

Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae)

Evaluation of different *in vitro* culture media in the development of *Phalaenopsis* hybrid (Orchidaceae)

Seir Antonio Salazar Mercado*, Anggy Zulay Amaya Nieto**, Fernando Barrientos Rey***

Resumen

Los híbridos de *Phalaenopsis* tienen una gran importancia económica a nivel mundial, como flor cortada y planta ornamental, debido a sus flores vistosas y a la capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Las técnicas de cultivo *in vitro* resultan indispensables para mejorar la eficacia germinativa, el crecimiento y desarrollo de orquídeas con fines comerciales e investigativos. En esta investigación se determinó el medio de cultivo más apropiado para la germinación *in vitro* de un híbrido de *Phalaenopsis*. Inicialmente se evaluó la viabilidad de las semillas utilizando la prueba de tetrazolio (TZ). Las semillas se desinfectaron y se cultivaron aplicando el método de la jeringuilla. El porcentaje de viabilidad en promedio fue de 92,2 % ($P \leq 0,05$: Tukey HSD), con un porcentaje de germinación entre todos los medios de 95,1 % ($P \leq 0,05$: Tukey HSD). El medio de cultivo más eficiente para la germinación de híbridos de *Phalaenopsis* a las 18 semanas de cultivo fue el Murashige & Skoog (MS) suplementado con agua de coco, y jugo de piña con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$: Tukey HSD), con respecto a los demás medios de cultivo, contribuyendo de esta manera al uso de componentes orgánicos con el fin de mejorar la germinación y desarrollo de *Phalaenopsis*.

Palabras clave: Componente orgánico, germinación *in vitro*, híbrido, *Phalaenopsis*, viabilidad.

Abstract

The *Phalaenopsis* hybrids have a significant economic importance throughout the world, as ornamental flower or plant. It is because of its attractive flowers and its adaptation capacity into different environments. The different culture media *in vitro* are vital to improve the efficacy of germination, growing and development of the Orchids for commercial and research purposes. In this research, the most appropriated medium for *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* hybrid was determined. At first, the seeds viability was evaluated by using tetrazolium test (TZ). The seeds were disinfected and cultivated by means of the syringe method. The viability percentage average was 92.2 % ($P \leq 0.05$: Tukey HSD), with a percentage of germination of 95.1 % ($P \leq 0.05$: Tukey HSD) in all the environments. The most efficient culture Medium for *Phalaenopsis* hybrid phenological development, at 16 weeks, was Murashige & Skoog (MS). Coconut water and pineapple juice were used as supplement showing statistically significant differences ($P \leq 0,05$: Tukey HSD), in comparison with the other culture media, contributing this way to the usage of organic components, which will be employed to improve the germination and development of the *Phalaenopsis*.

Key words: organic components, germination, *in vitro*, hybrid, *Phalaenopsis*, viability.

Recibido: febrero 12 de 2013

Aprobado: noviembre 9 de 2013

* BSc. Grupo de Investigación Ambiente y vida. Semillero Grupo Académico de Investigaciones Agrobiotecnológicas, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia. Email: salazar663@hotmail.com

** Ing. Semillero Grupo Académico de Investigaciones Agrobiotecnológicas, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia.

*** Ing. Semillero Grupo Académico de Investigaciones Agrobiotecnológicas, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia.

Introducción

Phalaenopsis es un género de la familia Orquidaceae, conformado por aproximadamente 66 especies nativas en todo el mundo (Chu et al., 2012), presenta un crecimiento monopodial (crecimiento vertical definido), carecen de pseudobulbos, las hojas son dísticas y carnosas (Griesbach, 2002), Las flores son de diferentes tamaños y colores, que le confieren un aspecto atractivo como planta ornamental. (Chen y Lin, 2012; Lesar et al., 2012). Como resultado de extensivos trabajos de hibridación, este género representa uno de los grupos de orquídeas más apreciados por el colorido, forma y duración de sus flores como planta en maceta o flor cortada a nivel mundial (Chen et al., 2012; Niknejad et al., 2011). Algunas orquídeas del genero *Phalaenopsis* no son comercializadas por su belleza, sino por usos en la industria alimentaria, otras son utilizadas medicinalmente como tratamientos para la diarrea y como afrodisiaco (Leva y Rinaldi, 2012). El crecimiento en condiciones naturales es lento, debido a la dependencia de una relación simbiótica con un hongo formador de micorriza, lo que ha dificultado la multiplicación vegetativa (Murdad., et al., 2010). En cuanto a la reproducción sexual, *Phalaenopsis* se ha visto perjudicada por la esterilidad de algunos de sus híbridos (Chen et al., 2012; Feria et al., 2007).

