qué parte de su hábitat natural se pueden desarrollar o mejorar las estrategias de preservación y protección existentes. (Rodríguez & Bravo, 2020)

La presente investigación se orientó en estudiar el proceso de reproducción de la especie *R. venusta.*, mediante la micropropagación *in vitro*, debido a que los cambios ecológicos generados por la deforestación, el cambio climático y la pérdida de biodiversidad entre otras, evidencian la necesidad de usar la biotecnología como fuente de reserva genética de las especies y aprovechamiento económico; es así como el presente trabajo permitirá evaluar el comportamiento de las semillas de la orquídea *R. venusta.* para adaptarse al nuevo ambiente artificial y de esta manera profundizar en los conocimientos teóricos sobre nuevas alternativas de propagación vegetal que garanticen su supervivencia y repoblamiento.

CAPÍTULO I

1 Problema

1.1 Planteamiento del problema.

Colombia por su topografía revela características especiales, predominada principalmente por la cordillera de los andes (occidental, central y oriental) la cual nos brinda un componente de biodiversidad amplio teniendo en cuenta que el país tiene los mayores índices de biodiversidad en el mundo. (Andrade Correa, 2011) Debido a su localización, se generan una gran variedad de micro y meso climas en varias regiones del país, ya que se encuentra en una zona tropical y esto hace que en diferentes regiones el clima tenga un cambio respecto a la situación geográfica y en relación con el nivel del mar. (IDEAM - UNAL, 2018) Gracias a estas condiciones generadas por la localización geográfica, Colombia es reconocido mundialmente como uno de los países con el mayor número de orquídeas en el mundo con 4.270 ejemplares, (Calderón-Sáenz, 2006) debido a su variedad climática y topografía, se evidencia una gran tasa de heterogeneidad de hábitats establecidos en las regiones; según Sarmiento Téllez & Betancur (2006) en Colombia se han encontrado 1.572 especies de orquídeas endémicas, representando un valor alto y significativo en relación con la biodiversidad que se encuentra en las regiones y que por factores antrópicos se han ido perdiendo a través de los años. (Ministerio de ambiente y desarrollo, 2015)

Según Espejo et al, (2002, citado por Duarte,2014) las orquídeas se consideran las plantas más evolucionadas del reino vegetal porque muestran una gran complejidad y experiencia en la morfología de las flores y los tipos de polinización; lo anterior es el resultado de muchos ajustes estructurales y funcionales, algunos de las más interesantes son los relacionados con sus semillas y los procesos relacionados con la germinación y el desarrollo de las plántulas, del mismo modo,

las formas de vida en la familia son muy diversas, desde el punto de vista ecológico, muchos miembros de la familia son componentes importantes de la variada vegetación.(Espejo et al, 2002)

Las orquídeas tienen altos requerimientos respecto a sustratos, hospederos, polinizadores y hongos micorrícicos, también son muy específicos en términos de condiciones climáticas (Espinosa-Moreno et al., 2000) por lo tanto, existe un mayor conocimiento de los factores bióticos y abióticos que determinan la distribución y el desarrollo de las orquídeas en su entorno, lo cual nos permite saber en qué parte de su hábitat natural se pueden desarrollar o mejorar las estrategias de preservación y protección existentes(Rodríguez & Bravo, 2020).

La presente investigación se orientó en estudiar el proceso de reproducción de la especie *R. venusta.*, mediante la micropropagación *in vitro*, debido a que los cambios ecológicos generados por la deforestación, el cambio climático y la pérdida de biodiversidad entre otras, evidencian la necesidad de usar la biotecnología como fuente de reserva genética de las especies y aprovechamiento económico; es así como el presente trabajo permitirá evaluar el comportamiento de las semillas de la orquídea *R. venusta.* para adaptarse al nuevo ambiente artificial y de esta manera profundizar en los conocimientos teóricos sobre nuevas alternativas de propagación vegetal que garanticen su supervivencia y repoblamiento.

1.2 Pregunta de investigación

¿Evaluando el proceso de Micropropagación *in vitro* podemos determinar el tiempo y porcentaje de formación de protocormos de la *R. venusta* en Villavicencio-Meta?

¿Qué consecuencias evalúa el proceso de Micropropagación *in vitro* como fuente de reserva de la *R. venusta* en Villavicencio-Meta?

¿Los reguladores de crecimiento Acido indolacético y Giberelina influyen en la formación de protocormos en el proceso de Micropropagación *in vitro* a partir de la semilla de *R. venusta*?

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo general.

- Evaluar el proceso de propagación *in vitro* de semillas de la especie *R. venusta*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de dos reguladores de crecimiento sobre la germinación *in vitro* de la semilla de *R. venusta*.
- Evaluar el porcentaje de formación de protocormos obtenidos a partir de la utilización de dos reguladores de crecimiento (Ácido Indolacético, Giberelina) suplementados en medio de cultivo *in vitro* equivalentes a 10, 50 y 100 mg -10/litro para cada uno de ellos.
- Establecer el tiempo de respuesta morfogénica del embrión de la semilla *R. venusta*., para los diferentes estadios de desarrollo *in vitro*, a partir de la utilización de dos reguladores de crecimiento (Ácido Indolacético, Giberelina) suplementados en medio de cultivo *in vitro* bajo distintas concentraciones.

1.4 Justificación

Las orquídeas son la familia de plantas más numerosa del reino vegetal, con unas 25.000 especies. (Beltrán Rodríguez & Díaz Camelo 2016) la familia Orchidaceae se ha podido establecer en casi todos los ambientes de la tierra, gracias a su capacidad adaptativa para soportar distintas condiciones climáticas de zonas tropicales, a excepción de 300 especies que se encuentran en zonas desérticas y muy frías. (Calderón-Sáenz, 2006)

Según el ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, (2015) la orquídea trae consigo diversos valores agregados entre los cuales se destacan los siguientes: ornamentales, medicinales, aromáticos y afrodisiacos, razones por las que son tan apetecidas y se encuentran en extinción.

La sobreexplotación de las orquídeas impulsa a buscar alternativas que permitan la preservación y conservación de especies en estado de vulnerabilidad por factores antrópicos; En el año 2010 el Instituto Alexander Von Humboldt y la Red Nacional de Jardines Botánicos, implementaron la Estrategia Nacional para la Conservación de Plantas a nivel regional; con esta iniciativa lograron conceptualizar y definir planes de manejo de especies prioritarias para la conservación de estas.

En el año 2012 se realizó un taller para priorizar las especies vegetales de la Región de la Orinoquía, en el que se identificaron 73 especies prioritarias de conservación dentro de las que se encuentra la especie *R. venusta*. (Calderón-Sáenz, 2006)

De igual manera, en ese mismo año 2012 se dio prioridad a especies representativas de la Orinoquía, sin embargo, la aprobación del decreto 2106 de 2019 en el parágrafo 2° del artículo 125 del Capítulo IX, con el cual se eliminó el requisito que garantizaba la protección a las especies de flora silvestres, en estado de amenaza, como las orquídeas, brómelias, robles, palma de cera elimina el trámite de levantamiento de veda vulnerando y poniendo en riesgo el estado de

conservación de especies que habían sido identificadas como prioritarias para su conservación e impide gestionar los planes que garanticen la preservación del germoplasma, como es el caso de la *R. venusta*.

Debido a lo anteriormente expuesto es necesario establecer esquemas de protección para especies amenazadas en su hábitat, con programas de propagación *ex situ*, implementando técnicas que garanticen su estabilidad genética permitiendo su conservación, a través de planes y proyectos de investigación académico y científico, además de que se conviertan en una alternativa económica mediante programas de innovación tecnológica.

CAPÍTULO II

2 Marco referencial

Colombia hospeda aproximadamente una décima parte de las 300.000 especies de plantas con flores que se estiman en el planeta (Ibarra. et al; 2018) solo hablando de orquídeas, Colombia es uno de los países del mundo con el mayor número reportado con un total de 4.270 especies registradas (Ministerio de ambiente y Universidad Nacional de Colombia, 2015) este escenario de riqueza biológica, en términos de flora nativa, hace que sea necesario definir y desarrollar acciones para su conservación, con miras a garantizar la perdurabilidad de los recursos florísticos y genéticos. Dicha conservación puede lograrse, en muchos casos, a través de la definición y de la implementación de acciones de uso sostenible de la flora nativa; como lo establece la Política Nacional para la Gestión Integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos – PNGIBSE, (Ministerio de ambiente, 2012) la conservación de la biodiversidad debe ser entendida en un sentido amplio, es decir: “como el resultado de una interacción entre sistemas de preservación, restauración, uso sostenible y construcción de conocimiento e información”.

Las orquídeas son uno de los recursos vegetales más importantes, no solo por su reconocimiento emblemático, en Colombia la *Cattleya trianae* es considerada la flor nacional, sino también por su potencial en procesos de recuperación y conservación de hábitats naturales, consideradas de gran importancia para la sostenibilidad ambiental. Es posible aprovechar las orquídeas, considerando su abundancia, diversidad y calidad; por lo que el uso de las biotecnologías es importante para promover el conocimiento de los procedimientos agronómicos que garanticen su preservación y multiplicación.

2.1 Marco conceptual

2.1.1 Biotecnología para la conservación

Según la Comisión Nacional de los Derechos Humanos (CNDH) de México la biotecnología consiste entonces en un gradiente de tecnologías que van desde las técnicas de la biotecnología "tradicional", largamente establecidas y ampliamente conocidas y utilizadas (fermentación de alimentos, control biológico), hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del ADN recombinante (llamadas de ingeniería genética), los anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos. Históricamente, la biotecnología implicaba el uso de organismos para realizar una tarea o función. Biotecnología implementada para la recuperación de especies. (Cruz-Pizarro, 2012)

2.1.2 Micropropagación sexual

Según Gaudencio-Sedano et al (2015) la propagación sexual en las orquídeas se puede realizar por semillas, deben ser cultivadas en laboratorio ya que la orquídea produce un gran número de semillas, miles por cada fruto, incluso hasta dos millones de semillas, son de un tamaño como granos de polvo. En condiciones naturales sólo unas cuantas logran germinar debido a que casi no tienen sustancias de reserva y requieren ser colonizadas por un hongo micorrízico específico para cada especie de orquídea, el cual hace sinergia proporcionando los nutrientes necesarios para germinar y desarrollarse.

2.1.3 Micropropagación *in vitro*

Según Castillo (2008) el cultivo *in vitro* es la técnica para reproducir plantas dentro de un frasco de vidrio creando un ambiente artificial; la implementación de esta técnica conlleva dos procedimientos que son fundamentales para su desarrollo, la asepsia que garantiza obtener plantas libres de bacterias, hongos y virus, y la producción que conlleva a la obtención de gran cantidad de plantas durante periodos de tiempo relativamente cortos y sin requerir mucha infraestructura asociada al proceso; Haberlandt fue un científico alemán quien postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. (Santamaría-Jiménez, 2012, p. 18).

Como todo método de propagación vegetal la biotecnología tiene ventajas y desventajas, en el caso de la micropropagación *in vitro*, esta tecnología requiere personal especializado, que cuente con la suficiente experticia para garantizar el adecuado desarrollo de las actividades requeridas en laboratorio; teniendo en cuenta esto, unas de las principales desventajas son:

- La construcción y el mantenimiento de la infraestructura especializada.
- Altos costos de equipo e implementos.
- Estrictos protocolos que garanticen la asepsia en los espacios de trabajo.
- Implementación de infraestructura asociada de seguridad y salud en el trabajo.
- Riegos asociados a la implementación de sustancias químicas, entre otras.

Igualmente, una de las mayores desventajas de esta técnica, es la ausencia de protocolos de micropropagación universales, razón por la cual se generó el interés y la motivación para desarrollar este proyecto destinado a establecer un protocolo de micropropagación para la *R.*

venusta, o en general crear uno para cada especie y cultivar (Cruz-Pizarro, 2012).

Por otro lado, el uso de estas biotecnologías novedosas tiene implícitas ventajas comparativas con respecto a los métodos tradicionales de propagación tales como:

- Utilización de diferentes partes de la planta en pequeñas proporciones de tamaño, en relación con los métodos convencionales de propagación vegetal.
- Permite una rápida multiplicación de individuos con características homogéneas.
- Ahorro de tiempo y costos en comparación con los métodos convencionales.
- Producción de plantas inocuas.
- Facilita la parametrización de los insumos requeridos para el proceso de propagación tales como: suministro de nutrientes, implementación de reguladores de crecimiento, suministro controlado de luz y temperatura).
- Obtención de grandes cantidades de plantas en pequeños espacios, entre otras.

En la actualidad, con la implementación de estas tecnologías innovadoras y teniendo en cuenta las ventajas que brindan, podemos rescatar y preservar gran parte del material genético que se ha venido perdiendo a lo largo de los años en Colombia por diferentes factores; de esta manera con la implementación de estas biotecnologías podemos garantizar que las futuras generaciones conozcan la gran variedad de especies y sus valores culturales. (Núñez & Mariño, 2008).

2.1.4 Ácido indol acético

Es una auxina natural vigente en la gran mayoría de las plantas. Siendo una hormona vegetal que regulariza los numerosos métodos del desarrollo vegetal, debido a que su aplicación en la agricultura es muy usual. (Castillo-Morales,2004) En la actualidad la utilización de auxinas obtenidas por síntesis química, la síntesis microbiológica de estas sustancias resulta de gran importancia gracias a la aplicación de caldos de fermentación que contienen auxinas, la cual logra componer una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica. (Vega-Calderón et al.,2016).

2.1.5 Murashige & Skoog

Según Hurtado & Merino, (1987) citado por Pedrosa & caballero (2009). El Murashige & Skoog se utiliza como un suplemento para medio de cultivo, debido a que contiene gran variedad de nutrientes esenciales que favorecen a las plantas convirtiéndolo en el suplemente más usado en las técnicas de micropropagación *in vitro*.

