

## INGENIERÍA BIOQUÍMICA

# “ENCAPSULACIÓN DE PLÁNTULAS DE *CATTLEYA TRIANAE* MEDIANTE EXTRUSIÓN-LIOFILIZACIÓN”

### INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

#### **PRESENTA:**

DANIA SINAÍ ALAMÍAS FLORES

#### **ASESOR:**

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

ENERO 2018

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por haber sido mi casa de estudios y por la oportunidad que me brindó para formarme como profesionista en sus instalaciones.

En especial, agradezco al Dr. Miguel Abud Archila por brindarme la oportunidad de pertenecer al Laboratorio de Investigación, así como al Dr. Federico Gutiérrez Miceli por permitirme acceder al Laboratorio de Cultivos Vegetales, gracias además por todos los conocimientos que compartieron conmigo.

A mi mamá, la Maestra Maribel Flores Vidal, por ser mi mayor ejemplo, mi soporte, mi consejera y mi más grande apoyo siempre. A mi hermanito, a mis tíos, a mis abuelitos, a mi familia, por cuidarme y darme su aliento cuando lo necesitaba.

A mis amigos, en especial a Alejandra Cancino Antonio, por haberme brindado su amistad, su cariño y apoyo en diversos aspectos cada vez que lo necesité, y a todos mis amigos y compañeros de la Universidad, porque sin ustedes no habría sido lo mismo.

---

---

## RESUMEN

*Cattleya trianae* es una orquídea utilizada para uso ornamental, muy apreciada por los coleccionistas y de gran importancia horticultural. La propagación vegetativa de esta planta mediante sus semillas es muy lenta, ya que es necesaria su asociación con micorrizas para su germinación y supervivencia. Debido a esto, el saqueo y la destrucción de su hábitat es cada vez mayor, por lo que se encuentra clasificada en peligro de extinción.

Con el fin de aumentar la producción de plantas, se ha recurrido a su propagación mediante el cultivo de tejidos vegetales, pero otra alternativa es la tecnología de encapsulación con alginato de sodio para producir semillas sintéticas.

En este trabajo se estableció un protocolo para la encapsulación de plántulas de *Cattleya trianae* previamente seleccionadas para obtener semillas sintéticas. Las plántulas fueron encapsuladas con una solución de alginato de sodio al 4% y cloruro de calcio 0.1M y posteriormente almacenadas a diferentes temperaturas, de las cuales la mayor sobrevivencia de las plántulas fue en condiciones de almacenamiento de 4°C.

---

---

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	ii
RESUMEN .....	iii
ÍNDICE .....	iv
INTRODUCCIÓN .....	1
DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA U ORGANIZACIÓN Y DEL PUESTO O ÁREA DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE .....	3
PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS .....	5
OBJETIVOS .....	6
JUSTIFICACIÓN .....	7
MARCO TEÓRICO.....	8
1. Orquídeas.....	8
1.1 Clasificación .....	8
1.1.1 Apostasioideae .....	8
1.1.2 Cyripedioideae .....	9
1.1.3 Vanilloideae .....	10
1.1.4. Orchidoideae .....	11
1.1.5 Epidendroideae.....	12
1.2 Morfología .....	13
1.2.1 La raíz.....	13
1.2.2 El tallo .....	14
1.2.3 Las hojas .....	14
1.2.4 Las flores .....	15
1.2.5 El fruto .....	16
1.3 Reproducción .....	17
1.3.1 Propagación asexual .....	17
1.3.2 Propagación sexual .....	18
1.4 Condiciones de hábitat natural.....	18
1.4.1 Orquídeas epífitas.....	19
1.4.2 Orquídeas terrestres .....	19

---

1.4.3 Orquídeas litófilas o rupícolas.....	19
1.4.4 Orquídeas subterráneas .....	19
1.5 Crecimiento .....	20
1.6 Género <i>Cattleya</i> .....	20
1.6.1 <i>Cattleya trianae</i> .....	21
1.6.1.1 Generalidades .....	21
1.6.1.2 Ubicación.....	22
1.6.1.3 Propagación tradicional .....	22
1.6.1.4 Propagación in vitro .....	22
2. Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales .....	23
3. Semillas sintéticas.....	25
3.1 Encapsulación.....	26
3.1.1 Alginato.....	26
3.1.1.1 Estructura del alginato .....	27
3.1.1.2 Solubilidad .....	28
3.1.1.3 Formación de gel de alginato por entrecruzamiento.....	30
DESARROLLO.....	31
Preparación de medio de cultivo para <i>Cattleya trianae</i> .....	31
Selección de plántulas de <i>Cattleya trianae</i> .....	31
Elaboración de perlas de alginato de sodio .....	32
Liofilización de perlas de alginato de sodio.....	32
Rehidratación de perlas de alginato de sodio liofilizadas.....	32
Elaboración de perlas de alginato de sodio con medio de cultivo .....	32
Almacenamiento de perlas de alginato de sodio.....	33
RESULTADOS.....	34
Plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS .....	34
Plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS.....	36
Plántulas encapsuladas en perlas de alginato de sodio liofilizadas .....	38
Sobrevivencia de plántulas encapsuladas .....	41
Contaminación de plántulas encapsuladas.....	43
DISCUSIÓN .....	45

---

---

CONCLUSIONES.....	49
COMPETENCIAS DESARROLLADAS .....	50
FUENTES DE INFORMACIÓN .....	51
ANEXOS .....	55

---

---

## INTRODUCCIÓN

Entre las más de 30.000 especies que constituyen la familia Orchidaceae, las especies con importancia económica son casi todas ornamentales (Dressler 1981), a excepción de las especies comestibles del género *Vainilla*. Por su gran valor comercial y su fácil recolección, las poblaciones nativas han sido sujeto de una extracción indiscriminada de individuos que, asociada a la destrucción de sus hábitats naturales, tiene a muchas especies en peligro de extinción (Calderón, 2007).