La propagación natural de *Phalaenopsis* es difícil y demanda mucho tiempo, las técnicas de cultivo *in vitro*, han permitido obtener grandes volúmenes de *Phalaenopsis* con el fin de producir plantas a gran escala para el comercio. Sin embargo, es indispensable la utilización de medios de cultivos simples, que permitan disminuir los costos de producción de *Phalaenopsis* (Leva y Rinaldi, 2012). No obstante, El éxito depende del tipo de explante a utilizar (Zhao et al., 2010). Recientes estudios en protocolos de cultivos vegetales *in vitro* específicos para *Phalaenopsis* se han desarrollado de una forma satisfactoria, incluyendo los tallos con yemas axilares (Feria et al., 2007), meristemos (Arditti y Ernst, 1993), segmentos nodales (Košir et al., 2004), fragmentos de hojas, botones florales (Tokuhara y Mii, 2001) y raíces (Park et al., 2003). Asimismo estos métodos se han reportados como complicados e ineficientes (Murdad et al., 2006).

Varios medios de cultivos se han utilizado para la propagación *in vitro* de *Phalaenopsis*, el medio Vacin y Went (VW) (Vacin y Went, 1949), el medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), el medio Knudson C (KC) (Knudson, 1946) y el medio Hyponex (Nishimura, 1982). Actualmente se ha mejorado la germinación de orquídeas, suplementando los medios

de cultivos con componentes orgánicos (Asghar et al., 2011; Salazar y Cancino 2012; Salazar, 2012).

Teniendo en cuenta la importancia desde el punto de vista económico que revisten estos híbridos de *Phalaenopsis* (Lesar et al., 2012), en el cultivo *ex vitro* se corre con el riesgo de perder su variabilidad genética y además, los tiempos de germinación y desarrollo son extensos (Niknejad et al., 2011; Murdad et al., 2010), por tal motivo esta investigación busca establecer el mejor medio de cultivo *in vitro* para la germinación asimbiótica de semillas de *Phalaenopsis* híbrida.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las cápsulas dehiscentes del híbrido de *Phalaenopsis* de interés comercial fueron colectadas maduras a los 5 meses en el municipio de Bochalema - Norte de Santander, Colombia. Las cápsulas se polinizaron manualmente, transfiriendo las polinias de la planta donadora (*Phalaenopsis* Carmela's Wild Thing; figura 1A) a la cavidad estigmática de la planta receptora (*Phalaenopsis* Taipei Pearl; figura 1B). Se emplearon en total cuatro plantas: dos donadoras y dos receptoras, obteniendo cuatro cápsulas. Posteriormente, fueron extraídas las semillas de su interior y se procedió a la respectiva conservación en sobres de papel kraft, se almacenaron en una caja estéril con un agente desecante (silica gel), para evitar la excesiva humedad. (Mckendrick, 2002; Vogel y Macedo, 2011).

Preparación del medio de cultivo:

El medio de cultivo basal fue el MS, utilizando las concentraciones de macro y micronutrientes al 100% (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 3000 mg/L de sacarosa, 700 mg/L de agar, 100 mg/L de mioinositol y 1000mg/L de carbón activado. Se emplearon cinco medios de cultivos, el medio basal MS como control, MS suplementado con jugo de piña (MS+JP), MS con agua de coco (MS+AC), MS más 0,5 mg/L de ácido indolacético (AIA) y MS con 0,5 mg/L de ácido giberélico (MS+GA₃). Los medios con suplementos orgánicos (agua de coco y jugo de piña), se prepararon adicionando 200 mL/L.

Viabilidad de las semillas

Para determinar la viabilidad de las semillas se utilizó la prueba de Tetrazolio en concordancia con lo reportado por Ossenbach et al. (2007). Para lo anterior se sumergieron 100 semillas de orquídeas en la solución

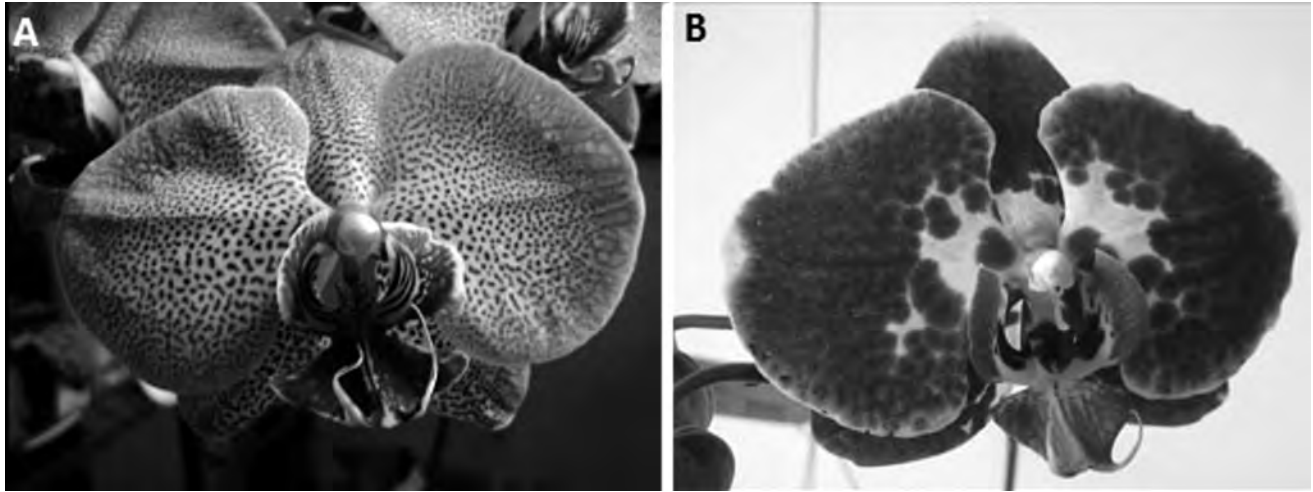


Figura 1: Cruce de híbridos de *Phalaenopsis*. **A.** *Phalaenopsis* Carmela's Wild Thing. **B.** *Phalaenopsis* Taipei Pearl. Híbrido resultante del cruce *Phalaenopsis* (Carmela's Wild Thing x Taipei Pearl).

de CTT al 1%, durante 24 horas en la oscuridad Se realizaron cinco repeticiones, las cuales fueron evaluadas en el microscopio estereoscópico.