2.2 Orquídeas

2.2.1 Generalidades

la familia *Orchidaceae* es una de los grupos de plantas con flores, o angiospermas, con más especies en el planeta, ocupando probablemente el primer lugar en riqueza. Sin embargo, dado su tamaño y complejidad taxonómica, es difícil tener una estimación acertada sobre el número de especies que contiene. (Betancur et al., 2015) En Colombia por su condición geográfica, la amplia distribución de la especie y su alto interés comercial-ornamental existe la tendencia a que las especies desaparezcan de sus hábitats naturales, por consiguiente, su preservación tiende a convertirse en una tarea muy complicada para los diferentes grupos interesados en su conservación.

En el piedemonte llanero, se identifica la sobreexplotación de especies de la familia *orchidaceae* esto debido a la ausencia de control por parte de entidades del estado en áreas poco protegidas, razón por la cual la conservación de especies como la *Rodriguezia venusta* Rchb. F. se hace prioritaria para conservar las funciones ecosistémicas de la región.

Los 274 géneros de las orquídeas se encuentran distribuidas en el país de la siguiente manera 65% de ellas en la región Andina, 14% en la región Pacífica, 9% en la Amazonia, 8% en el Caribe y 4% en la Orinoquía; (Perdomo, Coca y Trujillo, 2020) presentando el mayor índice de plantación los departamentos de Cundinamarca y Antioquia estableciendo plantaciones con fines ornamentales, culinarios, cosmetología farmacéuticos y perfumería entre otros. (Carrión et al., 2012)

Según el Fondo Mundial Para La Naturaleza WWF, (2018) las orquídeas son muy requeridas por sus exóticas características despertando interés y convirtiéndolas en blanco de comercio ilegal, además, muchas de estas especie se encuentran en peligro o amenazadas debido al uso desmedido de agroquímicos, la deforestación, la contaminación y la recolección indiscriminada; es por esto que se ha despertado el interés de crear más plantaciones que permitan la conservación de especies *in situ* y *ex situ* de reservas naturales con el fin de disminuir la pérdida de orquídeas silvestre que contienen germoplasma valioso para el equilibrio ambiental. sin embargo, la propagación vegetativa utilizada tradicionalmente en orquídeas no es una opción para la recuperación de material genético, ya que se requieren de muchas plantas, gran infraestructura y por consiguiente adaptabilidad climática. (Ribon-Barragan & Bernal-Pérez,2020)

En este sentido, el cultivo de células y tejidos vegetales ofrece múltiples oportunidades agrícolas debido a que se aprovecha la capacidad de totipotencia, dediferenciación celular y rizogénesis que poseen las plantas permitiendo regenerar un tejido para dar paso a una nueva planta (Baracaldo-Huertas & Velasco-Triana, 2018)

La familia *Orchidaceae* se caracteriza por su gran número de especies, la gran variedad de formas y colores que manifiestan sus flores además de la gran diversidad de tamaños. Las orquídeas están presentes en casi todos los ecosistemas del planeta, excepto en regiones con nieves perpetuas o en ambientes extremadamente desérticos por esto se le consideran plantas cosmopolitas. (Torres & Flórez, 2018)

Las orquídeas también tienen diferentes hábitos de crecimiento, la mayoría son epífitas y viven sobre árboles hospederos (forófitos) u otras estructuras como cables de luz, líneas telefónicas o tejados, cabe resaltar que no son plantas parasitas; algunas son terrestres creciendo sobre muchas tipos de sustratos, otras son rupícolas o litofíticas al vivir sobre rocas, y algunas pocas especies son acuáticas, pues viven asociadas a fuentes de aguas no contaminadas, (Torres & Flórez, 2018) por ultimo están las crecen subterráneas que solo emergen cuando florecen Cavero et al; (1991) citados por Recuay & Rodriguez,2010) . Se calcula que el 93% de las especies de orquídeas tropicales son epífitas y que muchas de las especies terrestres crecen en el sotobosque, el cual se caracteriza por tener ambientes menos iluminados, mayor humedad y suelos ricos en materia orgánica. (Betancur et al., 2015)

Las orquídeas juegan un papel de gran interés en los esfuerzos nacionales de conservación, en virtud de su importancia como especies carismáticas, muchas con valor comercial y por ser un grupo “bandera” cuya conservación ayudará a proteger muchas otras especies y hábitats (Gartner & Jorge, 2010).

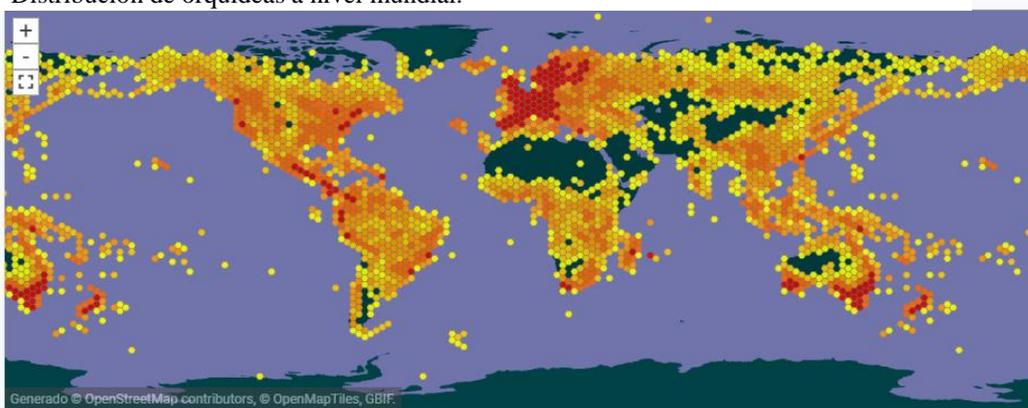
2.2.2 Distribución de las orquídeas

Según autores como Tegeda et al., (2017) y por (Cárdenas & Cruz 2012) distribuidas en los en la zona tropical o subtropical. Lamayoría se localiza entre el sureste de Asia hasta Indonesia y Australia, en segundo lugar, está la zona comprendida entre África y Madagascar y una tercera zona que va desde México hasta Brasil. Por sus diversos procesos adaptivos, las orquídeas han colonizado casi cualquier región del planeta.

A continuación, los autores muestran en la figura 1, el proceso de colonización y establecimiento a nivel mundial de las orquídeas.

Figura 1

Distribución de orquídeas a nivel mundial.



Nota: Según la The World Checklist of Vascular Plants muestra la distribución de orquídeas reconocidas a nivel mundial registradas hasta el mes de septiembre 2022. Fuente: [The World Checklist of Vascular Plants \(WCVF\)](#)

2.2.3 División taxonómica

Tabla 1

La división taxonómica de las orquídeas hasta el 2011.

Reino	División	Clase	Orden	Familia	Subfamilias
<i>Plantae</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Liliopsida</i>	<i>Orchidales</i>	<i>Orchidaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Epidendroideae • Orchidoideae • Vanilloideae • Cypripedioideae • Apostasioideae

Fuente: Menchaca, R. (2011).

2.2.4 Morfología de las orquídeas.

2.2.4.1 Raíz

Las orquídeas presentan en sus raíces una especialización conocida como “velamen”, el cual corresponde a una capa de células que protege la epidermis y que funciona como una esponja, permitiendo que la planta absorba rápidamente la humedad contenida en el ambiente. (Betancur et al., 2015). Según Menchaca & Moreno (2011) citados por Bohórquez & Reyes (2019) las raíces de las orquídeas pueden crecer en todas direcciones y sirven para la sujeción ya que abrazan troncos o ramas de árboles, generalmente están cubiertas de hongos llamados micorrícicos que ayudan a la absorción de nutrientes.

2.2.4.2 Tallo

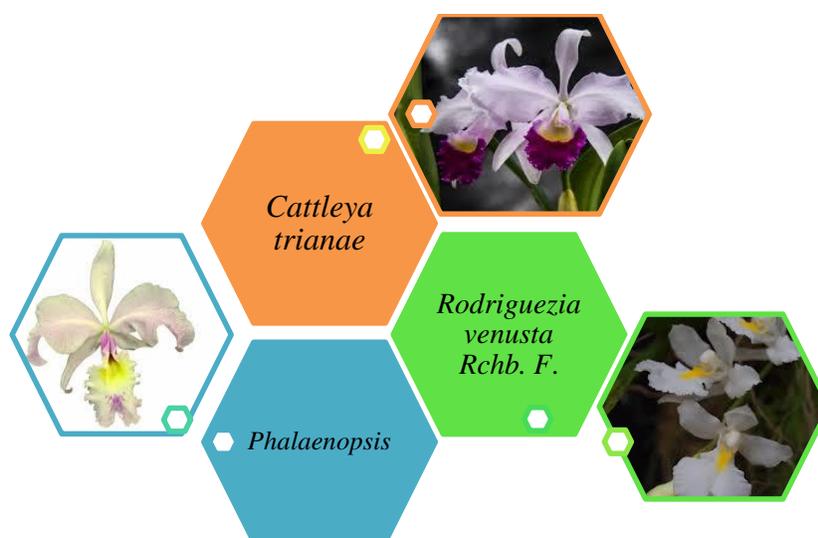
Gran variedad de ellas presenta tallos modificados que pueden ser aéreos llamados pseudobulbos o subterráneos llamados tubérculos. Estos órganos son fundamentales para la supervivencia de las plantas y les permite soportar condiciones extremas de sequía almacenando sustancias de reserva. (Gartner & Jorge, 2010)

2.2.4.3 Flor

Las flores de las orquídeas son en su mayoría hermafroditas (ambos sexos en la misma flor), zigomorfas (con un solo plano de simetría), y trímeras (al tener tres sépalos y tres pétalos). Uno de los tres pétalos está modificado y es denominado labelo; además, puede tener una gran variedad de formas, colores y ornamentaciones, siendo por lo general el más llamativo. (Torres & Flórez, 2018).

Figura 2

Flores de algunas orquídeas



Fuente: Los autores.

2.2.4.4 Hojas

En todas las orquídeas, las hojas son siempre simples, es decir 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). En las epífitas, la regla general es la de tener hojas gruesas, con una cutícula de cierto espesor y encerada, que les permite resistir no sólo la depredación por insectos, sino también los fuertes vientos de los trópicos y subtropicos. (Chaparro, 2018)

2.2.5 Rodriguezia

Según Calixto, (2017) *Rodriguezia* es un género que fue descrito hace mucho tiempo por los botánicos españoles Ruiz y Pavón, es una especie de plantas epifitas robustas que llegan alcanzar los 35 cm de alto, con rizoma corto, tallos altos distanciados, hojas coriáceas planas, presencia de flores entre 3-5 cada una; se distribuye por Perú, Argentina, Brasil, México y Colombia, su floración varía entre los meses de marzo a mayo, agosto a diciembre y septiembre a diciembre, se establecen sobre las ramas y troncos de los árboles, sus raíces no penetran la corteza del árbol, por lo que no le hacen daño como lo haría una planta parásita, ya que solo crecen sobre el tronco o la rama del árbol que las soporta (epifitas), estas orquídeas obtienen sus nutrientes del aire, del agua de lluvia y de los desechos de la corteza de los árboles.

2.2.6 Generalidades morfológicas de la *Rodriguezia*

A continuación, en la tabla 2 se presentan las características del género *Rodriguezia* registrados hasta la fecha. Según Raz & Agudelo-Zamora (2021) la *R. venusta* se encuentra distribuida en gran variedad de países, no se identifica debido a que algunos autores usan sinónimos monotípicos, es decir, que su nombre va cambiando.

Tabla 2
Generalidades morfológicas del género de *la Rodriguezia*

Genero	Especie	Generalidades	Morfología	Estructura vegetativa	Referencia.
<i>Rodriguezia</i>	<i>Rodriguezia venusta</i> L. Sinónimo homotípico: • <i>Burlingtonia venusta</i> Lindl. • <i>Epidendrum bracteatum</i> . • <i>Rodriguezia bracteata</i> . Sinónimos heterotípico. • <i>Burlingtonia Vensuta</i> Lindl. • <i>Rodriguezia Caloplectron</i> .	plantas epifitas robustas. Necesita de saprofito para sobrevivir, se distribuye desde Brazil,Ecuador, panamá a Perú y en Colombia se encuentra Cundinamarca, Antioquia, Boyacá, Magdalena, Narifio, Norte de Santander y Valle del Cauca Hace fotosíntesis, no es parasita.	<ul style="list-style-type: none"> • alcanza los 35 cm de alto. • con rizoma corto. • Hojas coriáceas planas. • Tienen Pseudobulbos • Son monocotiledonias 	Simpodial	Ordoñez,J, Parrado,A. (2016).Referencia-fenología-clima de cuatro especies de orquídeas En un bosque altoandino de Colombia, vol. 17, núm. 1, pp. 1-15, tomado de: https://doi.org/10.15517/lank.v17i1.27897 Bernal, R., Gradstein, S.R. & Celis, M. (eds.). 2015. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co
<i>Rodriguezia</i>	<i>Rodriguezia granadensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Se encuentra entre 700 y 1900 m de altitud. • plantas epifitas • representante de la flora andina. • Se halla en bosque húmedo premontano 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiene una hoja por cada pseudobulbo. • Su semilla es fusiforme. • Tinene e 1-a 2 flores por pseudobulbo. 	Simpodial	Pulido,R. (2020). ACTIVIDAD POLIFENOLOXIDASA DURANTE LA INTERACCIÓN DE SEMILLAS DE <i>Rodriguezia granadensis</i> EXPUUESTA A ENDÓFITOS AISLADOS DEL ESTADO SILVESTRE. Recuperado de: http://repository.ut.edu.co/bitstream/001/3449/1/CD1076.pdf
<i>Rodriguezia</i>	<i>Rodriguezia arevaloi</i> Schltr	<ul style="list-style-type: none"> • Endémica de Colombia. • Semi-epifitas crece en zonas semi sombreadas. • Su flor es blanca con amarillo. • Solo ha sido estudiada en Santa Maria, Boyacá. 	Crece hasta los 25cm de altura. hojas oblongadas, ápice agudo, inflorescencia de 16cm de largo. Flores con olor dulce. Pseudobulbos heteroblásticos	Simpodial	Giraldo,D;Betancur,J. (2011).Guía de campo de las orquídeas de Santa Maria,Boyacá. Tomado de: http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros_Colecciones/Guias_ICN/9/Orquideas_SM_ebook2017.pdf

Fuente: Raz & Agudelo- Zamora (2021). Catálogo de Plantas y Líquenes de Colombia. Versión 1.2. Universidad Nacional de Colombia. Checklist dataset <https://doi.org/10.15472/7avdhn> accessed via GBIF.org on 2022-10-29

2.2.7 Clasificación botánica de *Rodriguezia venusta* L

A continuación, en la tabla 3 los autores presentan la clasificación botánica de la orquídea

R. venusta

Tabla 3

División	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
Manoliophyta.	Liliopsida.	Asparagales.	<i>Orchidaceae.</i>	<i>Rodriguezia.</i>	<i>Rodriguezia venusta</i> L.