*Cattleya trianae* es una planta de amplio uso ornamental, es considerada la flor nacional de Colombia y es comúnmente llamada flor de mayo (Díaz-Piedrahita, 2001). En esta especie es común encontrar muchas variedades e híbridos, ya que es una planta muy apreciada por los coleccionistas. La reproducción de orquídeas, su manejo y su cuidado requieren de mucho esfuerzo, pues son muy difíciles de cultivar. Es por eso que la germinación in vitro de semillas es muy importante para la producción comercial de muchas especies e híbridos de orquídeas (Arditti y Ernst, 1993), siendo la única manera de aprovechar las semillas. Sin embargo, es posible utilizar otros métodos de cultivos vegetales para la obtención de plántulas viables de orquídeas.

Los métodos de cultivo in vitro están siendo utilizados con éxito para desarrollar y establecer diferentes protocolos para la micropropagación, y obtención de plántulas de diferentes especies de orquídeas, especialmente de las que se encuentran en peligro de extinción. (Pinzon, Katherin L., 2016). Las diferentes técnicas de laboratorio permiten una mejora sustancial en los cultivos vegetales y no sólo en el cultivo de orquídeas, contribuyendo así a la preservación de especies amenazadas.

La preservación de los recursos genéticos globales ha forzado el desarrollo de nuevas metodologías de micropropagación, ya que algunas especies aún presentan dificultades para su multiplicación de manera natural, probablemente debido a la heterocigosidad de la semilla, la presencia de un endospermo reducido, la

---

---

necesidad de una asociación micorrízica (como en el caso de las orquídeas) o que los frutos no poseen semillas (Saiprasad, 2001).

Una de las formas utilizadas para ayudar en la conservación y propagación de plantas difíciles de cultivar es mediante el uso de semillas sintéticas. Estas semillas son un tipo de encapsulado, sin embargo mientras que la encapsulación normalmente es un proceso aplicado para proteger, mediante un material de recubrimiento o material pared, la estabilidad, biodisponibilidad y conservación de los componentes bioactivos y así mismo la viabilidad en microorganismos (*Fritzen-Freire CB, et. Al. 2012*), el término semilla sintética describe, generalmente, a un embrión somático, encapsulado con una cubierta que lo protege del ambiente, aunque también es posible encapsular otros tipos de explantes, y su propagación puede ser con fines comerciales o de conservación.

La tecnología de encapsulación ha llamado la atención en los últimos años debido a su amplio uso en la conservación y producción de cultivo de tejidos de plantas de importancia comercial y económica. La producción de semillas sintéticas mediante la encapsulación de embriones somáticos, brotes o cualquier otro tejido meristemático ayuda a minimizar el costo de las plántulas micropropagadas para la comercialización y la entrega final. Una de las grandes ventajas es que las semillas sintéticas pueden estar disponibles durante todo el año, mientras que la mayoría de las plantas producen semillas solo en ciertos meses del año. (Rai et al., 2009)

El Laboratorio de Cultivos Vegetales del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez cuenta con algunas variedades de Orquídeas, las cuales son micropropagadas regularmente con el fin de conservarlas y tener materia vegetal para diferentes análisis y proyectos de estudio. Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron plántulas de *Cattleya trianae*, las cuales fueron encapsuladas en una matriz de alginato de sodio como protector en complejo con cloruro de calcio, con el fin de determinar su viabilidad y monitorear el tiempo que pueden permanecer conservadas de esta forma en almacenamiento.

---

---

## **DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA U ORGANIZACIÓN Y DEL PUESTO O ÁREA DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE**

El proyecto se desarrolló en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, el cual se encuentra ubicado en la Carretera Panamericana Km. 1080, Código Postal 29050, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Sus coordenadas son 16°46'00" de latitud Norte y 93°05'00" de longitud Oeste.

Es una Institución educativa pública de educación superior, que forma parte del Tecnológico Nacional de México. Esta universidad se fundó en 1971, por iniciativa del gobierno estatal para contrarrestar la falta de instituciones de educación superior en Chiapas.

Cuenta con un campus en el que se ofrecen nueve ingenierías, siete de las cuales se encuentran acreditadas por el Consejo de Acreditación de la Enseñanza de la Ingeniería, A.C., (CACEI), además posee un Centro de Posgrado para estudios de Maestría en Ciencias en Mecatrónica, Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y el Doctorado en Ciencias en Biotecnología.

Actualmente es considerado una de las tres máximas casas de estudios del estado de Chiapas, junto con la Universidad Autónoma de Chiapas y Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Su lema es Ciencia y Tecnología con Sentido Humano y su actual director es el M.E.H José Luis Méndez Navarro.

Su misión es formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

Su visión es ser una Institución de Excelencia en la Educación Superior Tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

---

---

Dentro de las instalaciones la Institución cuenta con un Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles con un total de 11 laboratorios dedicados a la investigación, un centro de información, una biblioteca, edificios para las aulas, diferentes laboratorios así como salas audiovisuales.