Para analizar el efecto de la viabilidad de semillas con respecto a los tratamientos de hipoclorito de sodio con los tiempos de inmersión (tabla 1), se utilizó la metodología descrita por Batty (2001).

Tabla 1. Tratamientos de NaOCl con tiempos de inmersión

Tiempo de inmersión (minutos)	5	10	15
Concentración de Hipoclorito de sodio (NaOCl).	1.0	1.0	1.0
	1.5	1.5	1.5
	2.0	2.0	2.0
	2.5	2.5	2.5
	3.0	3.0	3.0

Desinfección del material vegetal

Primeramente, las semillas fueron colocadas en etanol (70%) durante 45 s. Al término de dicho tiempo las semillas se lavaron con 5 mL de agua estéril (cinco veces). Finalmente, las semillas se sumergieron en de hipoclorito de sodio (NaOCl: 1%), suplementado con dos gotas de Tween 20, y se agitaron por 5 min (Batty, 2001). Seguidamente, las semillas fueron cultivadas.

Siembra de las semillas

Una vez finalizado el protocolo de desinfección se retiró el filtro de tela, seguidamente, se cultivaron aproxima-

madamente 100 semillas en agua destilada estéril, en cajas Petri que contenían 25 mL del medio de cultivo. Esta técnica se realizó en la cámara de flujo laminar, donde se procedió a sellar con papel parafilm, posteriormente fueron incubadas en el cuarto de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad, con una intensidad de luz $25\mu\text{mol}/\text{m}^2$ por segundo, provista por luz fluorescente y 60 % de humedad relativa).

Desarrollo fenológico

El desarrollo fenológico de las semillas se evaluó cada 15 días mediante observaciones, descripciones y fotografías en cada una de las etapas de desarrollo de *Phalaenopsis* (tabla 2).

Tabla 2. Descripción de las etapas de desarrollo fenológico (adaptado por Vasudevan y Staden, 2010).

Etapas	Descripción
0	Semillas no germinadas. (SNG)
1	Imbibición. (IB)
2	Germinación. (GER)
3	Formación de protocormo. (FP)
4	Desarrollo de rizoides. (DR)
5	Formación de hojas (FH)

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental para la evaluación de las concentraciones de hipoclorito. Consistió en un diseño

factorial 5x3 completamente al azar (cinco concentraciones de NaOCl y tres tiempos de inmersión), con tres repeticiones, 45 unidades experimentales.

El diseño experimental para la evaluación del medio de cultivo fue de 6x5 completamente al azar (seis fases del desarrollo y cinco medios de cultivo), con cinco repeticiones con promedios de tres cajas Petri (cada una con 100 semillas), para un total de 75 unidades experimentales.

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (Anova) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples de HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey para determinar las diferencias significativas a un nivel de $P \leq 0.05$ (Tukey, 1994).

El desarrollo fenológico se evaluó cada quince días, durante 18 semanas mediante las fases de desarrollo de orquídeas adaptadas por Vasudevan y Staden (2010). Para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphic Centurión® versión 16.

Resultados y discusión

Viabilidad de las semillas

La prueba de TZ (figura 2), logró determinar la viabilidad de las semillas del híbrido de *Phalaenopsis* (92.2%), esta técnica permitió comprobar lo descrito por Pedroza *et al.*, (2010), donde afirma que las semillas maduras de *Phalaenopsis* permiten lograr un com-

pleto desarrollo morfofisiológico, el cual asegura el posterior desarrollo fenológico de las mismas. Vujanovic *et al.*, (2000), Lauzer *et al.* (2007) y Padilla (2011), demostraron que la prueba de TZ no es un buen indicador de germinación, ya que no evalúa la capacidad de división celular y a su vez el desarrollo fenológico. Por otro lado, Yamazaki y Miyoshi (2006) reportaron que en cápsulas maduras de *Phalaenopsis*, las semillas no se tiñen fuertemente con tetrazolio, a menos que sea eliminada la cubierta de éstas, debido a las características morfológicas de la cubierta, que actúan como barrera en la difusión del TZ. Así mismo, Mweetwa *et al.* (2008) afirmaron, que la tinción de tetrazolio en semillas de *Phalaenopsis* es más opaca, debido a la fuerte estructura que recubre la semilla.

Porcentaje de viabilidad con relación a la concentración de NaOCl.