Fuente: Raz & Agudelo- Zamora (2021). Catálogo de Plantas y Líquenes de Colombia. Versión 1.2. Universidad Nacional de Colombia. Checklist dataset <https://doi.org/10.15472/7avdhn> accessed via GBIF.org on 2022-10-29

2.2.8 Etimología

El género *Rodriguezia* fue descrito por dos botánicos Ruiz & Pavón Estudiosos de la flora latinoamericana quienes dedicaron este género a Antonio Manuel Rodríguez de Veda un ilustre botánico español. (Sauleda, 2012)

2.2.8.1 Venusta

Que hace relación a la diosa y Venus que para la mitología Romana simboliza belleza hermosura y fertilidad.

2.2.8.2 Nombre común

Hermosa Rodriguezia

Encantadora

Pascuas

Angelito llanero

2.2.8.3 Nombre científico

Según Waldvogel 1983 *R. venusta* tiene sinónimos y el más común es *Rodriguezia bracteata* V seguido de:

Burlingtonia venusta Lindl.

Epidendrum bracteatum.

Como también posee Sinónimos heterotipico.

Burlingtonia Vensuta Lindl.

Rodriguezia Caloplectron.

2.3 Morfología de *Rodriguezia venusta* L

A continuación, en la tabla 4 se generaliza la morfología de *R. venusta*.

Tabla 4

Raíz	Tallo	Hojas	Semillas	Flor.	Fuente
<ul style="list-style-type: none"> Raíces aéreas forradas por fundas de células muertas llamadas velamen. Crecen en todas las direcciones ayudando a la planta a sujetarse mejor. 	<ul style="list-style-type: none"> Algunos cumplen la función de ser reservorios de agua y nutrientes. Su tamaño varía unos son largos, gruesos, rastreros y colgantes. Determinan el crecimiento, pueden ser simpodial y <u>monopodial</u>. 	<ul style="list-style-type: none"> Escamiformes. Suculenta. Cilíndricas. <u>Acintadas</u>. 	<ul style="list-style-type: none"> Son monocotiledóneas. Se encuentran filiformes o cilíndrica. Su dispersión se hace generalmente del viento. Su tamaño en micra oscila entre 1-22 microgramos. 	<ul style="list-style-type: none"> Los sépalos (verticilos) internos y externos son similares en color y forma. Lo que se conoce como pétalo restante es llamado labelo y suele ser distinto en forma y color. 	<ul style="list-style-type: none"> Pulido, R. (2020). ACTIVIDAD POLIFENOLOXIDASA DURANTE LA INTERACCIÓN DE SEMILLAS DE <i>Rodriguezia granadensis</i> EXPUESTA A ENDÓFITOS AISLADOS DEL ESTADO SILVESTRE. Recuperado de: http://repositorio.ut.edu.co/bitstream/001/3449/1/CD1076.pdf

Fuente: Los autores.

Se caracteriza por tener múltiples y delgadas raíces como se observa en la figura 3, Rizoma acordonado del cual emergen Pseudobulbos heteroglasticos lisos, lateralmente a cada pseudobulbos como se ve en la imagen 4, le emergen 2 vainas foliares que sirven en ocasiones para proteger la inflorescencia que puede variar en una longitud entre 12 y 15 cm y poseer múltiples flores, tal como se muestra en la figura 5.

Figura 3

Raíces de *Rodriguezia venusta* Rchb. F.

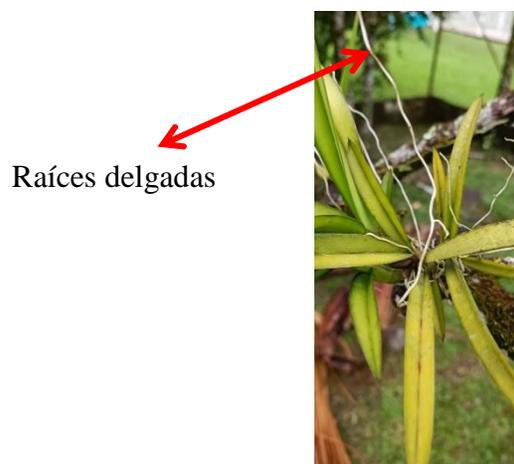


Figura 4Vainas florales de *R. venusta* Pseudobulbos de *R. venusta*

Pseudobulbos

Figura 5Vainas florales de *R. venusta*

Vainas florales

Nota: los autores muestras en la figura 3 las raíces de R.V.L en la figura 4 los pseudobulbos, figura 5 vaina florales. Fuente: Los autores.

2.3.1 Hoja.

Lanceoladas elípticas y coráceas.

2.3.2 Flor

Figura 6
Flor *Rodriguezia venusta* Rchb. F.



Nota: Tomada de las plantas madre donadoras de las capsulas que se usaron para el proceso de micropropagación in vitro en la granja agroecológica UNIMINUTO, Villavicencio-Meta. Fuente: Los autores

Las flores de *Rodriguezia venusta* Rchb. F. son blancas, con una región amarillenta en el labelo como se muestra en la figura 6, generalmente se encuentran en uno a tres racimos que emergen de la base de los pseudobulbos. *R. venusta* tienen nectarios florales y extraflorales, estos últimos se encuentran en la bráctea que subtiende cada botón floral, así como en las hojas vegetativas en expansión. (Espolador et al., 2014)

2.4 Distribución General de *Rodriguezia venusta* Rchb. F. o *Rodriguezia bracteata* V

Según Bernal et al., (2015) Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Ocupando las regiones de la amazonia y Orinoquia en un rango de 200 a 1200 msnm de tal manera que se encuentra en climas templados. Como se muestra en la figura 7.

Figura 7
Distribución de *Rodriguezia venusta o bracteata*.



Fuente: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:221598-2>

2.5 Marco de antecedentes

Según estudios realizados por (Gaudencio-Sedano et al, 2015) establecimiento de cultivos *In vitro* mediante la siembra de semillas obtenidas de cápsulas maduras fisiológicamente (antes de abrir estos). Para siembra en medio, La esterilidad de la superficie de las cápsulas se ha desarrollado bajo procedimientos establecidos para determinación de un sistema *in vitro* para la propagación masiva de cada orquídea, mediante segmentación de hojas, protocormos y pseudobulbos (explantes, 0,5 cm²) Semillas, mantenidas *in vitro* durante 6 meses. Explantes cultivados en MS Diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (ANA/BA (auxina/citosina), ANA/GA3 (auxina/giberelina), ANA/BA/GA3 (auxina/citosina/giberelina)). En proporción de 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 y 10 mg litro⁻¹ esto con el fin de seleccionar métodos más eficientes para la inducción de callos, para la regeneración estructural. Se concluyó una serie de pautas para el establecimiento de un medio de cultivo que sea favorables para el óptimo desarrollo de las semillas de *R. venusta*.

Según los temas expuestos en su investigación Flores Georgina et al. (2011) seleccionaron la Especie de *Brassia verrucosa* las cuales fueron cultivadas en el orquidiario de la Universidad Autónoma Chapingo; se colectaron cápsulas indehiscente obtenidas de una planta adulta, se extrajeron semillas de las cápsulas y Catorce días después se sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con 100 mg L⁻¹ de inositol, 2 mg L⁻¹ de glicina, 30 g L⁻¹, Sacarosa y 6,5 g L⁻¹ de agar como gelificante (T1); Se ajustó el pH a $5,7 \pm 0,1$; se esterilizo el medio en autoclave a 1,2 kgcm⁻² de presión durante 20 min y una temperatura de 120 °C. Para el desarrollo de plántulas, además del medio de cultivo para la germinación (T1), se realizaron pruebas con los medios: a) MS más 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2,0 g L⁻¹ Peptona, 1.0 g L⁻¹ de carbón activado y 40 g L⁻¹ con sustratos de manzana, plátano, tomate y 100 mg L⁻¹ de agua de coco y 6,5 g L⁻¹ de agar (T2); b) (T2); b) Medio de cultivo similar al anterior sustituyendo el carbón activado por 3 mg·L⁻¹ de ácido giberélico (AG) (T3); el pH en los tres casos fue ajustado a 5.0 ± 0.1 . Como resultado de la investigación se observó un desarrollo óptimo de las semillas de la especie *B. verrucosa* demostrando que el medio realizado fue bien hecho. Se concluyó que La germinación in vitro de las semillas de *B. verrucosa* se presentó de forma adecuada para el desarrollo de las plántulas, mismas que fueron establecidas exitosamente en el medio de cultivo MS suplementado con 30 g·L⁻¹ de sacarosa, 100 mL⁻¹ de agua de coco, 40 gL⁻¹ de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·L⁻¹ de peptona, 1.0 g·L⁻¹ de carbón activado y 6.5 g·L⁻¹ de agar. Estas condiciones permiten la propagación in vitro de *B. verrucosa* para su rescate y conservación. No obstante, la elaboración de esta evaluación nos brinda información de que la elaboración de medios de micropropagación no funciona sino se maneja una buena asepsia y suplementos adecuados para un óptimo desarrollo.

Alvarado (2009) utilizó brotes de *Paphiopedilum* trasplantados al medio (Huang 1988) para incrementar el número de explantes. El medio inicial utilizado fue MS (1962) suplementado con vitaminas MT (Murashige - Tucker, 1969), BA, ANA y agua de coco. Observaron que las auxinas no tienen un efecto benéfico para la formación de brotes. Concluyendo que es una de las variables que debemos tener en cuenta para que los objetivos de nuestro proyecto se cumplan.

En su proyecto Hernández (2017) usó ácido giberélico sobre el desarrollo de *Cymbidium* sp. Donde se establecieron tres concentraciones de AG3 (5,125 y 150 mg L⁻¹) y un testigo de ácido giberélico donde se observó que este reguló el crecimiento y formación de tejido, lo cual afirmó por medio de estudios estadísticos que al exponer las hojas con AG3 estas estimulan el crecimiento no solo de raíces sino el tamaño y ancho de las hojas. Concluyendo que este ácido es una de las fitohormonas más importantes en el caso de oxidación y desarrollo en las partes juveniles de la orquídea.

2.6 Marco legal

Según Castellanos-Castro & Torres-Morales (2018) Citando Mora et al., (2011), Bernal et al., (2016) en Colombia se albergan cerca de una décima parte de las 300.000 especies de plantas con flores que se aprecian en el mundo (Mora et al., 2011 & Bernal et al., 2016).

En procesos de flora natural, se pretende que sea necesario concretar acciones para la conservación, que garantice la inmortalidad de los recursos. No obstante, puede lograrse en varios asuntos, mediante la ejecución de operaciones con uso sostenible de la flora. Como lo constituye la Política Nacional para la Gestión Integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos – PNGIBSE (Ministerio de ambiente, 2012).

Según (Ministerio de ambiente, 2012) la manutención de la biodiversidad debe ser ilustrada en un sentido extenso, es decir: el resultado de una interacción entre sistemas de conservación, uso sostenible y construcción de comprensión e información.

A continuación, en la tabla 5 se encuentran las normativas legales vigentes que existen para protección de algunas especies en peligro basándose en lo descrito en el libro rojo e investigaciones hechas por entes encargadas de proteger la biodiversidad.