Durante el tiempo de permanencia de la residencia profesional el puesto de trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación mayormente, sin embargo cuando las actividades lo requerían también se utilizó el Laboratorio de Cultivos Vegetales.

El trabajo fue mayormente práctico, dado que por la naturaleza del proyecto era necesario hacer diferentes prácticas y análisis haciendo uso de los materiales, equipos e instalaciones de los laboratorios. Ambos se encuentran dentro del Instituto, siendo estas las áreas en las que se realizaron las pruebas de los experimentos y las actividades propuestas.

---

---

## PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS

La familia Orchidaceae contiene entre 17,000 y 35,000 especies. Sin embargo, a pesar de esa gran diversidad, muchas de las especies se encuentran amenazadas por la deforestación y la extracción de los lugares donde habitan, pues son plantas que por su belleza y rareza poseen un gran potencial comercial, todo esto sumado a la dificultad que presentan para ser cultivadas.

Dentro de las principales problemáticas en este tema se encuentran el saqueo y la destrucción del hábitat de las orquídeas, las especies amenazadas o en peligro de extinción, la complicada situación de su reproducción en viveros, así como la dificultad que presentan muchas especies de ser cultivadas in vitro.

Son varias las especies de orquídeas con un valor actual o potencial en el mercado de plantas de ornato, sin embargo, se dificulta la reproducción de las orquídeas por semilla, porque éstas son diminutas y en la mayoría de los casos, se requiere de la simbiosis con un hongo micorrízico para que la semilla germine (Arditti, 1984, Hadley, 1997). Aunque para orquídeas terrestres ha habido avances importantes en cuanto a la germinación simbiótica, los avances para las orquídeas epífitas son pocos. Damon, A. (2004) indica que actualmente, se presentan cuatro opciones para el cultivo y comercialización de orquídeas epífitas:

1. El saqueo ilegal de plantas de la naturaleza y su venta a bajo precio.
2. La propagación vegetativa, que es muy lenta y poco redituable.
3. La propagación in vitro usando semillas, que a pesar de las técnicas de laboratorio suelen tener un índice de germinación bajo.
4. El cultivo de tejidos, con las limitantes que presenta.

Dado el grado de amenaza de este representativo grupo de plantas y su potencial horticultural, es de vital importancia desarrollar estrategias que promuevan el uso y la producción sostenible de las orquídeas, donde se asegure su conservación e impacte también en el ámbito comercial.

---

---

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del agente crioprotector sobre la sobrevivencia de plántulas de *Cattleya trianae* obtenidas por micropropagación.

### **Objetivo específico**

Determinar la viabilidad de las plántulas encapsuladas en alginato de sodio después de 0, 30, 60 y 75 días.

Determinar la viabilidad de las plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS después de 0, 30 y 60 días.

Evaluar las mejores condiciones de almacenamiento de las plántulas encapsuladas a 4°C y T° ambiente.

---

---

## JUSTIFICACIÓN

Las características de la orquídea *Cattleya trianae* la convierten en una planta sumamente atractiva en el mercado, teniendo una alta demanda comercial, lo que ha provocado el saqueo de la misma de su hábitat natural con el fin de venderla como planta de ornato. Aunado a esta situación, se encuentra su baja tasa de propagación, ya que al igual que en las demás orquídeas, sus semillas carentes de endospermo poseen baja capacidad de germinación (1–5%), relacionada con la obligatoria asociación micorrízica (Martin y Pradeep, 2003).

El desarrollo de metodologías que permitan la propagación eficiente de esta especie, representa una alternativa viable para su conservación y uso sustentable, así como una estrategia para evitar la colecta de ejemplares en la naturaleza.

La producción de semillas sintéticas mediante la encapsulación de plántulas micropropagadas de *Cattleya trianae* en alginato de sodio podría ayudar a minimizar estas problemáticas, al facilitar la obtención de semillas sintéticas con plántulas viables que pueden estar disponibles todo el año.

El alginato de sodio es una de las matrices mayormente utilizadas para el encapsulamiento y la producción de semillas sintéticas, debido a que presenta buen soporte protegiendo idealmente al tejido en su interior, lo que ayuda a minimizar el costo de las plántulas micropropagadas para la comercialización y asegurar la entrega final.

---

---

# MARCO TEÓRICO

## 1. Orquídeas

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas del reino vegetal, se estima que existen alrededor de 25.000 a 30.000 especies en todo el mundo distribuidas en 750 géneros (Thorpe, T. A. y Yeung, E. C., 2011). Taxonómicamente esta familia representa una de las más evolucionadas entre las monocotiledóneas, despertando gran interés debido a la gran variedad de formas, tamaños y colores que presentan sus vistosas flores.

### 1.1 Clasificación

En la actualidad se reconocen cinco linajes principales dentro de las orquídeas, consideradas de manera formal como subfamilias (Chase et al., 2003). De acuerdo con su orden de aparición en el árbol evolutivo de la familia, estas son Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae, las que se describen a continuación.

#### 1.1.1 Apostasioideae

Las Apostasioideae se encuentran únicamente en el sureste asiático y se consideran el grupo de orquídeas más primitivo. Presentan dos o tres estambres en sus flores, las cuales son “regulares” y se parecen a las del género *Hypoxis* (de la familia Hypoxidaceae).

Las hojas se disponen en forma espiralada en los tallos, son plegadas, resupinadas. El saco embrionario es bispórico, del tipo *Allium*. El número cromosómico básico es  $x=24$ . Incluye sólo dos géneros (*Apostasia* y *Neuwiedia*) y aproximadamente 16 especies.