El mayor porcentaje de viabilidad de las semillas del híbrido de *Phalaenopsis* se encontró en el tratamiento con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 %, con un tiempo de inmersión de 5 minutos. Esta técnica permitió determinar el efecto perjudicial ejercido por el NaOCl a altas concentraciones sobre las semillas, mediante la prueba de rangos múltiples de HSD según Tukey ($P \leq 0.05$), se logra encontrar diferencias significativas en el tratamiento con NaOCl al 1 %, por 5 minutos de inmersión, frente a los demás tratamientos, a diferencia de los fueron manejados con concentraciones de 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0%, donde no se encontraron diferencias significativas entre ellas (tabla 3).

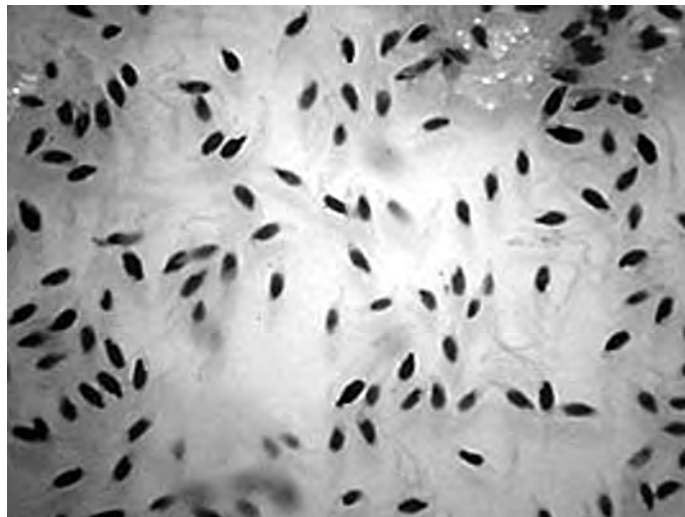


Figura 2. Evaluación de la viabilidad de semillas del híbrido de *Phalaenopsis* (100x) utilizando la prueba de Tetrazolio. Las coloraciones rojas indican la reducción del Tetrazolio (sal incolora y soluble) a Formazan (sal con pigmentación rojiza, insoluble) por las enzimas deshidrogenasas presente en los embriones vivos. Escala de la barra = 1mm.

Tabla 3. Efectos del NaOCl y el tiempo de inmersión en la viabilidad de las semillas.

Porcentaje de viabilidad con relación al NaOCl			
Tiempos de inmersión			
[] NaOH	5 min	10 min	15 min
1.0 %	91,3 ^{b*}	48 ^a	26,3 ^a
1.5 %	86 ^{a,b}	43,67 ^a	26 ^a
2.0 %	80,6 ^{a,b}	43,6 ^a	17,6 ^a
2.5 %	78 ^{a,b}	38,3 ^a	17,6 ^a
3.0 %	64 ^a	34 ^a	14,3 ^a

* Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey HSD ($P \leq 0.05$).

La prueba de incidencia del NaOH en la viabilidad de las semillas, permitió demostrar lo descrito por Mweetwa *et al.*, (2008), donde describe que la viabilidad de *Phalaenopsis* cae bruscamente, con tiempos de exposición largos a altas concentraciones de hipoclorito de sodio, causando un efecto negativo sobre la fisiología de las semillas, provocando la muerte del tejido embrionario y la pérdida total en la viabilidad de las semillas. Quiala *et al.*, (2005) y Feria (2007), demostraron que el uso de diferentes concentraciones de NaOH con diferentes tiempos de exposición, permiten observar el efecto toxico que recae sobre la morfofisiología de las semillas de orquídeas.

Prueba de viabilidad y germinación

La germinación en los cinco medios de cultivo fue alta, con un porcentaje promedio de 95.1% (tabla 4), donde la diferencia entre las pruebas de germinación y viabilidad fue del 2.9%, con un valor de $P \leq 0.05$, donde no presentaron diferencias significativas, hecho que permite observar la relación que existe entre el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación, lo que demuestra que la aplicación de la técnica de tetrazolio es un paso importante para la conservación y propagación *in vitro* de orquídeas, como lo describe Thompson *et al.*, (2006). En efecto, Kauth *et al.* (2011) y Salazar (2012) afirmaron que la prueba de tetrazolio permite predecir la capacidad de germinación y de crecimiento de las plántulas de una amplia gama de especies de orquídeas. De igual manera, Vendrame *et al.*, 2007; Hirano *et al.*, 2011, afirmaron que la técnica de tetrazolio es una prueba que permite indicar la capacidad de germinación de las semillas de orquídeas en general y a su vez, afirman que la viabilidad de las semillas de diferentes cápsulas, varía considerable-

mente, y en diversas especies de orquídeas, disminuye durante el almacenamiento.

Tabla 4. Efecto del medio de cultivo en el porcentaje de germinación del híbrido de *Phalaenopsis*.

Medio de Cultivo	Porcentaje de Germinación
MS	93,8 ^a
MS+JP	95 ^{b,c}
MS+AC	96,7 ^d
MS+AIA	94,3 ^{a,b}
MS+GA3	95,5 ^c

Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey HSD ($P \leq 0.05$).