Tabla 5
Normativa legal

<i>Decreto 2106 de 2019</i>	Imputa normas para modificar gestiones en la administración pública, descartó un requerimiento que garantizaba protección a especies de flora en amenaza, elimina el trámite de levantamiento de veda, asunto requerido en la ejecución del proyecto, afecta variedades forestales vedadas.
<i>La conservación y el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad</i>	Se aprobó en Colombia el acuerdo sobre diversidad biológica, elaborado en Río de Janeiro el 5 de junio de 1992. El estado colombiano insistió su voluntad por conservar de forma sostenible la biodiversidad ¹ y sus elementos (Ley 165 de 1994).
<i>el artículo 2 del Decreto 2372 de 2010 indica que:</i>	Con esta norma, el uso sostenible implica: manejar los componentes de la biodiversidad de una forma que no produzca degradación a largo plazo, alterando los atributos de composición, componer las necesidades y las aspiraciones de las generaciones vigentes y futuras (Decreto 2372, 2010, p,158).
<i>La conservación y el aprovechamiento sostenible de la flora</i>	De esta manera la conservación, la propagación, y el uso sostenible de los recursos de la flora colombiana, Al mismo tiempo son importantes para el país y constituyen prioridad dentro de la política ambiental (Artículo 1 de la Ley 299 de 1996).
<i>Régimen Forestal</i>	El beneficio forestal es esencial para inspeccionar: los requerimientos necesarios para poder crear industrias y realizar procedimientos de comercio interno, externo de la flora. Tener la posibilidad de acceder a

	flores silvestres, a sus semillas, y generar híbridos (Decreto 1076 de 2015).
<i>Decreto Único Reglamentario del Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible Resolución 483 de 2001 – Ministerio del Medio Ambiente.</i>	Instituye el medio para solicitar el Salvoconducto Nacional. Sitúa las autoridades competentes para concederlo, serán las autoridades ambientales en el lugar donde encuentren los especímenes, consagre que este salvoconducto se utilizará para transportar por una sola vez los especímenes (Decreto 1791 de 1996).
<i>Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente</i>	Este decreto presenta varias habilidades en materia forestal. posee pautas acerca de los tipos de aprovechamiento forestal, los compromisos de las industrias forestales, los requisitos y procedimientos para la movilización y la comercialización nacional e intencional de los productos forestales. (Decreto - Ley 2811 de 1974).
<i>ICA.</i>	Reconoce temas de gran importancia sobre la exportación e importación de flora en el país. Muestra definiciones habituales de sanidad vegetal, algunos términos importantes, las obligaciones de los productores, transportadores, en materia de plantas ornamentales y materiales de Proción. (Resolución 492 de 2008 del ICA).
<i>Aprovechamiento sostenible de individuos de la familia de plantas Orchidaceae. Normatividades específicas.</i>	Según (Ospina 1996, Calderón-Sáenz 2006). El Instituto de Desarrollo de los Recursos Naturales Renovables, fundó una veda en todo el territorio nacional para el beneficio, y la comercialización de orquídeas silvestres y de sus servicios.
<i>Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR).</i>	En el (Acuerdo 028 de 2004) se pronunció acerca del manejo, beneficio de bosques y la flora silvestre, el levantamiento de sus productos entre el área de su autoridad en este acuerdo. La resolución se encuentra vigente y reglamenta aspectos como las clases de aprovechamiento forestal.
<i>Comercio internacional.</i>	La Convención CITES, admitida por la (Ley 17 de 1981), reglamentada por la Resolución 1263 de 2006 del Ministerio de Ambiente, convenio internacional que tiene el objetivo de vigilar por el comercio internacional de animales y plantas silvestres.

Nota: Los autores presentan las leyes que junto al libro rojo evidencian las especies en veda.

Fuente: Los autores

CAPÍTULO III

3 Metodología y Diseño Experimental

3.1 Ubicación geográfica del área de estudio

Este protocolo de propagación *in vitro* se llevó a cabo en los laboratorios de la Corporación Universitaria Minuto de Dios -UNIMINUTO. La cual se encuentra ubicada en el piedemonte de la Cordillera Oriental, al noroccidente del Departamento del Meta, en la vereda Barcelona, muy cerca de latitud $4^{\circ} 04' 07''$ N, longitud $73^{\circ} 35' 05''$ W m.s.n.m.); cuenta con un clima tropical, con una precipitación anual de 3.000 a 4.000 mm, una temperatura promedio que varía de 23°C a 30°C , y una humedad relativa de: 76% a 85%. (Rey-Ramirez & Alvarado-Paloma, 2021)

A continuación, se muestra la figura 8 mapa con ubicación georreferenciada del lugar de estudio.

Figura 8



Nota: En este lugar se ubican los laboratorios de Biología y Química que pertenecen al programa de ingeniería Agroecológica; también se tienen espacios para cultivar y un umbráculo donde se establecieron las plantas madre de *Rodriguezia venusta* L y de donde se obtuvieron las capsulas de semilla latitud de 4070333 y longitud de -73,565912

3.2 Caracterización biofísica en la granja agroecológica UNIMINUTO, Villavicencio-

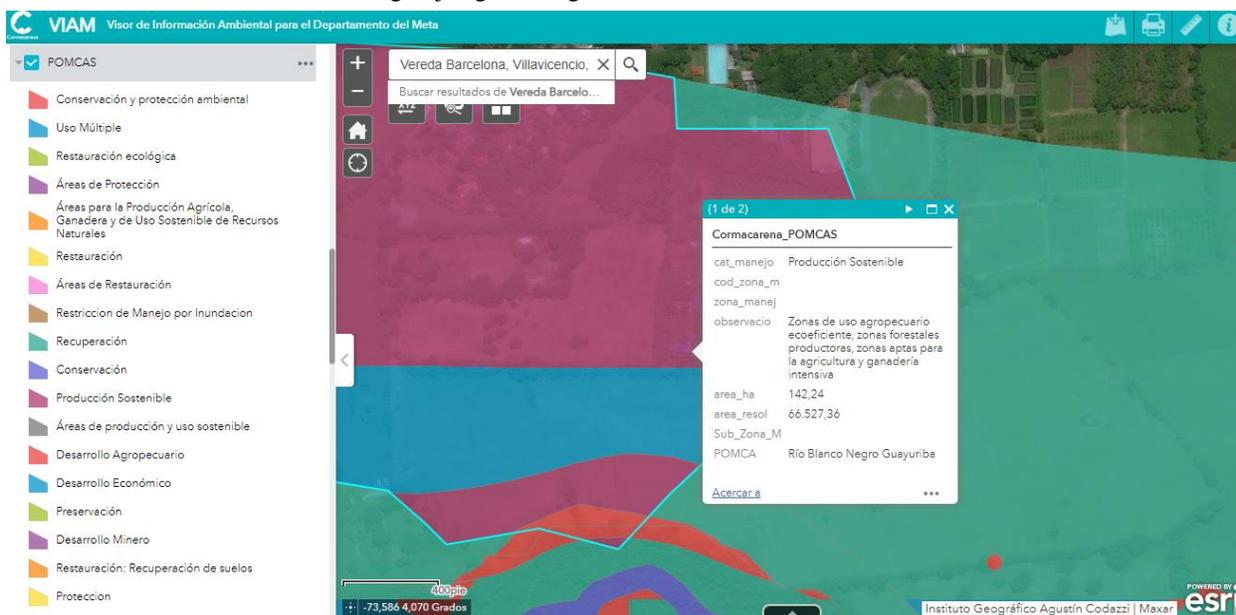
Meta

Según Martínez-Izquierdo (2016) encontró que el terreno muestreado no cuenta con un sistema de drenaje ni de riego, la cobertura vegetal está conformada por plantas herbáceas, arbustos y pocos árboles, ya que no se aplica ningún tipo de cobertura adicional, manejando un pH muy alto lo cual según (Corosio-María, 2018) cuando el pH del suelo es alto el hongo micorrízico disminuye. Y esto crea según (Ospina & Tuppac, 2013) creando desbalances nutricionales en el suelo y planta terrestres y hemiepifitas.

Para determinar las cualidades de la Granja agroecológica UNIMINUTO, Villavicencio-Meta, se utilizó la herramienta de **CORMACARENA- VIAM** que nos arroja que es una zona de uso agropecuario ecoeficiente, zonas forestales productoras, es una zona apta para la agricultura y ganadería intensiva.

A continuación, en la figura 9 se evidencia información geográfica con recurso CORMACARENA-VIAM.

Figura 9
Cualidades biofísicas en la granja agroecológica UNIMINUTO, Villavicencio-Meta



Fuente: tomado de <https://viam.cormacarena.gov.co>

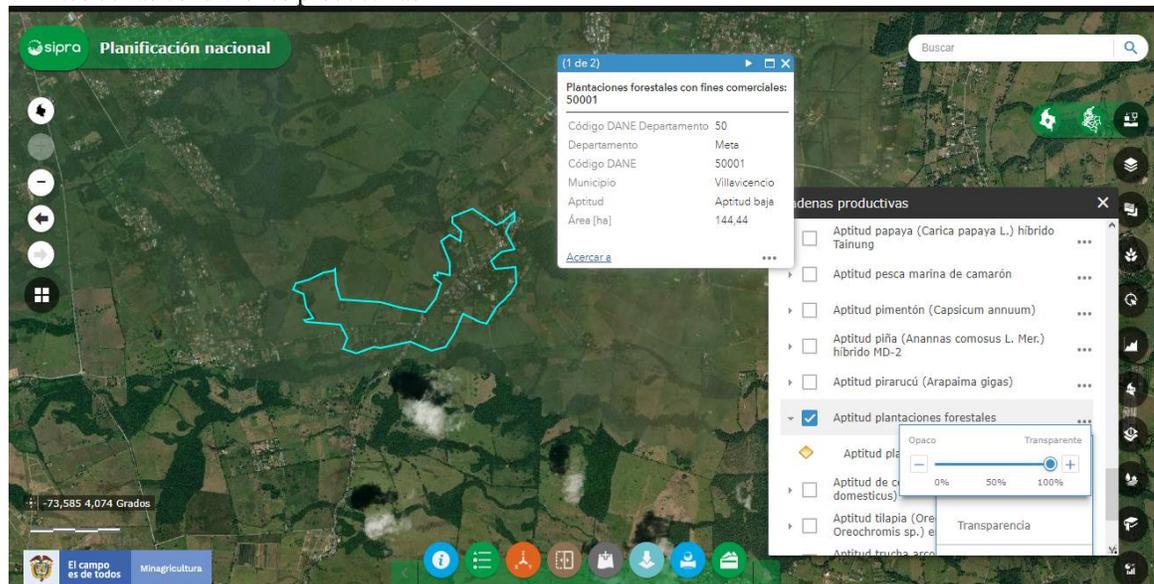
En la figura 9 se observa que al lado izquierdo está descrito el POMCAS de la vereda Barcelona y arroja que el color morado que gran porcentaje de la vereda comprende producción sostenible, seguido del color azul que arroja que la zona está en desarrollo económico. El color verde delimita las zonas en recuperación siendo esto factible para la propagación de orquídeas debido a que; según Duarte et al., (2015) son indicadores biológicos, su presencia aumenta la salud y recuperación de los ecosistemas.

De manera natural sin embargo su tasa reproductiva es muy baja por lo tanto se establece protocolos para ser cultivadas en laboratorio.

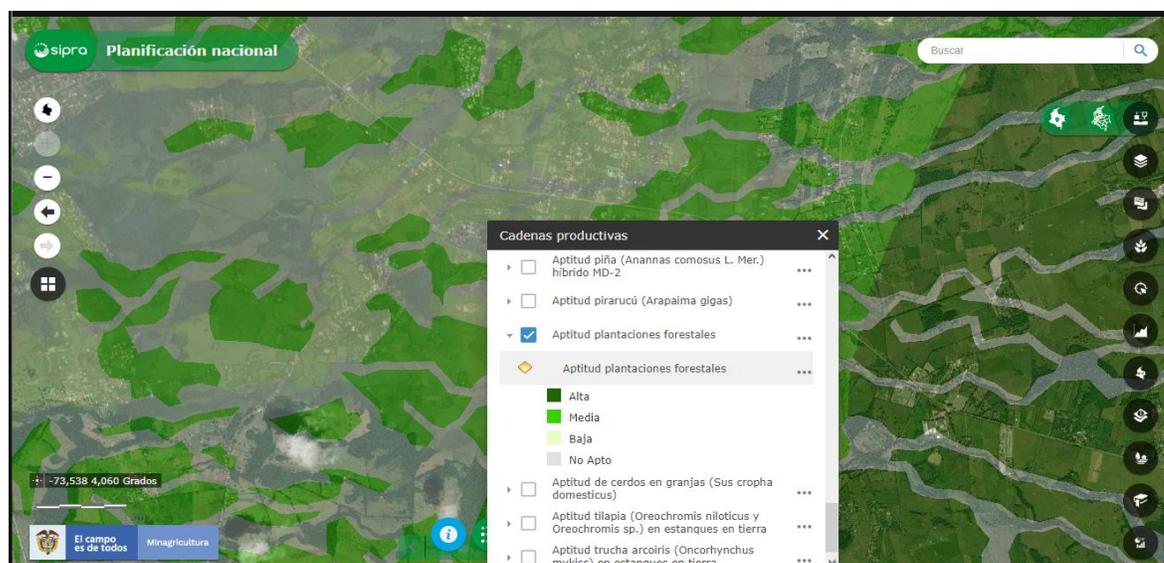
A continuación, en la figura 10 se muestra las cadenas productivas en la vereda Barcelona y para ello se usó el Sistema de Información para la planificación rural agropecuaria (SIPRA).

Figura 10

Límites de las condiciones productivas



B



Fuente: el Sistema de Información para la planificación rural agropecuaria (SIPRA) 2022.

En la figura 10 A Se evidencia el área del departamento del Meta que se encuentra delimitada con color azul. En la figura 10 B, podemos observar que las aptitudes forestales las podemos identificar por colores siendo el verde oscuro alto, verde claro medio y verde muy claro bajo y gris no apto. Obteniendo un resultado de verde claro, esto quiere decir que la aptitud para plantación forestal es media y es oportunidad para que procesos de propagación hagan parte de optimizar aptitudes negativas en el medio ambiente. (SIPRA,2022)

3.2.1 Metodología

Este trabajo se realizó a través de una metodología cuantitativa que consistió en recopilar y analizar e integrar los datos estadísticos evaluados en el proceso de micropropagación de *R. venusta* llevado a cabo en los laboratorios de la granja agroecológica UNIMINUTO-Villavicencio.

3.2.1.1 Variables

Para esta investigación se incluyen variables dependientes e independientes.

3.2.1.2 Variables independientes

Ácido Indolacético, Giberelina, carbón activado, agar, sacarosa, formaldehido.