Se encuentran distribuidas en las regiones que se observan en la Figura 1.



Figura 1. Mapa de distribución de la subfamilia Apostasioideae

### **1.1.2 Cyripedioideae**

La subfamilia de las Cyripedioideae, conocidas popularmente como orquídeas “zapatillas de dama” debido a la abultada forma de zapatilla de su labelo que funciona como atrapa insectos, ya que el insecto es forzado a pasar con la espalda por el estaminodio, con lo que se recolectan o depositan las polinias.

En estas orquídeas, dos anteras fértiles se disponen a cada lado de la columna. El estambre central es estéril y está curiosamente modificado como un escudo que impide el acceso directo de los polinizadores desde el frente de la flor a la parte central. Los otros dos estambres están escondidos detrás de este estaminodio.

El labelo saculiforme ha evolucionado como una trampa para los polinizadores. Las paredes internas del labelo son muy resbalosas pero una escalera de pelos yace en el interior de la pared dorsal. Este conduce bajo el estigma ventral a una de las dos

---

salidas en la base del labelo a cada lado de la columna. También retienen características primitivas, tales como la presencia de dos estambres en las flores.

Comprende cinco géneros: *Cypripedium*, *Mexipedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* y *Selenipedium* y cerca de 150 especies, las cuales se distribuyen en cinco tribus monotípicas. Están ampliamente distribuidas en Eurasia y América, ausente en África y en Australia; tiene alrededor de 155 especies y cinco géneros, de los cuales tres (*Cypripedium*, *Mexipedium* y *Phragmipedium*) se encuentran en México, como se observa en la Figura 2.



Figura 2. Mapa de distribución de la subfamilia Cypripedioideae

### 1.1.3 Vanilloideae

Las vanilloideae hace poco tiempo fueron confirmadas como una subfamilia distinta (Cameron et al., 1999); incluyen 15 géneros y cerca de 250 especies y tienen una distribución amplia, aunque la mayoría de las especies son tropicales. En México esta subfamilia está representada únicamente por el género *Vanilla*, que incluye la vainilla comercial, *V. planifolia*. En la Figura 3 se observan las regiones del planeta donde se encuentran.

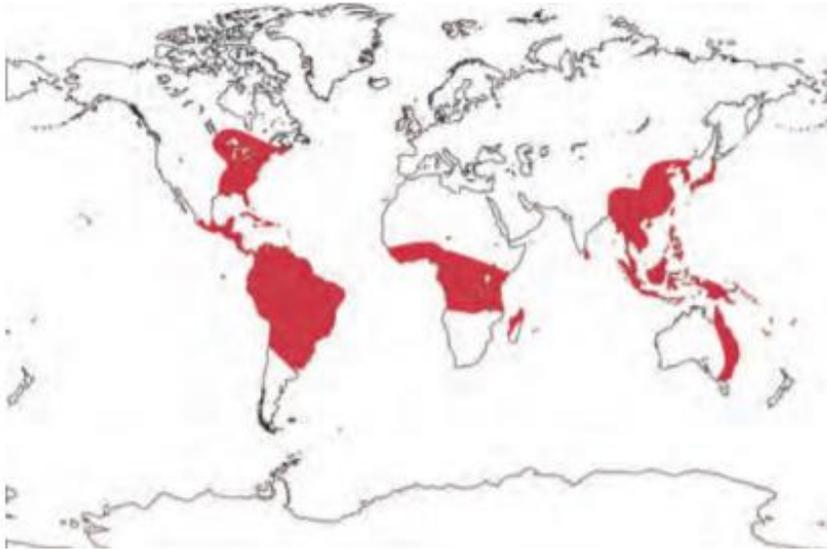


Figura 3. Mapa de distribución de la subfamilia Vanilloideae

#### 1.1.4. Orchidoideae

La subfamilia Orchidoideae incluye en su mayoría orquídeas terrestres con tubérculos o rizomas carnosos. El género tipo *Orchis* y las “orquídeas abeja” (*Ophrys*, que se denominan así porque su labelo parece el abdomen de una abeja) pertenecen a este grupo, que comprende 211 géneros y cerca de 4 700 especies distribuidas en todo el mundo, excepto en los desiertos más secos, en el Círculo Polar Ártico y en la Antártida.

Los miembros representativos de Orchidoideae incluyen a *Cynorkis*, *Diuris*, *Goodyera*, *Habenaria*, *Orchis*, *Platanthera*, *Spiranthes* y *Zeuxine*. En México se despliega una diversidad importante y muchas especies terrestres pertenecen a este grupo; en particular son variadas las orquídeas *Spiranthes*. Esta subfamilia también incluye otros grupos muy conocidos, como *Habenaria* y *Platanthera*, y las orquídeas *Goodyerinas*, *Prescottinas* y *Cranichidinas*. Su distribución se observa en la Figura 4.



Figura 4. Mapa de distribución de la subfamilia Orchidoideae

### 1.1.5 Epidendroideae

La subfamilia Epidendroideae es el linaje con mayor diversidad tanto en número de especies y géneros como en hábitos y formas de vida, intervalo de tamaños y estrategias evolutivas, además de ser el grupo predominante en el biotopo epífita. El 80% de las orquídeas, es decir, más de 570 géneros y cerca de 19 800 especies pertenecen a esta subfamilia, distribuidas en las mismas regiones de Orchidoideae, si bien incluyen algunas especies subterráneas del desierto australiano.