Germinación y desarrollo fenológico

Las semillas de *Phalaenopsis* germinaron cuando el embrión absorbió agua e incrementó su circunferencia y longitud, llegando a romper la testa "fase 2" (15 días). La germinación máxima alcanzada en los cinco medios de cultivos evaluados a las 18 semanas de crecimiento para el híbrido de *Phalaenopsis*, tienen un promedio de germinación del 95.1% (tabla 4), la cual dio inicio a partir de la semana 3.

Durante el desarrollo *in vitro* de *Phalaenopsis* híbrida, se observaron las diferentes etapas fenológicas, las cuales fueron muy variables en el transcurso de las 18 semanas evaluadas; a diferencia de la fase 0, (figura 3a), donde las semillas no germinadas variaron hasta la semana 3 en cada medio de cultivo.

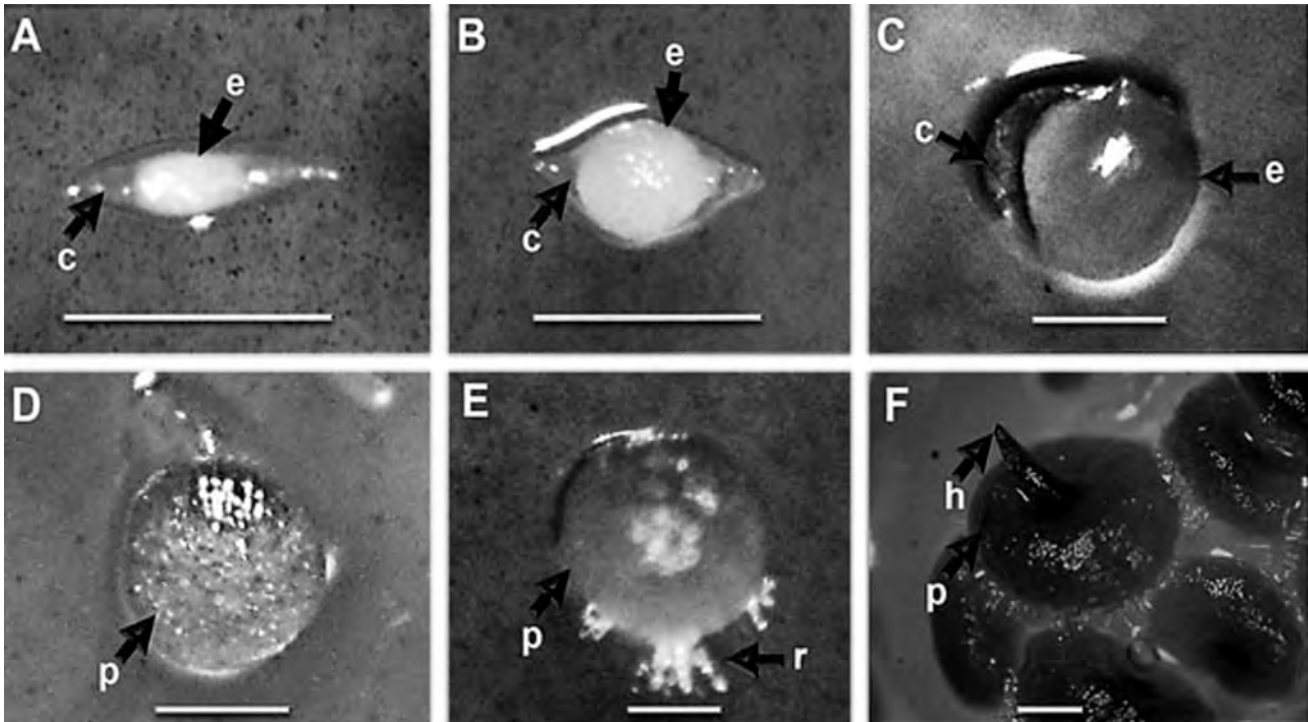


Figura 3. Etapas del desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis*. A) Etapa 0: Semillas no germinadas. (B) Etapa 1: Imbibición. (C) Etapa 2: Germinación (D) Etapa 3: Formación de protocormos (E) Etapa 4: Desarrollo de rizoides (F) Etapa 5: Formación de hojas. Escala de la barra = 1mm. c: cubierta de la semilla; e: embrión; h: hoja; p: protocormo; r: rizoides.

Pierik (1990), Arditti (1993), Arditti y Gani (2000), consideran la fase 1, como la primera etapa en el proceso de germinación en las semillas de orquídeas; en esta fase se logra observar el mayor porcentaje de imbibición (figura 3B), en el medio MS control, con un porcentaje de 57.33%, presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$; tukey con HSD) (tabla 5, fase I), frente a los demás medios evaluados, esta fase se vio reflejada al inicio de la semana 2, donde las semillas presentaron hinchamiento pronunciado y una coloración verde pálida del embrión, ocasionado por la absorción del agua presente en cada uno de los medios. Sin embargo, las características morfológicas de impermeabilidad de la testa en las semillas de *Phalaenopsis*, dificulta el inicio del desarrollo de esta fase, por tal motivo, Vujanovic *et al.* (2000) y Ervin y Wetzell, (2002), afirman que el NaOH es un compuesto que estimula la germinación de semillas, por la erosión de la cubierta de la semilla y el aumento en la permeabilidad del oxígeno.