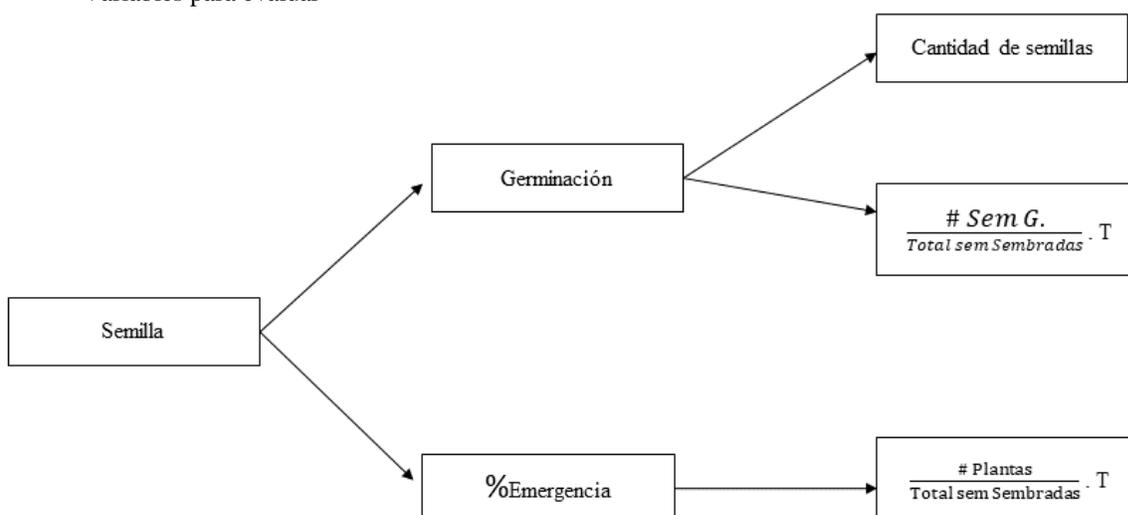
3.2.1.3 Variable dependiente

Semilla, emergencia, germinación. formación de protocormos,

Germinación: número de semillas germinadas, Formación de protocormos: número de protocormos, emergencia: vigor de las plántulas, semilla: la viabilidad.

A continuación, esquema de la variable para evaluar cada uno de los tratamientos en la figura 11

Figura 11
Variables para evaluar



Nota: En este esquema los autores presentan las variables a evaluar.

Fuente: los autores.

3.2.2 Recolección de semillas.

Para la obtención de las semillas se tomaron muestras de frutos de *R. venusta* en el segundo periodo del año 2021, en inmediaciones de la vereda Barcelona (Villavicencio, Meta – Colombia). Se colectó la capsula de la planta madre que se encuentra ubicada en el umbráculo de la granja agroecológica UNIMINUTO.

A continuación, está la imagen ilustrada de las instalaciones de la granja agroecológica UNIMINUTO Villavicencio-Meta donde se encuentran las plantas madre donadoras de capsulas usadas en el proceso de micropropagación *in vitro* de *Rodriguezia venusta* Rchb. F. o también llamada *Rodriguezia bracteata*.

Figura 12

Mapa de la granja agroecológica UNIMINUTO



Nota: Los autores presentan el mapa de la granja y los puntos donde se encuentran las plantas madres donantes de las capsulas colinda al sur oriente con un proyecto de Meliponias y al suroccidente colinda con la zona de glamping y los laboratorios donde se desarrolló el protocolo de micropropagación *In vitro*.

Fuente: Los autores, realizado en PowerPoint.

3.2.3 Proceso de micropropagación.

En laboratorio se realizó el lavado y desinfección de cápsulas, mediante un procedimiento el cual consistió en: lavado con agua estéril, lavado con jabón ecológico Porsue, Tego y peróxido de hidrogeno enjuague con agua estéril. Luego se sumergieron por 5 minutos en hipoclorito al 70 % y etanol 70% se restregaron con cepillos de cerdas finas y para cada uno de los lavados se realizaron 3 enjuagues con agua destilada. Finalmente se guardaron en un vial previamente esterilizado y se introdujo en bolsas Zip ubicándose en una nevera (temperatura alrededor de 7 °C).

Posteriormente se elaboró la solución madre para la siembra de las semillas de *R. venusta*. Se realizó la toma de datos cada 8 días durante cuatro meses verificando cada uno de los 9 tratamientos propuestos.

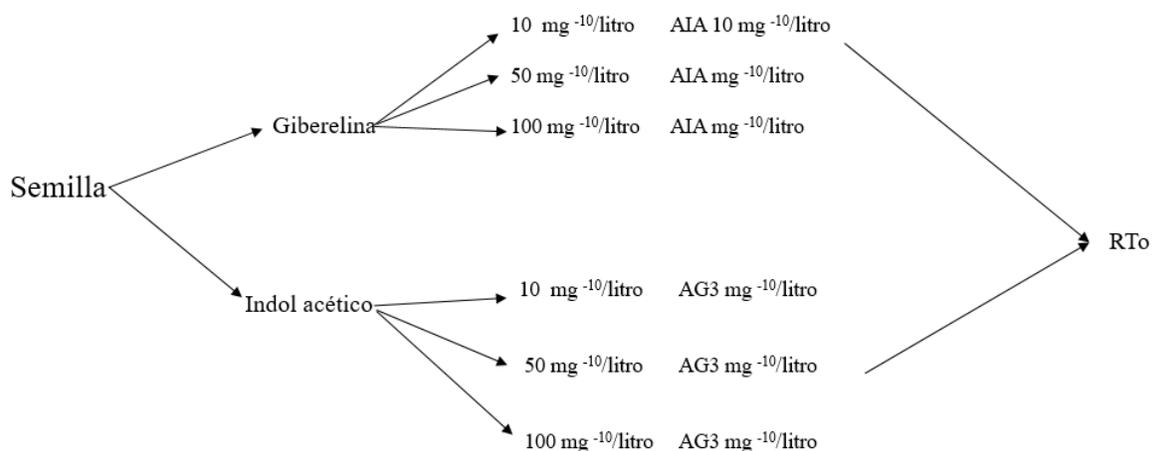
3.2.4 Diseño experimental

A través de un análisis estadístico unidireccional de varianza (ANOVA), con 2 tratamientos de desinfección de capsulas (semillas) provenientes de campo para la micropropagación de la *R. venusta*, se trabajó con una solución de Murashige & Shoog (MS), carbón activado, formaldehido, sacarosa y agar suplementada con ácido indol acético y giberelina. En proporción de 0,10,50, y 100 mg para cada uno. Para un total de 9 tratamientos con 9 repeticiones; como se muestran en la figura 13, se compararán las medidas para observar las plántulas si presentaron diferencias significativas entre los tratamientos planteados.

A continuación, se evidencia de los tratamientos establecidos en el proceso de micropropagación.

Figura 13

Esquema del diseño experimental



Nota: En este esquema los autores presentan las proporciones de ácido Indolacético y Giberelina para total de 9 tratamientos con 9 repeticiones cada uno.

Fuente: los autores.

La presente investigación se considera cuantitativa con una metodología que consistió en recopilar, analizar e integrar sistemas cuantitativos considerando el tipo experimental y explicativo del diseño planteado.

3.2.4.1 Diseño de la investigación

Se implementó a través de una modalidad aplicada basada en el fundamento de lo teórico deductivo y experimental que se diseñó en la investigación aplicado a la micropropagación por semilla para evaluar la eficiencia de dos fitohormonas bajo diferentes concentraciones.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Recursos de la investigación

Para este trabajo de investigación se realizaron consultas de diferentes fuentes bibliográficas como: Artículos científicos, artículos de revisión, trabajos de grado, Revistas indexadas, Sitios web, entre otros.

3.3.2 Instrumentos y materiales

- Para el proceso de micropropagación se requiere de plantas madre y cápsulas de semillas de la especie de orquídea objeto de estudio, además del laboratorio para realizar el proceso de micropropagación *in vitro*
- En la fase de endurecimiento y propagación sexual de las orquídeas se requiere de un umbráculo con poli sombra y plástico que permita el correcto desarrollo de las plantas.
- En la fase de desinfección se requiere de proceso elementos que permitan la adecuada desinfección cámara de flujo laminar, destilador y etanol 70%, alcohol al 70%, hipoclorito al 70%, Tego al 10%, escoba para remover impurezas, jabón ecológico al 30% y auto clave.

- Fase de tratamiento se requiere de recipiente de vidrio con tapa rosca azul de 1.000 ml, placa calefactora, agitador magnético SH-2, agar, carbón activado, sacarosa, formaldehído, reguladores de crecimiento (ácido indol acético y giberelina).
- En la fase de micropropagación se requiere de cámara de flujo laminar, recipientes de vidrio con dimensiones apropiadas, bisturí, tijeras, candelero.

CAPÍTULO IV

4 Resultado

4.1 Análisis de Resultados

El proceso de propagación *in vitro* que se llevó a cabo en el laboratorio de la granja agroecológica Minuto De Dios, del programa de Ingeniería Agroecológica Villavicencio- Meta geográficamente situada latitud 4° 04' 07" N, longitud 73° 35' 05" W vereda Barcelona.

Para dar cumplimiento a los objetivos específicos se colectaron las capsulas de semillas de *R. venusta* y se trabajó en el laboratorio empleando dos modelos de desinfección para así mismo evaluar la eficiencia de las dos fitohormonas estimulantes de crecimiento en el desarrollo morfológico de las semillas.

4.1.1 Fase de Laboratorio

Para dar cumplimiento al primer objetivo específico se evaluaron dos reguladores de crecimiento el primero fue la giberelina y el segundo ácido indolacético, cada uno de ellos en interacción con dos tratamientos de desinfección.

Se inició con la desinfección del laboratorio para la preparación de medios de cultivo, desinfección de las capsulas y siembra para lo cual se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se realizó la limpieza con la aspersion de soluciones de Tego al 10%, hipoclorito 70% y etanol 70%, para la aplicación de cada uno de estos desinfectantes se procedió a limpiar mesones y piso utilizando esponjillas y escoba para remover las impurezas y obtener una buena condición de asepsia, posteriormente la superficie se secó con toalla desechable de papel; este procedimiento se realizó por un periodo de tiempo de 90 minutos.

La cámara de flujo laminar se sometió a un procedimiento de limpieza que consistió en asperjar todas sus superficies con solución de alcohol al 70% adicionalmente se encendió la luz U.V. por un periodo de tiempo de 60 minutos.

4.1.2 Preparación de medios de cultivo

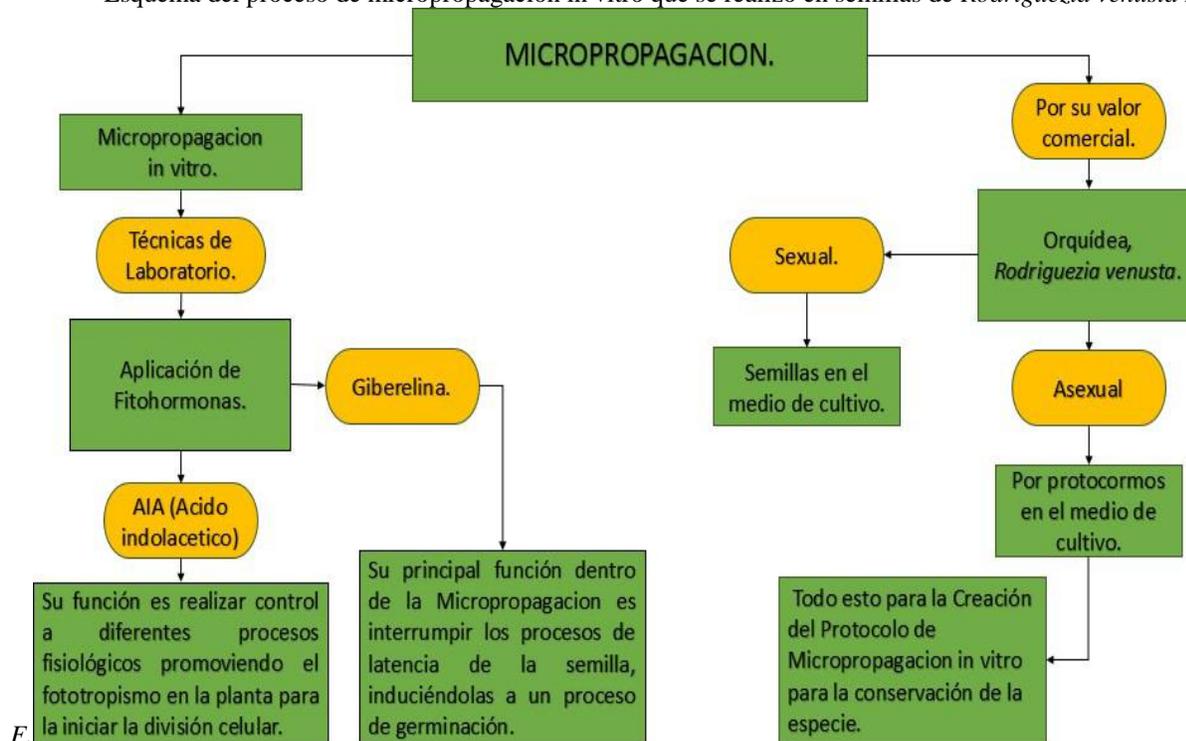
El medio de cultivo usado fue Murashige & Skoog suplementado con dos reguladores de crecimiento, Acido indol acético y giberelina. Para preparar un litro de solución madre, se toman dos recipientes de vidrio con tapa rosca azul 1.000ml, se deposita 500 ml de agua destilada en cada uno, cada uno de ellos se ubicó en placa calefactora con agitador magnético de laboratorio SH-2 llevándolos a una temperatura constante de 80°C, para poder adicionar 7.5 gr/ml de agar (solo se adicionó a una solución madre), carbón activado 1.5gr/ml, sacarosa 15 gr/ml, formaldehido 0.05gr/ml; dejando la mezcla en agitación durante 15 minutos con el objetivo de homogenizar la solución, ya culminada la solución se dejó 3 minutos 3 veces en el auto clave y luego se coloca en placa calefactora con agitador magnético de laboratorio SH-2 durante 2 minutos 3 veces; finalmente se mide el pH y se estandariza en un valor de 5.5.