Epidendroideae incluye numerosas epífitas tropicales, entre los géneros representativos se incluyen *Bulbophyllum*, *Catasetum*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Encyclia*, *Maxillaria*, *Oncidium*, *Pleurothallis* y *Vanda*. La delimitación de los géneros en estos grupos es notoriamente problemática. Con excepción de las orquídeas “zapatillas”, todas las orquídeas ampliamente cultivadas pertenecen a este grupo. En México los grupos principales de orquídeas epidendroides son los Malaxidae, las Blettiinas, las Laeliinas, las Pleurothallidinas, las Oncidiinas, las Maxillariinas y las Catasetinas, además de muchos otros más pequeños. Su distribución se observa en la Figura 5.



Figura 5. Mapa de distribución de la subfamilia Epidendroideae

## 1.2 Morfología

Las orquídeas son plantas herbáceas, perennes (raramente anuales), terrestres o epífitas, ocasionalmente trepadoras, algunas veces saprófitas o raramente, micoparásitas.

### 1.2.1 La raíz

Es la estructura de la planta que la mantiene fija a la tierra o al sustrato y por medio de la cual toma agua y otros minerales del suelo. En las especies terrestres las raíces son iguales a la de cualquier otra planta: alargada y ramificada, cubierta con pelos absorbentes; sin embargo en las epífitas presentan las raíces aéreas colgando o unidas a la corteza de los troncos.

Tanto en las especies terrestres como en las epífitas y litófilas, las raíces están protegidas por un tejido esponjoso de células muertas de color blanco o gris, llamado velamen que actúa como esponja y facilita la absorción del agua y de los gases del aire. En el extremo de la raíz de las epífitas existe una parte verde, que tiene la función de realizar la fotosíntesis.

---

---

Estas raíces se encuentran asociadas con hongos conocidos como micorrizas, simbiosis que es importante para el desarrollo y nutrición de los dos organismos.

### **1.2.2 El tallo**

Es el órgano localizado entre la raíz y las hojas y retoños, que sirve para conducir y almacenar agua así como los minerales alimenticios que la planta utiliza en épocas de sequía y/o reposo, así como también en el momento de su floración; también es un órgano útil para efectuar la fotosíntesis.

Existe una gran variedad de tallos desarrollados como respuestas adaptativas a los diferentes medios donde habitan las orquídeas: hay tallos aéreos, que crecen hacia arriba o colgando hacia abajo.

Otro tipo de tallo es el pseudobulbo, característico de las orquídeas epífitas, que es un tallo engrosado carnoso de muy variadas formas dependiendo del género y la especie, que crece a partir del rizoma, siendo un tallo rastrero que se desarrolla paralelamente y sobre la superficie del sustrato.

Los tallos subterráneos son los cormos y los tubérculos que funcionan como órganos de reserva y proveen agua y otras sustancias.

### **1.2.3 Las hojas**

En las orquídeas también varían mucho en forma, tamaño, grosor o textura, características que pueden indicar el lugar o el ambiente de procedencia de las plantas. Si las condiciones climáticas son secas, las hojas son de consistencia carnosa o suculenta y actúan como estructura de reserva para sobrevivir los periodos largos de sequía.

Para soportar largos períodos de insolación, las hojas, por lo general, son duras y alargadas y no presentan pseudobulbos. Si el ambiente es mayormente sombreado, las hojas cuentan con una gran superficie que les permite captar la luz, mientras que en ambientes siempre húmedos las plantas no necesitan almacenar agua por

---

---

lo que las hojas son delgadas. La forma de las hojas va desde oval, casi redonda, hasta un perfil con forma de lanza (lanceolada) o casi lineal.

Aunque la mayor parte de las hojas son planas también hay cilíndricas. Las hojas en general son de color verde, más o menos obscuro, brillante o mate. Algunas presentan una malla de color bronce y abajo de ella un color obscuro u olivo; las hay con las hojas manchadas, aunque lo más frecuente es que la superficie de las hojas sean lisas, también pueden ser pubescentes, es decir con pelos pequeños.

La mayoría de las orquídeas presentan hojas que nunca se caen (perennes) mientras que otras las presentan caducas, es decir, que se caen al llegar al periodo de reposo, como en el caso de algunas orquídeas terrestres.

#### **1.2.4 Las flores**

Pueden presentarse solitarias aunque en la mayoría de las orquídeas, se agrupan en conjuntos de flores llamadas inflorescencias.

Las flores son hermafroditas, es decir, en la misma flor se presentan los dos sexos, pero pueden existir también, en menor cantidad, flores unisexuales que son las que tiene órganos masculinos o femeninos, pero no ambos, esto es, con sexos separados, como en el caso de los géneros *Catasetum*, *Mormodes* y *Cycnoches* (Suárez y Mora, 2007). La flor presenta una simetría bilateral ya que al cortarla a la mitad quedan dos partes iguales. El tamaño de las flores varía, ya que pueden ser desde 3 mm hasta 25 cm de diámetro.

En las flores se distinguen tres partes, que son, de fuera hacia adentro, tres sépalos (uno dorsal y dos laterales), a continuación, hacia el centro, tres pétalos (dos laterales y el labelo). El labelo es diferente a los laterales ya que es de diferente tamaño, forma y color. Esto es para que los polinizadores lo perciban y se acerquen a las flores.

Entre los sépalos y pétalos (laterales) en muchas de las especies no existe una gran diferencia ya que pueden presentar los mismos colores y formas.