En la fase de imbibición, el embrión logra un incremento en el tamaño y a su vez, una coloración verde acentuada, dando origen al rompimiento de la testa y al inicio de la fase de germinación (figura 3C), la cual inicia al finalizar la semana 4, donde el desarrollo se da de en forma muy equilibrada, alcanzando el mayor

porcentaje de germinación en el medio MS+AC con un 67.53%, resultado que presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$; tukey con HSD) con el medio MS+ AIA. (tabla 5, fase II).

Así mismo Thompson *et al.*, (2006), afirmaron que el uso adecuado de las concentraciones de NaOH en la desinfección, influye directamente en la inducción a la germinación de las semillas de orquídeas, como lo alcanzado en esta investigación. Adicionalmente, una baja germinación en las semillas no se deberá atribuir al poco efecto de escarificación generado en las mismas, sino al periodo de latencia como lo afirma Flórez y Pedroza, (2006); por otro lado, Vasudevan y Staden (2010) afirma que la disponibilidad del agua en el medio de cultivo puede llegar a influir en el desarrollo óptimo de esta fase.

La formación de protocormo y de rizoidez (figura 3D y E), se desarrolló notablemente en los medios suplementados con componentes orgánicos, resultado que coincide con lo descrito por Kitsaki *et al.*, (2004), quien afirma que el uso de aditivos orgánicos potencializa el medio de cultivo, por tal motivo, se puede establecer que los componentes orgánicos usados en el establecimiento de semillas del híbrido de *Phalaenopsis*, per-

Tabla 5. Efecto del medio de cultivo en la germinación y formación de plántulas a las 18 semanas de desarrollo.

Medios	Efecto del medio de cultivo					
	F0	F1	F2	F3	F4	F5
MS	7,1 ^a	57,3 ^d	62,7 ^{ab}	52,7 ^a	20,7 ^a	0,0 ^a
MS+AC	4,2 ^d	18,2 ^a	67,5 ^b	63,4 ^{bc}	66,8 ^b	50 ^b
MS+JP	6,6 ^{bc}	19,7 ^a	63,3 ^{ab}	66,1 ^c	65,9 ^b	48,8 ^b
MS+AIA	6,4 ^{ab}	46,7 ^c	53,8 ^a	53,7 ^a	42,6 ^c	0,0 ^a
MS+GA ₃	5,6 ^c	38,2 ^b	58,7 ^{ab}	60,3 ^b	47,6 ^c	0,0 ^a

Los valores de las medias con diferente letra de cada columna, indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de *Tukey HSD* ($P \leq 0.05$).

miten que las semillas crezcan de una forma rápida y logren almacenar reservas, posibilitando una mayor sobrevivencia en invernadero.

Los tratamientos sin componentes orgánicos muestran la talla más baja en la formación de plántulas (figura 3F), esto coincide con lo descrito por Rodríguez *et al.* (2000), en *Phaphiopedillum caudatum*, donde se observaron los mejores resultados al agregar al medio de cultivo agua de coco, esto manifiesta lo dicho por Nongrum *et al.*, (2007) y Abbas *et al.* (2011), quienes afirmaron que la adición de componentes orgánicos al medio de cultivo ejerce un efecto benéfico en la germinación y el desarrollo de tejidos celulares, formando plántulas de *Coelogyne ovalis* y *Grammatophyllum scriptum*. De igual manera Shina *et al.* (2004), obtuvieron los mayores tamaños de brotes de *Vanda*, al agregar 10% de agua de coco.

La germinación y desarrollo de plántulas de híbridos de *Phalaenopsis*, en general, presentó la mejor germinación en el medio de cultivo MS+AC, encontrando diferencias significativas, resultado que no coincide con lo descrito por (Salazar y Cancino, 2012), donde el mejor porcentaje de germinación se desarrolló en el medio de cultivo suplementado con jugo de piña para las especies de *Prosthechea vespa* y *Sobralia klotzscheana*, posiblemente debido a que todas las especies tienen diferentes necesidades nutricionales, por tal motivo, se ve la necesidad de estudiar las condiciones para cada especie como lo afirma Ruiz *et al.*, (2008), en donde Dutra *et al.*, (2009); Basker *et al.*, (2010); Kauth *et al.*, (2011), implementaron diferentes medios de cultivos para la preservación de orquídeas.

Por otra parte, Pedroza (2009), demostró que la adición de AIA (0,5 mg/L) al medio de cultivo MS promo-

vía las fases del desarrollo de *Epidendrum elongatum*, así mismo, autores como Manrique *et al.*, (2005); Coello *et al.*, (2010) resaltan la importancia de la GA₃, en la germinación y el crecimiento de las orquídeas, sin embargo cabe considerar, que a pesar de la dificultad en el análisis de su composición y la poca información en la literatura acerca de los efectos que tienen los componentes orgánicos, como el agua de coco y el jugo de piña, estos son ricos en energía, vitaminas, aminoácidos y fitohormonas (Kitsaki *et al.*, 2004; Yam y Arditti, 2008; Yong *et al.*, 2009). En esta investigación se reporta que la adición de estos aditivos orgánicos al medio MS mejora la eficacia de éste, y por lo tanto, permite un mayor crecimiento y desarrollo de los híbridos de *Phalaenopsis*.