Se dividieron las soluciones madres en frascos de 250 ml para ser suplementadas con los reguladores de crecimiento ácido indol acético y giberelina en concentraciones equivalentes a 10,50 y 100 mg, adicionalmente se establece un testigo sin adicionar reguladores de crecimiento; se procede luego a llevarlos a la cámara de flujo laminar para ser servidos 25 cc en recipientes de

vidrio con dimensiones de 71.8 mm de diámetro en base y a una altura de 79.4 mm y capacidad de 231 cc, estableciendo 7 tratamientos con 10 repeticiones cada uno con un total de 70 muestras.

Figura 14

Esquema del proceso de micropropagación in vitro que se realizó en semillas de *Rodriguezia venusta* Rchb.



F.

Fuente: los autores.

4.1.3 Tratamientos de desinfección de la capsula

Para este proceso se tomó una (1) capsula de la planta madre ubicada en el orquidero de la granja agroecológica UNIMINUTO, se llevó al laboratorio donde posterior a esto se lavó la capsula con agua esterilizada y posteriormente se procedió a realizar el proceso de desinfección durante 30 minutos.

4.1.3.1 Primer tratamiento de desinfección de la capsula – semilla

El Primer tratamiento de desinfección se realizó enjuagando tres veces con agua destilada la capsula y frotándola con un cepillo de cerdas suaves para eliminar las impurezas de campo; luego se sumergió en solución de hipoclorito de sodio al 40% con agitación constante durante 10 minutos, se enjuago tres veces con agua destilada; posteriormente se lavó con jabón ecológico Porsue al 30% y se cepillo la capsula, se dejó sumergida en la solución durante 10 minutos, pasados los 10 minutos se enjuago con agua destilada agitándola constantemente, finalmente se sumergió en etanol al 70% durante 5 minutos y se enjuago tres veces agitándola constantemente durante 30 minutos consecutivamente. Esta actividad se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

Posteriormente, se perforo la capsula donde se cortó con ayuda de bisturí y se extrajo la semilla para proceder a sembrarlas en recipientes de vidrio con dimensiones de 71.8 mm de diámetro en base y una altura 79.4 mm los cuales tienen la capacidad de almacenar hasta 231 ml, previamente autoclavados; la actividad de siembra se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar el restante de la semilla extraída se guardó en un vial desinfectado en bolsa Zip en la nevera a una temperatura aproximada de 7°C.

Figura 15

Capsula de *R. venusta* en proceso de desinfección.



Nota: Los autores presentan la capsula sumergida en solución de etanol al 70%.

Fuente: Los autores.

Se obtuvo como resultado un 100% de contaminación en la siembra de la semilla de *R. venusta* *L* transcurridos 8 días como se evidencia en Tabla 6 y grafica 1.

Tabla 6

Resultados de contaminación.

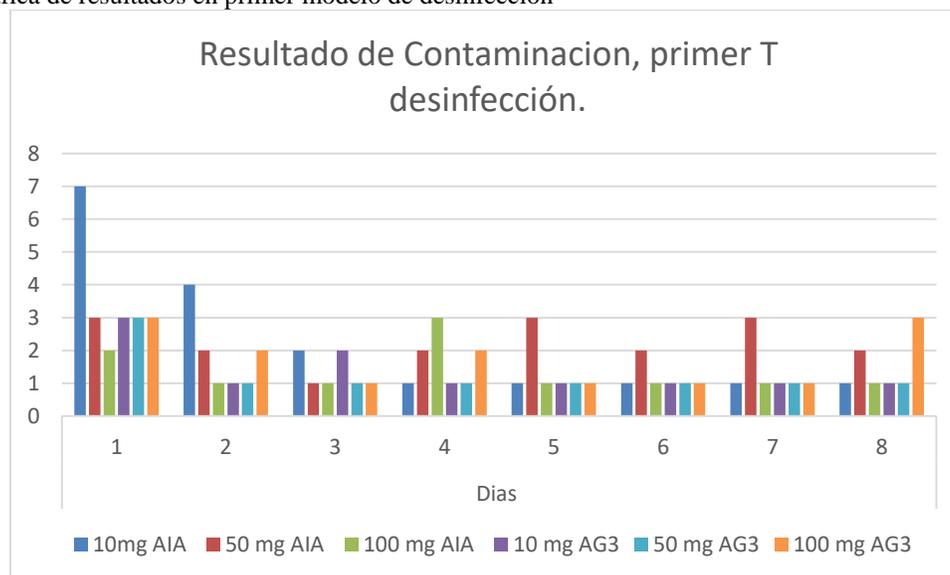
To	1	2	3	4	5	6	7	8
50 mg AIA	3	2	1	2	3	2	3	2
100 mg AIA	2	1	1	3	1	1	1	1
10 mg AG3	3	1	2	1	1	1	1	1
50 mg AG3	3	1	1	1	1	1	1	1
100 mg AG3	3	2	1	2	1	1	1	3

Nota: Los autores evidencian días de contaminación con los dos reguladores de crecimiento.

Fuente: Los autores.

Grafica 1

Grafica de resultados en primer modelo de desinfección



Fuente: Los autores.

La grafica 1. Muestra que el tratamiento con mayor susceptibilidad a la contaminación cruzada y por problemas en la asepsia del laboratorio es el tratamiento de AIA, en concentración de 10mg y 100 mg /litro teniendo el día 8, 7 repeticiones contaminadas, seguido por el tratamiento AIA de 50 mg100 mg/litro teniendo el día 8, 11 repeticiones contaminadas, por último, los tratamientos de AG3 en concentraciones de 100 y 10 mg 100 mg/litro.

Lo presentado por los tratamientos en cuento a la tasa de contaminación está directamente relacionado con problemas de asepsia en el laboratorio así mismo como por problemas de ventilación del espacio donde se ubicó el banco de germoplasma, de acuerdo con la investigación

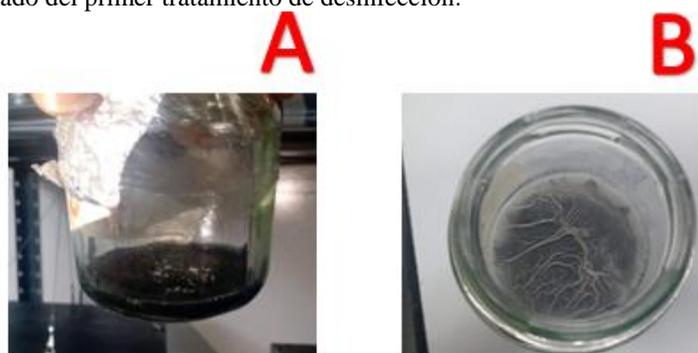
Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenológica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes de la investigación según Hernández & Gonzales. (2010) en su investigación de cuatro medios de cultivo en la formación de protocormo *in vitro* de *Phragmipedium kovachii* J.T. Atwood, Dalstrom & Ric. Fernández & *Phragmipedium besseae* Dodson & J.A. Kuhn.

En la región San Martín Plantean que el lugar de trabajo es una fuente de contaminación, ya que, a través de corrientes de aire, las partículas del suelo cargadas de esporas y células de microorganismos son arrastradas y penetran por el aire, pueden ser transportadas por el hombre y permanecer en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas.

Otro método que facilita la contaminación según el mismo autor es el material proveniente directamente de campo porque tiene una mayor susceptibilidad a contaminación debido a que la fase de desinfección no siempre se eliminan estas poblaciones contaminantes y en muchos casos no es posible visualizar las esporas que se alojan al interior de las estructuras de las capsulas y/o explantes.

Figura 16

Medio contaminado del primer tratamiento de desinfección.



Nota: En la figura 16 A se observa inicio del banco de germoplasma y en la figura 16 4 B se observa medio contaminado.

Según Pazmiño, Rosa (2011) ha determinado que el proceso de micropropagación se ve afectado cuando existen variables, como el estado fisiológico de la planta, es decir, que entre más joven la planta fuente, mejor será la respuesta *in vitro*, así mismo, Otero & Bayman, (2009) en Germinación Simbiótica y Asimbiótica en semillas de Orquídeas epifitas plantean el uso de hongos micorrícicos en medios de agar para fomentar germinación en algunas especies, y al no tener resultados significativos sugieren que los cultivadores de orquídeas podrían obtener mejores resultados en la propagación de orquídeas epifitas si utilizan metodologías de germinación simbiótica apropiados. otro factor es la temperatura ya que normalmente para *in vitro* se exige una temperatura de 24 a 28 °C.

4.1.3.2 Segundo tratamiento de desinfección de capsula-semilla

El segundo tratamiento consistió en poner en inmersión la capsula en agua destilada durante 10 minutos frotándola con un cepillo de cerdas suaves para eliminar las impurezas de campo, pasados los 10 minutos se realizaron tres enjuagues con agua destilada. A continuación, se lavó con solución de Tego al 5% frotándolo con el cepillo y agitando constantemente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada. Después se volvió a lavar e solución de Tween 20 al 5%, enjuagando tres veces con agua destilada; posteriormente se lavó en solución de etanol al 70% realizando el mismo procedimiento para el enjuague; seguido por un lavado con peróxido de hidrogeno al 4% y se agito durante 30 segundos, se enjuago tres veces con agua destilada, finalmente se adiciono hipoclorito de sodio al 5% durante 30 segundos y se enjuago tres veces con agua destilada; esta actividad se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

Después del proceso de desinfección de la capsula se realiza el mismo proceso del primer tratamiento de desinfección para la extracción de la semilla y siembra en la solución madre. Obteniendo como resultado en el proceso de micropropagación el 31,25% de contaminación a los 4 meses después de la siembra de semillas de *R. venusta*.

A continuación, la tabla numero 7 arroja información colectada en el segundo tratamiento de micropropagación en semillas de *R. venusta*.

Tabla 7

Tratamiento evaluado con menor contaminación

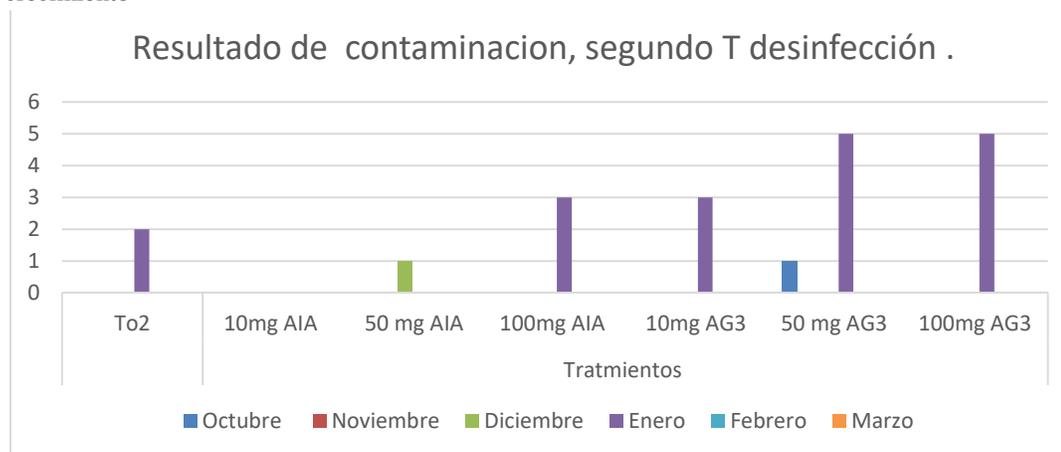
meses	Tratamientos						
	To2	10mg AIA	50 mg AIA	100mg AIA	10mg AG3	50 mg AG3	100mg AG
Octubre						1	
Noviembre							
Diciembre			1				
Enero	2			3	3	5	5
Febrero							
Marzo							

Nota: Los autores evidencia que el segundo modelo de desinfección es el adecuado ya que presento menor contaminación en los 6 meses de observación.

Fuente: Los autores.

Grafica 2

Resultado de contaminación del primer tratamiento de desinfección con los dos reguladores de crecimiento



Nota: los autores generalizan el proceso de micropropagación in vitro de *R venusta*.

Fuente: Los autores.

La tabla 7 muestra que el tratamiento con mayor susceptibilidad a la contaminación cruzada y por problemas en la asepsia del laboratorio es el tratamiento de AG3 en concentración de 100mg/100 mg⁻¹⁰/litro teniendo el día 91, 8 repeticiones contaminadas, seguido por el tratamiento AG3 en concentraciones de 50mg/100 mg⁻¹⁰/litro teniendo el día 91, 6 repeticiones contaminadas, seguido por el tratamiento AG3 en concentraciones de 10 mg y el tratamiento AIA en concentraciones de 100 mg/100 mg⁻¹⁰/litro que al día 91 juntos presentaban 8 repeticiones contaminadas seguido por el tratamiento T0 con repeticiones de 4 contaminadas para un total de 22 repeticiones contaminadas sin presencia de protocormos.

Lo presentado por los tratamientos en cuanto a la no respuesta de protocormos está relacionado con la fenología de las semillas, de acuerdo a la investigación Efecto de cuatro medios de cultivo en la formación de protocormos *in vitro* de *Phragmipedium kovachii* Y *Phragmipedium besseae* Dodson en la región san Martín Ruiz-Sánchez (2021) relacionaron Mediante un Diseño Completamente al Azar, evaluaron las cuatro fases de la germinación hasta la formación de protocormos en las dos especies de orquídeas y en los cuatro medios de cultivo: MS (Murashige & Skoog a media concentración (MS 1/2)), MS+JP (MS 1/2 más 20% de jugo de piña, MS+AC (MS 1/2 más 20% de agua de coco y K (Knudson). En este estudio no se logró observar la formación de protocormos en los medios de cultivo evaluados, solamente se observó la imbibición de las semillas y la ruptura de testa en *Phragmipedium besseae*, esto probablemente se debe a que los medios de cultivo evaluados no sean suficientes para proveer los componentes necesarios para la formación de protocormos en esta especie o también puede deberse a la madurez fisiológica de las semillas según Chacón et al., (2018 citado por Ruiz-Sánchez 2021) afirman que el tiempo de maduración de las cápsulas, y el momento adecuado para la siembra de semillas pueden variar; ya que en algunas investigaciones se sembraron semillas inmaduras y la germinación ha sido

adecuada. Cabe resaltar que, en este estudio, aunque no se usaron las mismas concentraciones se evidencia que las diferentes técnicas implementadas para la formación de protocormos no presentan efectividad en todas las especies así pertenezcan a la misma familia.