---

---

El aparato reproductor femenino (pistilo) y el aparato reproductor masculino (antera) están fusionados formando una estructura llamada columna ubicada en el centro de la flor. En la parte superior de la columna se encuentra la antera, debajo de ésta se encuentra la parte receptora femenina (estigma), separada de la parte masculina por un tejido llamado rostelo que es una forma de barrera, cuya función es evitar la autopolinización.

Dentro de la flor los granos de polen se aglutinan en pequeños paquetes llamados polinios cuyo número depende del género. En la base del polinio existe una estructura llamada viscidio, que es una base cubierta de mucílago (sustancia pegajosa) y que cumple la función de adherirse a los agentes polinizadores. Los polinizadores llevarán los polinarios (que son estructuras formadas por los polinios unidos al viscidio por un estípito) de una orquídea a otra, favoreciendo la polinización entre las flores o entre las plantas.

El ovario está ubicado abajo de los sépalos y pétalos. A menudo experimenta una torsión que orienta a la flor hacia arriba (resupinación). Colocando así al labelo arriba o abajo con lo que funciona como una plataforma o atracción para los polinizadores.

Las flores poseen una gran diversidad de colores y a veces combinaciones de dos o tres tonalidades en una misma flor.

### **1.2.5 El fruto**

Es el órgano que se forma en la parte inferior de la flor. Después de la polinización y fecundación de los óvulos, el ovario inicia su crecimiento en grosor y longitud hasta quedar convertido en un fruto, también llamado cápsula, dehiscente, lo que significa que en la maduración (cuando su color cambia de verde a amarillo) se abre por sus costillas y a través de dicha abertura libera las semillas. Sus formas también son muy variadas, según las especies. La maduración depende de la especie (entre cuatro y 12 meses). En el caso de la vainilla el fruto es una vaina carnososa.

---

---

Las orquídeas producen grandes cantidades (de 1 000 a aproximadamente 4 000 000) de semillas diminutas (Arditti, 1992). El tamaño de la semilla es de entre 0.25 a 1.2mm de largo por 0.09 a 0.027mm de ancho, por lo que son las plantas que cuentan con las semillas más pequeñas del reino vegetal.

Las semillas, a diferencia de otras plantas, sólo están formadas por el embrión, ubicado en el centro, y por una membrana que lo protege; por eso se les llama semillas desnudas ya que la mayor parte es aire, razón por la que se pueden dispersar o mover fácilmente por el viento o el agua.

Cuando una semilla cae al suelo o tronco, empieza a crecer y produce una nueva planta, entonces se dice que ha germinado. Para lograr la germinación debe existir un hongo, que generalmente se encuentra entre hojas secas o musgos, en las ramas de los árboles o en las raíces de las orquídeas que anteriormente se encontraban en el árbol.

Las hifas del hongo son filamentos que le dan al embrión de la semilla, agua y nutrimentos minerales que se transforman en azúcares y otros componentes que servirán al embrión y al hongo; de esta manera ambos obtienen beneficios. Se ha observado que en plantas adultas continua la mencionada relación simbiótica (Téllez y Flores, 2008).

### **1.3 Reproducción**

Las orquídeas poseen estrategias para propagarse y poder conservar la especie, las dos formas de propagación que presentan son la propagación asexual y la propagación sexual.

#### **1.3.1 Propagación asexual**

Es aquella que se obtiene por secciones de la planta madre; esto es plantas genéticamente iguales a la que proceden. En este tipo de propagación no hay intercambio de gametos, las plantas nuevas generadas son genéticamente idénticas a la planta madre y se generan a partir de sus partes, en el caso de las

---

---

orquídeas pueden dividirse por separación de pseudobulbos o rizomas, keikis, cortes de tallo y cultivo de tejidos.

### **1.3.2 Propagación sexual**

La propagación sexual de las orquídeas es la producción de nuevas plantas a partir de sus semillas. Este tipo de multiplicación implica un entrecruzamiento genético, ya que es necesaria la participación de los gametos femeninos y masculinos (óvulos y granos de polen).

Las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas polvo debido a que son muy pequeñas y contienen pocas reservas nutritivas.

Usualmente estas semillas germinan en el medio natural si son infectadas por un hongo en asociación o micorriza, en la cual el hongo abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que son lo suficientemente grandes y con capacidad fotosintética para fabricar su propio alimento.

## **1.4 Condiciones de hábitat natural**

La familia Orchidaceae se considera cosmopolita, ya que tiene representantes por todo el mundo, con excepción de las regiones polares y los desiertos extremos; sin embargo, son más abundantes en las regiones tropicales y subtropicales, aproximadamente a los 20 grados de latitud norte y sur del ecuador.

En lo referente a la altitud, las orquídeas se pueden encontrar desde los 0 msnm hasta los 4 000 msnm. A nivel mundial, los países que cuentan con mayor número de especies de orquídeas son Nueva Guinea, Colombia, Brasil, Borneo y Java.

México es también un país con gran cantidad de orquídeas silvestres, distribuidas en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, regiones al sur de Puebla y San Luis Potosí y en Michoacán. Pueden crecer en zonas áridas (donde hay cactáceas), bosques húmedos (selvas) y bosques con neblina, y tanto

---

---

en climas tropicales y subtropicales como templados. Dependiendo del lugar en donde crecen las orquídeas, se conocen tres tipos, que son:

#### **1.4.1 Orquídeas epífitas**

Son plantas que 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 sólo crecen sobre el tronco o la rama del árbol que las soporta. Las orquídeas obtienen su alimento del aire, el agua de lluvia y de los desechos de la corteza de los árboles. Atwood (1986) señala que 73% de las orquídeas son epífitas.