Conclusiones

La prueba de tetrazolio permitió evidenciar la pérdida de viabilidad de las semillas de *Phalaenopsis*, demostrando la eficacia de este método para predecir la capacidad de germinación de esta especie de orquídea. Y a su vez, concluir que la concentración y el tiempo de inmersión, son directamente proporcionales a la disminución de la viabilidad del tejido embrionario.

El medio MS suplementado con agua de coco tuvo una mayor eficacia en la germinación y formación de plántulas en el híbrido de *Phalaenopsis*. Demostrando que la adición de compuestos orgánicos en los medios de cultivo *in vitro* es de suma importancia para obtener grandes volúmenes de material vegetal, contribuyendo de esta manera al uso de componentes orgánicos como posible sustituto de las hormonas sintéticas debido a los bajos costos de rentabilidad que presentan estos suplementos orgánicos por su fácil adquisición.

Agradecimientos

A la universidad Francisco de Paula Santander por el financiamiento del proyecto FINU titulado: Evaluación de la germinación *in-vitro* de *Phalaenopsis* híbrida, (Orchidaceae); a Yuri Osorio por su asistencia técnica. A la Ingeniera Alina Sigarroa por administrar el dinero del proyecto FINU.

Referencias bibliográficas

- Abbas, B., Heningtyas, F., Amriati, B. 2011. *In vitro* seeds germination and plantlets development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae). *International Research Journal of Plant Science*. 2 (5): 154-159.
- Arditti, J., Ernst, R. 1993. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Arditti, J., GHANI, A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*. 145 (3): 367-421.
- Asghar, S., Ahmad, T., Ahmad, I., Yaseen, M. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology*. 10 (16) : 3097-3103.
- Basker, S., Bai, N. 2010. *In vitro* propagation of an epiphytic and rare orchid *Eria bambusifolia* Lindl. *Research in Biotechnology*.1: 15-20.
- Batty, M. Brundett, M. (2001). *Orchid conservation techniques manual*. Canberra. Plant Science, Kings Park and Botanic Garden. First International Orchid Conservation Congress - Training Course. Perth, Western Australia, 20 September 2001.
- Canuto, R.A. 2012. Dehydrogenases. InTech Design Team. Croatia. ISBN 978-953-307-019-3, p 366.
- Chen, C., y Li, S. 2012. CO₂ uptake patterns in *Phalaenopsis amabilis*. *African Journal of Agricultural Research*. 7(1): 128-141.
- Chen, G., Chen, D., Wang, T., Li, L. 2012. Analysis of the proteins related to browning in leaf culture of *Phalaenopsis*. *Scientia Horticulturae*. 141: 17-22.
- Chu, C., Chung, Y., Shium, Y., Lin, W., Hung, C. 2012. Plastid trnL intron polymorphisms among *Phalaenopsis* species used for identifying the plastid genome type of *Phalaenopsis* hybrids. *Scientia Horticulturae*. 142: 84-91.
- Coello, C., Miceli, C., Orantes, C., Dendooven, L., Gutiérrez, A. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe kinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgins. *Gayana Botanica*. 67(1): 19-26.
- Dutra, D., Johnson, T., Kauth P., Stewart, S., Kane, M. 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 94: 11-21.
- Ervin, G.N., Wetzell, R. 2002. Effects of sodium hypochlorite sterilization and dry cold storage on germination of *Juncus effusus* L. *Wetlands*. 22: 191-195.
- Feria, M., Chávez, M., Quiala, M. 2007. Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*. *Bioteconología Vegetal*. 1: 27 - 33.
- Flórez, V., Pedroza, J. 2006. Germinación y dormancia en semillas. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. pp. 49-52.
- Griesbach, R.J. 2002. Development of *Phalaenopsis* Orchids for the Mass-Market. p. 458-465. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), *Trends in New Crops and New uses*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Hirano, T., Yukawa, T., Miyoshi, K., Mii, M. 2011. *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds for seeds of some Cymbidium species. *Plant Biotechnol*. 28: 99-102.
- Kauth, P., Kane, M., Vendrame, W. 2011. Comparative *in vitro* germination ecology of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae) across its geographic range. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*.47:148-156.
- Kitsaki, C., Zygouraki, S., Ziobora, M., Chintziest, S. 2004. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*. 23:284-290.
- Košir, P., Škof, S., Luthar, Z. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta agriculturae Slovenica*. 83(2): 233 - 242.
- Knudson, L. 1946. A nutrient for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin*.15:214-217.
- Lauzer, D., Renaut, S., Arnaud, S., Barabé, D. 2007. *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *Journal of the Torrey Botanical Society*. 134. (3): 344-348.
- Lesar, H., Čeranič, N., Kastelec, D., Luthar, K. 2012. Asymbiotic seed germination of *Phalaenopsis* Blume orchids after hand pollination. *Acta agriculturae Slovenica*. 99 (1): 5- 11.
- Leva, A., Rinaldi, L. 2012. Recent Advances In Plant *In Vitro* Culture. *InTech Prepress, Novi Sad*. p 219.
- Manrique, J., Fernandez, C., Suárez, A. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comporettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 41: 838-843.
- McKendrick, S., J. Leake, D. Taylor D. Read. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytologist*. 154 (1): 233-247.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*. 15: 437-497.
- Murdad, R., Latip, M., Aziz, Z., Ripin, R. 2010. Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 18 (1): 199-202.
- Murdad, R., Kuik, S.H., Choo, K.S, Mariam, A., Aziz, Z.A., Ripin, R. 2006. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed base protocorms technique. *Scientia Horticulturae*. 111 (1): 73-79.
- Mweetwa, A., Welbaum, G., Tay, D. 2008. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Scientia Horticulturae*. 117: 257-262.
- Niknejad, A., Kadir, M., Kadzimin, B. 2011. *In vitro* plant regeneration from protocorms-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (Epidendroideae: Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology*. 10 (56): 11808-11816.
- Nishimura, G. 1982. Japanese orchids. In: Arditti J (ed) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives II, Orchid seed germination and seedling culture- a manual*. Ithaca: Cornell University Press, New York. pp. 331-346.