García et al., (2010) emplearon tres medios diferentes de germinación: WP (Lloyd y McCown, 1980), MS (Murashige y Skoog, 1962) y C2D (Cheé y Pool, 1987), con fotoperiodo de 16h y temperatura de 24°C, a partir de semillas de planta silvestre de porte arbustivo y de nudos axilares Pistachero (*p.vera.L.*) manejando modelos de desinfección similares y tomando datos semanales obteniendo, un 100% de germinación con tratamiento MS, y un 75% en los demás medios pero con brotes más vigoroso, queriendo decir que el medio de MS favorece mejor la formación de callo basal pero tiende a sufrir de mayor necrosis apical, en comparación con el proceso de propagación *in vitro* en semillas de *Rodriguezia venusta* Rchb. F.se comprende que existen causas de irregularidad y variabilidad ya que no se cuenta con mucha información de estos procesos con esta especie específica.

4.1.4 Determinación de respuesta de las semillas de *Rodriguezia venusta* L.

Para dar cumplimiento al segundo y tercer objetivo específico se evaluó la respuesta de la semilla a dos fitohormonas la giberelina y el ácido indol acético bajo diferentes concentraciones en la solución madre se determinaron las características de madurez de la capsula así mismo la madurez fisiológica de las semillas para determinar el estado óptimo para su germinación en el proceso de micropropagación *in vitro* con la especie de *R. venusta*.

Según Ruiz et al. (2008) citado por Banda-Sánchez et al. (2017) las capsulas tiene procesos fisiológicos como los siguientes:

Capsula verde con tiempo de maduración hasta 195 días

Verde-amarillenta: con tiempo de maduración entre 196 y 210 días aproximados

Amarilla con dehiscencia: con tiempo de maduración entre 211 y 240 días de maduración

Color café: con inicio de dehiscencia mayor a 240 días de desarrollo.

Con la información antes mencionada se aclara que la capsula fue tomada en tiempo de maduración de 210, es decir iniciando etapa de dehiscencia.

De la extracción de las capsulas se obtuvieron semillas las capsulas obtenidas por las plantas madres establecidas en la graja agroecológica UNIMINUTO, Villavicencio-Meta se recolectaron, se desinfectaron, y se pesaron tabla 8, además se observaron a través del microscopio como se muestra en la tabla 9. con el fin de determinar las características morfológicas de dichas estructuras vegetativas.

4.1.4.1 Paso 1

Se tomó la capsula cerrada quien presentó un peso inicial de 3,6g.

4.1.4.2 Paso 2

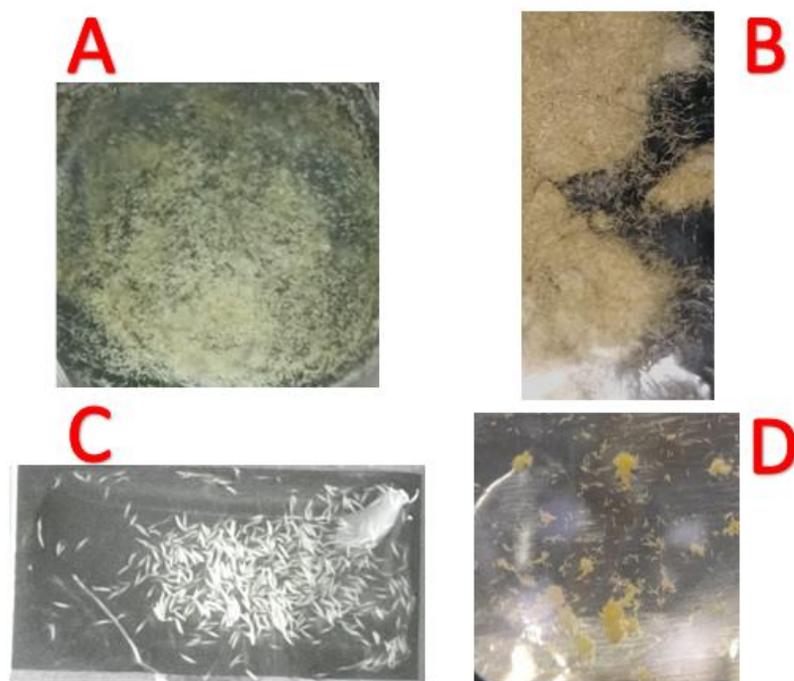
Las semillas extraídas de la capsula presentaron peso de 0,3 g como se muestra en la figura 17.

Figura 17Extracción de semilla de *Rodriguezia venusta* L

Nota: A mano derecha se encuentra el peso inicial de la capsula, en la parte inferior izquierda las semillas de *R. venusta* y a en la parte superior izquierda se evidencia corte de capsula.

Fuente: Los autores.

Las semillas de *Rodriguezia venusta* Rchb. F. según (Menchaca, García 2011) y (Blanco, Vázquez 2019) son polvorosas blancas, de acuerdo a lo observado en laboratorio son semillas que parece que tienen pelos o vellosidades muy pequeñas como se evidencia en la figura 18.

Figura 18Imagen de semillas de *R. venusta* observada en microscopio



Fuente: Los autores.

Este proyecto de investigación en los tratamientos giberelina y ácido indol acético al 10, 50 y 100 mg/litro las semillas no presentaron respuesta fisiológica a las concentraciones del diseño experimental trascurrido 4 meses, este fenómeno se puede presentar por diferentes circunstancias ambientales, genéticas, morfológicas y de concentración de los reguladores de crecimiento debido a que dosis muy altas para algunas especies inhibe el proceso de germinación.

Al comparar el proceso de formación de protocormos con las especies *Rodriguezia longifolia* y *cattleya quadricolor* Cadavid & salazar (2008) y *R. venusta* cabe mencionar que, aunque las especies sean de la misma familia requieren de distintas necesidades nutricionales, y es por tal motivo que no se obtuvo respuesta morfogénica.

En otras investigaciones autores como Luan et al., (2006 citado por Mayo Et al.,2010). Plantean que, aunque las semillas contenidas en una cápsula de orquídea pueden ser numerosas (2-3 millones), se considera que solo un 2-3% de semillas pueden germinar en condiciones naturales. Las semillas se caracterizan por ser higroscópicas y absorben o liberan humedad, haciéndolas más susceptibles a cambios ambientales y problemas fitosanitarios que reducen aún mas más las posibilidades de germinación es por esta razón que se deben almacenar en un lugar con humedad relativa baja. (Cárdenas & Cruz, 2012)

Para Manjarrez et al., (2017) las semillas dependen de factores específicos para que esta pueda seguir su proceso de producción y cualidades que le permitan su proceso de dar origen a nuevas plantas como lo son: factores ambientales, genéticos, condición física, calidad fisiológica y sanidad. Dado este caso podemos afirmar que de acuerdo a Romero & Pérez (2016) debemos conocer los rasgos morfofisiológicos de las semillas y tener en cuenta los factores nombrados antes por Manjarrez et al., (2017) de esta manera evitamos perdida de viabilidad para garantizar la conservación de semilla a largo plazo.

Para que las semillas de orquídeas germinen en un medio natural, se hace necesaria la simbiosis con hongos micorrícicos debido a que se presentan pequeñas cantidades de lípidos y proteínas como material de reserva y no presentan y cotiledones. Es por ello, que estratégicamente establecen una relación simbiótica con micorrizas, en la que, después de la infección se establece un flujo de carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos que contribuyen a la germinación de semillas y desarrollo de las plantas. (Granados et al., 2003)

De acuerdo a Pazmiño (2011) Las orquídeas se caracterizan por tener variedad de semillas, de manera general existen semillas en forma de hilo (filiforme), cilíndrica con punta (fusiforme) y elipsoidal, y en algunos géneros se observan apéndices semejantes a alas o protuberancias. De acuerdo a Reymundo et al. (2015) El tamaño varía desde pocas micras (muy pequeño) hasta unos 5 milímetros, y su peso varía de 1 a 22 microgramos.

Según Pazmiño (2011) y (Abdelnour & Muñoz, 1997) unas son conocidas como semillas polvo quienes carecen de endospermo y cuentan con un tamaño de 1 – 2mm de largo y 0.5 – 1mm de ancho y producen desde 1300 a 4 000.000 semillas por cápsula por lo cual requiere de polinizador específico; la sumatoria de estos fenómenos naturales hace que su germinación natural sea baja en comparación con el número de semilla producida.

Debido a la baja presencia de polinizadores específicos, a la madurez fisiológica de la planta madre y de la capsula se determina que, por factores antes nombrados, las semillas sembradas en el proceso de micropropagación bajo los tratamientos AIA y GE3 al 10,50 y 100 mg/litro no fueron exitosos para la formación de protocormos de la semilla de *R. Venusta L.* recolectada en la granja agroecológica UNIMINUTO, Villavicencio-Meta. Pasados 4 meses no se mostró cambios morfo fisiológicos en la estructura de las semillas, situación que también describe que, Según García, Et al. (2005) Son compuestos que tienen un núcleo indol acético lo que significa que si se usa en medidas grandes puede afectar el crecimiento de las raíces en los métodos de propagación *in vitro*.

Se emplean ampliamente las auxinas; en la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta de auxinas y citoquininas. La importancia de las giberelinas en cultivo *in vitro* está mucho más restringida. El ácido abscísico (ABA) y los compuestos que desprenden etileno se utilizan con menor frecuencia en casos más específicos.

Conclusiones.

Se trabajaron dos protocolos de desinfección de la capsula para obtener semillas asépticas que permitieran el correcto desarrollo en los contenedores con la solución madre suplementado con las dos fitohormonas (Ácido Indolacético, Giberelina). En el primer protocolo de desinfección pasados los ocho días se obtuvo un 100% de contaminación para los nueve tratamientos con sus nueve repeticiones, lo que no permitió el desarrollo de protocormos a partir de la semilla sembrada. El segundo tratamiento presentó mejores resultados, no obstante, no se evidencio formación de protocormos y se obtiene una contaminación del 31,25% a los 4 meses después de la siembra.

No se obtuvieron respuestas morfogénicas en la semilla de *R. venusta* bajo la utilización de los reguladores de crecimiento (Ácido Indolacético, Giberelina) suplementados en medio de cultivo in vitro equivalentes a 10, 50 y 100 mg /litro para cada uno de ellos.

No se presentó inducción de la organogénesis indirecta para obtener mayor cantidad de brotes y así mismo una mayor cantidad de plantas a partir de este proceso. Se observaron las capsulas en condiciones favorables para la obtención de las semillas, no se descarta que estas posiblemente se encontraban en estado de latencia.

Para la semilla de *R. venusta* se concluye que existen diversas causas de irregularidades y variabilidades en la germinación, debido a que no se cuenta con mucha información de este proceso en esta especie.

Recomendaciones

Se recomienda realizar el seguimiento de la polinización y formación de capsulas en *R. venusta*. Para determinar el estadio de madurez fisiológica del fruto y de la semilla, con el fin de aumentar la viabilidad de la germinación de estas.

Se recomienda estudiar la relación ambiente-polinizadores y viabilidad en las semillas de *R. venusta*. de las plantas madres establecidas en el umbráculo de la granja agroecológica UNIMINUTO.

Se sugiere realizar pruebas con tetrazolio para las semillas de *R. venusta*.

Se recomienda para futuros proyectos que se evalúe el proceso germinativo de las semillas de la especie *R. venusta*, de igual forma se debe estudiar las fases fisiológicas y genotípicas de las semillas de dicha especie.

Se sugiere para futuros proyectos evaluar los diferentes procesos de micropropagación con *R. venusta*. y ser enfáticos en mejorar las condiciones *in situ* para obtener mejores resultados a la hora de propagar.

Se recomienda continuar con el proceso de micropropagación utilizando otras fitohormonas y asociación con hongos micorrícicos, así como diferentes dosis de las ya evaluadas.

Referencias

- Álvaro, a. (2009) problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro agronomía mesoamericana, vol. 20, núm. 1, 153-175 universidad de costa rica Alajuela, costa rica. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/437/43711514016.pdf>
- Andrade Correa, M. (2011). Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(137), 491–507.
- Andrade, M., Vargas, J., Villegas, O., López, V., Guillen, D., Alía, I. (2015). germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *cattleya (brassolaeliocattleya) in vitro*, tomado de: <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/10/549-C-ANDRADES5.pdf>
- Banda, L; Pinzón, Y.; Venegas, L. (2017). Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea* sp. de la zona andina, Fusagasugá, Colombia Biota Colombiana, vol. 18, núm. 1, pp. 80-87, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt". <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.21068/c2017.v18n01a5>
- Barracaldo, C. Velasco, D. (2018). Estandarización de un medio de cultivo para la obtención de plántulas a partir del cultivo in-vitro de meristemos de *solanum phureja*- mutante flor blanca. [Trabajo de grado, Universidad Distrital Francisco José De Caldas]. Repositorio udistrital. <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/14947/BaracaldoHuertasCindyLorena2018.pdf?isAllowed=y&sequence=3>
- Beltrán Rodríguez J. S. y Díaz Camelo Y. A. (2016). *Identificación De Los Géneros De Orquídeas Presentes En La Reserva Natural Del Quinini En El Municipio De Tibacuy Cundinamarca*. [Trabajo de grado, Universidad De Cundinamarca]. Repositorio institucional UDEC.