El ecosistema que cuenta con la mayor cantidad y variedad de orquídeas es la selva alta perennifolia, también conocida como selva tropical o bosque tropical lluvioso. Un gran número de orquídeas se desarrollan en ecosistemas cálidos pero más secos, templados e, inclusive, en climas más rigurosos; así, es posible encontrar orquídeas en bosques de pino o de árboles de hoja ancha como el encino.

#### **1.4.2 Orquídeas terrestres**

Crece a nivel del suelo, de donde toman parte de los nutrientes que necesitan los cuales también obtienen del agua y del aire. Su hábitat son praderas y pastizales e incluso pueden crecer en matorrales.

#### **1.4.3 Orquídeas litófilas o rupícolas**

Crece sobre las rocas que les dan el soporte para su desarrollo, representa un estado intermedio entre una planta terrestre y una epífita.

#### **1.4.4 Orquídeas subterráneas**

Algunas especies que carecen de hojas se alimentan de materia orgánica en descomposición depositada en el suelo de bosques de hoja ancha, y su única manifestación visible de vida es durante la época de floración ya que el resto del año son completamente subterráneas.

---

---

## 1.5 Crecimiento

Las plantas crecen a lo alto y ancho en longitud y grosor, lo que se denomina crecimiento vegetativo. En las orquídeas hay dos tipos: el monopodial y el simpodial.

El crecimiento monopodial se refiere a un crecimiento vertical; esto es, que crece de manera recta hacia arriba con un único tallo que no se ramifica y sale de entre las hojas, tampoco presenta pseudobulbos que son los tallos engrosados característicos de las orquídeas y generalmente tiene hojas gruesas.

El crecimiento simpodial significa un crecimiento horizontal o de apariencia horizontal. De un rizoma –tallo que crece paralelo al suelo–, van surgiendo los tallos o pseudobulbos que dan origen a nuevas plantas.

Hay otro tipo de crecimiento llamado trepador, que se da en la vainilla (*Vanilla*) en la que la planta crece hacia arriba pero necesita sostenerse del tronco de un árbol, por lo que forma raíces que salen del tallo (raíces adventicias).

## 1.6 Género *Cattleya*

*Cattleya* es un género de entre 50 y 75 especies de orquídeas epífitas. La mayoría de América Central y Suramérica (Panamá, Brasil, Venezuela, Colombia, Bolivia, Perú y Ecuador). *Cattleya skinneri*, es la flor nacional de Costa Rica, conocida localmente como Guaria Morada; *Cattleya trianae* de Colombia, *Cattleya mossiae* de Venezuela (Muñoz Rojas, 2015).

Las *Cattleyas* son las plantas de orquídeas más cultivadas y frecuentemente su cultivo se usa como base de comparación con otros tipos de orquídeas. Son epífitas y tienen pseudobulbos.

Poseen hojas foliares dísticas, que forman una planta péndula con formas de volantes e inflorescencias auxiliares uniflorales en las que la flor está boca arriba con un apéndice truncado hacia el labelo el que posee una apícula (Muñoz Rojas, 2015).

---

---

El género *Cattleya* se dividen en dos grupos:

- *Cattleyas* labiadas o unifoliadas: Por lo general se encuentran en Sudamérica, sus flores son grandes y de pétalos anchos, tiene una hoja que sale del ápice del pseudobulbo.

Producen dos o tres flores, que duran de 1 a 4 semanas. Florece dos veces al año. Estas *Cattleyas* son muy populares por sus flores grandes y entre las especies más conocidas están *Cattleya maxima*, *Cattleya dowiana*, *Cattleya trianae*, *Cattleya mossiae*, etc.

- *Cattleyas* bifoliadas: Son de Centroamérica, tienen flores pequeñas (en racimos de 20 o más flores) de más intenso y variado color que las unifoliadas.

Se distribuyen desde Guatemala pasando por Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Se encuentran en bosques de montaña de niebla y humedad en alturas de 1000 a 1500 metros (Muñoz Rojas, 2015).

### **1.6.1 *Cattleya trianae***

*Cattleya trianae* pertenece a la familia de las orquídeas, es una planta epífita de hojas carnosas, originaria principalmente de Colombia, aunque su distribución llega hasta Ecuador. Esta especie está en peligro de extinción por destrucción de su hábitat, por lo cual una gran cantidad de instituciones están tratando de multiplicarla.

#### **1.6.1.1 Generalidades**

*Cattleya trianae* o flor de mayo es una planta epífita o litófita que se encuentra actualmente en Peligro de Extinción (EN). Presenta pseudobulbos robustos y flores con el labelo rizado. El túnel del labelo es blanco y amarillo, y la mitad externa de este es rosa púrpura.

Florece entre diciembre y febrero, aunque pueden darse otras floraciones, no tan prolíficas, en mayo, agosto y octubre. Es una especie exclusiva de Colombia, siendo la flor nacional. Se distribuye en la ecorregión del Alto Magdalena, a una altitud de

---

---

1.000 a 1.800 m s.n.m., en los departamentos de Cundinamarca, Tolima y Huila en Colombia (Constantino et al. 2001).