- Nongrum, L., Kumaria, S., Tandon, P. 2007. The influence of *in vitro* media on asymbiotic germination, plantlet development and *ex vitro* establishment of *Coelogyne ovalis* Lindl. and *Coelogyne nitida* (Wall. Ex Don) Lindl. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 73 (4): 205-207.
- Ossenbach, C., Arce, J., Warner, J. 2007. Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. *Tierra Tropical*. 3 (1): 47-59.
- Padilla, J. 2011. Prueba de viabilidad con tetrazolio. Consultado en Diciembre 8, 2011, en <http://snics.sagarpa.gob.mx/Documents/pruebaviabilidad>
- Park, S.Y., Murthy, H.N., Paek, K. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science*. 164: 919-923.
- Pedroza, J. 2009. The effect of activated charcoal, indol acetic acid (IAA) and benzyl amino purine (BAP) on *Epidendrum elongatum* Jacq protocorm-like body (PLB) development *in vitro* conditions. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6 (1): 17-32.
- Pedroza, J., Serrato, L. 2010. Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden y *Maxillaria nutans* Lindl. *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 12 (2): 86-102.
- Pierik, K. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi Prensa Madrid, p 301.
- Quiala, E., Montalvo, G., Matos, J., Chávez, M., de Feria M, Mederos, R. 2005. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Guettarda clarensis*, especie endémica de Cuba en peligro de extinción. *Biotecnología Vegetal*. 5 (1): 23-26.
- Ruíz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H. Azpíroz, R. 2008. *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) seeds. *Python Revista Internacional De Botánica Experimental*. 77 : 203-215.
- Rodríguez, F. 2000. Germinación y desarrollo *in vitro* de *Paphiopedilum extaminodium* y *P. caudatum*, especies en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias. UNAM. pp.56.
- Salazar, S. 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agronómica*. 61 (1): 68-78.
- Salazar, S., Cancino, G. 2012. Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14 (1): 53-59.
- Sinha, P., Roy, S. 2004. Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. Throug *in vitro* culture. *Plan Tissue Culture*. 14 (1):55-61.
- Thompson, D., Trevor, J., Van, J. 2006. Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability *in vitro*: relationships, requirements and first-time reports. *Plant Growth Regulation*. 49: 269-284.
- Tokuhara, K., y Mii, M. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 37: 457-461.
- Tukey, J. W.. 1994. The problem of multiple comparisons. En: H. L. Braun (ed.). *The collected works of John W. Tukey*. Nueva York: Chapman and Hall. VIII, p 300.
- Vacin, E., Went, F. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*. 110: 605-613.
- Vasudevan, R. y Staden, J. 2010. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Journal Scientia Horticulturae*. 123: 496 -504.
- Vendrame, W., Carvalho, V., Dias, J. 2007. *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Scientia Horticulturae*. 114 (3): 188-193.
- Vogel, I., Macedo, A. 2011. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 104: 147-155.
- Vujanovic, V., Arnaud, M., Barabé, D., Thibeault, G. 2000. Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination. *Annals of Botany*. 86: 79-86.
- Yamazaki, J., Miyoshi, K., 2006. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*. 98, 1197-1206.
- Yam, W., Nair, H., Hew S., Arditti J. 2002. Orchid seeds and their germination: An historical account. In: Kull T, Arditti J (Ed) *Orchid biology: reviews and perspectives*, VIII. Kluwer, Dordrecht, pp 387-504.
- Yam, Tim., Arditti, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*. 3 (1): 1-56.
- Yong, J., Ge, L., Yan, F., Ngim, S. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*. 14: 5144-5164.
- Zhao, Y., Yang, S.H., Ge, W.Y., Li, Q., Chen, H.X., Ge, H., 2010. The metabolism of phenolics and reactive oxygen species in relation to the explant browning differences among the varieties of *Phalaenopsis* during the tissue culture. *Acta Horticulturae*. 37: 963-970.