<https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/216/Identificaci%20de%20los%20G%20neros%20De%20Orqu%20ideas%20Presentes%20En%20La%20Reserva.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Betancur, J., Sarmiento, H., Toro, L., & Valencia, J. (2015). *Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia*. www.minambiente.gov.co

Blanco, G. (2019). Guía ilustrada de las Orquídeas del Jardín Botánico Regional del Soconusco, Chiapas. Centro Universitario De Ciencias Biológicas Y Agropecuarias División De Ciencias Biológicas Y Ambientales.

Bohórquez, M., Reyes, Y. (2019). evaluación fenológica-climática del género *Rodriguezia* en la hacienda Betania en el municipio de Fusagasugá. universidad de Cundinamarca facultad de ciencias agropecuarias programa de ingeniería agronómica. Tomado de: <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/handle/20.500.12558/2995>

Cadavid, i. C., & Salazar, s. (2008). Micropropagación de *Cattleya quadricolor*. Proyectos de grado, 79. <https://core.ac.uk/download/pdf/47237276.pdf>

Calderón-Sáenz, E. (2006). Libro rojo de plantas de Colombia. Vol. 6, Orquídeas. 1 pt. In *instname: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*. <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/31410#.XNhjotxEgEU.mendele>

Cárdenas, R. Cruz, Aldean. (2012). https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjOvYuKhLv5AhUKnIQIHTZnAYsQFnoECDkQAQ&url=http%3A%2F%2Frepository.humboldt.org.co%2Fbitstream%2Fhandle%2F20.500.11761%2F34287%2F569-Libro%2520Conservacio%25CC%2581n%2520Orquideas_Baja.pdf%3Fsequence%3D4%26isAllowed%3Dy&usg=AOvVaw1enst6Tzm846BeGyLWo0o2

- Carrión, et al. (2012). Bioprospección de los recursos nativos de la orquídea *Vanilla spp.* spp.
- Castellanos-Castro, C. y Torres-Morales, G. (2018) Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. 328 p.
- Castillo, a. (2008). *Propagación de plantas por cultivo.*
- Castillo, G. (2004) Desarrollo de métodos cromatográficos para la determinación de giberelinas y auxinas para el estudio de su biosíntesis. Tesis de maestría. Facultad de química. Universidad de la habana. Tomado de :
<https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/27/pdf/16-cuantificacion.pdf>
- Celedón, P.V., Martínez, H. C., Michael, M. G. (2016). *Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias.*
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500005
- Chacón, M; Ponce, L; Muñiz, S; Huaracha, D; Huisa, K. (2017). Propagación In vitro de cuatro especies de orquídeas nativas de la región Cusco. Escuela profesional de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional De San Antonio Abad del Cusco, Perú.
<https://revistas.unsaac.edu.pe/index.php/cantu/article/view/630/756>
- Colombia: Epidendrum porphyreonocturnum Hágsater & R. Jiménez y Epidendrum whittenii Hágsater & Dodson.* Revista Peruana de Biología, 27 (3), 411-416.
<https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i3.17901>

Comisión Nacional de los Derechos Humanos CNDH. (S.f). *Estudio Sobre la biodiversidad y la biotecnología y su vínculo con el pleno goce de los derechos humanos...*

<https://www.cndh.org.mx/sites/default/files/documentos/2019-11/Estudio-Biodiversidad.pdf>

Constantino, E. (2021, 12 mayo). *La orquídea, un tesoro nacional*. Fondo Mundial para la Naturaleza. <https://www.wwf.org.co/?317184/La2Dorquidea2Dun2Dtesoro2Dnacional>

Corosio, M. (2018) Relación de los hongos formadores de micorrizas respecto de las variables fisicoquímicas de suelos de Mendoza cultivados con tomate para industria. Tomado de: https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/10089/tesis-irnr-carosio-mara-emilia-2018.pdf

Cruz Pizarro, f. (2012). Micropropagación (manual de prácticas). *Fesc*.

Doria, J. (2010) generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v31n1/ctr11110.pdf>

Duarte, D, Gómez, S., Monsalve, H. (2015). Orquídea. Universidad INCCA de Colombia, Grupo de Biotecnología y Medio Ambiente <https://sie.car.gov.co/bitstream/handle/20.500.11786/33803/29121.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Duarte, i. (2014). Germinación in vitro de *barkeria uniflora* lex. Dressler & halbinger, una orquídea endémica de México. Tomada de: https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/portal2015/licenciaturas/biologia/tesis/tesis_duarte_salinas.pdf

Escobar, g. Vásquez, i. Colinas, m. Rosas, m. (2011). Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. Revista Chapingo. Serie de horticultura, 17 (1), 5-8. Tomado de: [v17n1a2.pdf \(scielo.org.mx\)](https://scielo.org.mx/v17n1a2.pdf)

Especies en Veda. (2019).

http://i2d.humboldt.org.co/ceiba/resource.do?r=le_plantaspriorizadas_2019

Espejo s. A.; j. García c.; a. R. López f.; r. Jiménez m.; l. Sánchez s. 2002. Orquídeas del estado de morelos. Herbario amo. Universidad autónoma metropolitana-iztapalapa, méxico, d. F.406 pp.

Espolador, C. Heide, M. Cortelazzo, A. (2014). Anatomy and histochemistry of the nectaries of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae). Tomada de: <https://doi-org.ezproxy.uniminuto.edu/10.1016/j.flora.2014.03.002>

<file:///C:/Users/jovil/Downloads/vainilla%20valle%20del%20cauca.pdf>

From Colombia.

García de la Rosa, R, Ramírez Ruz, C y Sierra Ortega, T. (2005). *Propagación in vitro de la especie frutícola de la Costa Caribe Guanábana (Annonamuricata) a partir de segmentos nodales*. Sincelejo: Universidad de Sucre 2017.

<http://repositorio.unisucre.edu.co/handle/001/655> .

Gartner, O., & Jorge, 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.

Gaudencio Sedano, C.; Alejandro Manzo, G.; Reymundo Roldán, H.; Castellanos S., José Alfredo Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, vol. 1, (2015), pp. 451-456 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Estado de México, México

Georgina F. E., Isaías G.V., María T. C., Martín M. Rosas. (2011). Propagación *In Vitro* De La Orquídea *Brassia Verrucosa* Bateman Ex. Lindl.

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjJGHnJP7AhXATTABHTiMCtYQFnoECAwQAQ&url=https%3A%2F%2Frevistas.chapingo.mx%2Fhorticultura%2Fphpscript%2Fdownload.php%3Ffile%3Dcompleto%26id%3DMTg0OQ%3D%3D&usg=AOvVaw2vVU1ulTLZ1k84N4x18CoD>

Hernández, Y., González, M. (2017). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *cultrop* [online]., vol.31, n.4, pp.00-00. issn 0258-5936. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015

Ibarra, J., Rincón-Useche, C., Rincón, A., Cely, N. y Rojas, C. (2018). Aprovechamiento comercial de orquídeas: Contexto socioeconómico en San Antonio del Tequendama y Fusagasugá. En: Castellanos-Castro, C. y Torres-Morales, G. Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible (92 - 125 pp.) Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Gobernación de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia

IDEAM - UNAL. (2018). Variabilidad Climática y el cambio climático en Colombia. *Bogotá, D.C.*, 28. <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023778/variabilidad.pdf>

Jaramillo, J (2018). Relaciones Ecosistémicas De Las Orquídeas En La Sabana Y El Piedemonte Andino De La Cordillera Oriental, Villavicencio (Meta) <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/17846/RELACIONES%20ECOSISTÉMICAS%20DE%20LAS%20ORQUÍDEAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Lallana, V; Dipersia, J. (2018). Caracterización morfométrica de semillas de cuatro especies de orquídeas terrestres nativas de Argentina.

<http://www.scielo.org.ar/pdf/cdyt/n57/n57a12.pdf>

Martínez, J. (2016). Caracterización química, física y biológica de suelos de la granja agroecológica UNIMINUTO Villavicencio, Corporación Universitaria Minuto De Dios ingeniería agroecológica. Tomado

de: https://repository.uniminuto.edu/bitstream/10656/4881/1/T.IAG_MartinezIzquierdoJuanFelipe_2017.pdf

Menchaca, G, (2011). Manual para propagación de orquídeas, tomado de:

https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF

Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible y universidad nacional de Colombia. (2015). Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia. Textos: Betancur, j., h. Sarmiento-l., l. Toro-González & j. Valencia. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, Colombia; universidad nacional de Colombia, Bogotá D.c Pp.336
Andrade Correa, M. (2011). Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(137), 491–507.

Ministerio de innovación agraria. (2009). Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Experiencias de innovación para el emprendimiento agrario, 38, 56.

- Mosquera. A., Bayman, P., Tupac, O. (2013). Selección de rasgos florales en *Rodriguezia granadensis* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae): estudio de la eficacia biológica en una especie polimórfica Lankesteriana International Journal on Orchidology, vol. 13, núm. 1-2, pp. 144-145 Universidad de Costa Rica Cartago, Costa Rica. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/443/44340043038.pdf>
- Núñez, I. M., & Mariño, J. G. (2008). Micropropagación vegetal. Universidad de vigo, 3(12), 60–53. [Http://revbigi.webs.uvigo.es/images/revbigi/2008/revbigi_2008_07.pdf](http://revbigi.webs.uvigo.es/images/revbigi/2008/revbigi_2008_07.pdf)
- Ordoñez, J. Parrado, A. (2016), Referencia-fenología-clima de cuatro especies de orquídeas En un bosque alto andino de Colombia, vol. 17, núm. 1, pp. 1-15, tomado de: <https://doi.org/10.15517/lank.v17i1.27897>
- Otero, O., Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. Tomado de: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/12519/13119
- Pazmiño, R. (2011). caracterización morfológica de semillas y del proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para la conservación en el banco de germoplasma de la utpl. Toma de: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/1921/1/BQ%2017.pdf>
- Perdomo, O., Coca, F., Trujillo, E. (2020). *Nuevos registros de Epidendrum (Orchidaceae) para Presente en el Valle del Cauca. [COLOMBIA]*.
- Raz L, Agudelo Zamora H (2021). Catálogo de Plantas y Líquenes de Colombia. Versión 1.2. Universidad Nacional de Colombia. Checklist dataset <https://doi.org/10.15472/7avdhn> accessed via GBIF.org on 2022-10-29.

- Ribon, A., Bernal, I (2020). *Protocolo De Establecimiento In Vitro De Segmentos Nodales De Arándano Azul (Vaccinium corymbosum L.) CV BILOXI* .[Trabajo de grado, Universidad Distrital Francisco José De Caldas] repositorio udistrital <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/25242/RibónBarraganAnngyYurani%26BernalPérezIngryJohanna2020.pdf?is>
- Rodríguez, ana j., & rodríguez, arlene, & quintero, s., & torres, maría de los a., & fundora, zoila (2004). Influencia de los medios de cultivo en la micropropagación de plátano (musa spp.) Y malanga (xanthosoma sagittifolium schott.). *Cultivos tropicales*, 25 (1), 23-26. [fecha de consulta 18 de noviembre de 2021]. Issn:. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193230179004>
- Rodríguez, S. D. C., & Bravo, L. H. E. (2020). Patterns of distribution of orchids in a high Andean forest relict, Cundinamarca-Colombia. *Colombia Forestal*, 23(1), 5–19. <https://doi.org/10.14483/2256201X.14816>
- Rodríguez, S. D. C., & Bravo, L. H. E. (2020). Patterns of distribution of orchids in a high Andean forest relict, Cundinamarca-Colombia. *Colombia Forestal*, 23(1), 5–19. <https://doi.org/10.14483/2256201X.14816>
- Rodríguez, s. D. C., & bravo, l. H. E. (2020). Patterns of distribution of orchids in a high andean forest relict, cundinamarca-colombia. *Colombia forestal*, 23(1), 5–19. <https://doi.org/10.14483/2256201x.14816>
- Ruiz Sánchez, María Emilia. (2021). *Efecto de cuatro medios de cultivo en la formación de protocormos in vitro de Phragmipedium kovachii J.T. Atwood, Dalstrom & Ric. Fernández Y Phragmipedium besseae Dodson & J.A. Kuhn. en la región San Martín*. [Tesis de

- maestría, Universidad nacional agraria de la selva]. Repositorio institucional Universidad nacional agraria de la selva. <https://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1990>
- Santamaría, A. (2012). Establecimiento de un protocolo para la germinación *in vitro* e inducción a callo embriogénico de cedro (cedrela montana) a partir de embriones zigóticos (p p.18). [Trabajo de grado, Escuela Politécnica Del Ejército] Repositorio institucional escuela politécnica del ejército. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/5506/T-ESPE-033483.pdf?isAllowed=y&sequence=1> p.18.
- Sarmiento téllez, j., & betancur, j. C. (2006). Sinopsis sobre la riqueza y la distribución geográfica y altitudinal de las orquídeas de colombia. *Acta biológica colombiana*, 11(1), 167. Recuperado a partir de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/27572>
- Sauleda, R. (2020). A New Species of *Rodriguezia* Ruiz and Pav. (Orchidaceae) is Described The Royal Botanic Gardens, Kew. (2021). The World Checklist of Vascular Plants (WCVP). In O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, G. Ower, L. Vandepitte, D. Hobern, D. Rensen, P. Schalk, R. E. DeWalt, M. Keping, J. Miller, T. Orrell, R. Aalbu, R. Adlard, E. M. Adriaenssens, C. Aedo, E. Aescht, N. Akkari, S. Alexander, et al., Catalogue of Life Checklist (4.0). <https://doi.org/10.48580/dfpk-4n>
- Tirado, j. M., naranjo, e. J., & atehortúa, l. (2005). Propagación *in vitro* de phalaenopsis (orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal rita. *Revista colombiana de biotecnología*, 7(1), 25–31.
- Velazteguí, J., Pazmiño, R. (2011) “Caracterización morfológica de semillas y del proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de loja para la

conservación en el banco de germoplasma de la UTPB”.

<https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/1921>