#### **1.6.1.2 Ubicación**

Se encuentran en selvas secas y de transición hacia lo húmedo-nublado, en las laderas y cañones ubicados en vertientes de la cuenca de ríos. Crece epífita o litófito, generalmente sobre árboles grandes de caracolí (*Anacardium excelsum*), nogal (*Cordia alliodora*), hobo (*Spondias mombin*), ceiba (*Ceiba pentandra*) y roble morado (*Tabebuia rosea*).

En zonas más altas crecen sobre el roble (*Quercus humboldtii*) y algunos arbustos leñosos de ericáceas o lianas. Algunas plantas pequeñas a medianas crecen sobre cafetos (*Coffea arabica*). En algunas zonas crece litófito sobre grandes rocas graníticas (Constantino, 2001).

#### **1.6.1.3 Propagación tradicional**

*C. trianae* posee pseudobulbos. Por lo tanto, la forma de división o propagación más sencilla es separando una planta adulta y sembrando cada parte en materas individuales. Es necesario dejar al menos tres pseudobulbos, con las yemas de crecimiento y con la precaución de no lastimar los rebrotes.

Para conocer si el material vegetal se encuentra en buenas condiciones para su división, se deben observar las estructuras vegetales. Para el caso de las raíces, estas deben presentar una coloración blanca, y ser turgentes y con vigor. Esta especie prefiere los climas templados con temperaturas promedio de 26 °C en el día y de 18°C, en la noche, así como condiciones de humedad muy altas, en un rango que puede variar entre 60% y 80% de humedad relativa.

#### **1.6.1.4 Propagación in vitro**

Los métodos de cultivo in vitro están siendo utilizados con éxito para desarrollar y establecer diferentes protocolos para la micropropagación, y obtención de plántulas

---

---

de diferentes especies de orquídeas, especialmente de las que se encuentran en peligro de extinción.

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

A partir de este momento muchas orquídeas, incluyendo a *Cattleya trianae*, se han regenerado y propagado a partir de segmentos de hoja, segmentos nodales de plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro*, nudos florales, ápices, rizomas y microsecciones apicales (Pinzon, 2016).

## **2. Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales**

El conocimiento sobre la totipotencialidad de las células vegetales permite generar plantas completas a partir de una sola célula vegetal no sexual, mediante el cultivo *in vitro* de tejidos (Cardoza, 2008).

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado (Olmos, 2010). El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados.

Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban.

---

---

Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática. (Olmos, 2010)

Según menciona Pech-Chable (2017), entre las ventajas que tiene el cultivo in vitro de células y tejidos vegetales para la producción de plantas y productos naturales de interés están:

1. La producción de plantas sanas, lo que permite incrementar los rendimientos.
2. La independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos.
3. La capacidad de establecer un sistema de producción definido, en relación a las demandas del mercado.
4. El cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar en campo.
5. La conservación del germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción.
6. La posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético más rápidos por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética.
7. La producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimientos lentos o difíciles de obtener por extracción o por síntesis química.
8. La síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos in vitro.
9. La obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con la síntesis química.
10. La producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, a herbicidas o a estrés abiótico, con mejor calidad nutricional, que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos o que secuestren metales pesados de suelos contaminados, entre otras.

---

---

### 3. Semillas sintéticas

De manera natural, las semillas poseen una reserva alimenticia llamada endospermo, la cual proporciona carbohidratos y nutrientes que favorecen la germinación, sin embargo, algunas plantas cuentan con poco o casi inexistente endospermo, por lo cual tienen largos periodos de germinación, y sus semillas son muy pequeñas o necesitan asociarse con hongos para su alimentación, como las orquídeas; debido a esto, entre los productores y los investigadores ha surgido la necesidad de encontrar sistemas de multiplicación de plantas capaces de llevar a cabo las funciones de una semilla para apoyar su desarrollo, y se ha encontrado que la semilla sintética es una solución para este problema.

El término semilla sintética describe, generalmente, a un embrión somático, encapsulado con una cubierta que lo protege del ambiente, aunque también se puede encapsular otros tipos de explantes, y su propagación puede ser con fines comerciales o de conservación (Nieves, 2003).

Es una imitación de una semilla vegetal natural, está formada por un aislado de tejido meristemático totipotente con potencial para diferenciarse y producir una planta completa; este tejido puede estar deshidratado o no, y está recubierto por un agente gelificante, capaz de formar una matriz o cápsula de gel hidratado, dicha matriz puede contener materiales bioactivos.

Durante la propagación vegetativa de plantas, es decir, una multiplicación a partir de tejidos vegetales como bulbos, segmentos de tallo, etc., la semilla sintética puede permitir la siembra directa de variedades de plantas, así como proveer de un medio para su mantenimiento; de esta manera, la semilla sintética puede convertirse en una tecnología que posibilite el escalamiento extensivo requerido para la producción comercial de especies de interés, incluso, con altos porcentajes de germinación (Nieves, 2003).

Las semillas artificiales han sido producidas por dos métodos: fabricando un sistema hidratado o utilizando un sistema de desecación de embriones.

---

---

Entre las sustancias bioactivas que pueden ser incluidas en el gel de la cápsula se encuentran todo tipo de nutrientes minerales y orgánicos, productos fitosanitarios (fungicidas, bactericidas) y reguladores de crecimiento, con los que se crea un cuasi-medio-de-cultivo en el interior de la semilla artificial.

Para la encapsulación, se emplean diversos agentes gelificantes, como son el alginato de sodio, el alginato de potasio, la carragenina, el alginato de sodio con gelatina, entre otros. Sin embargo, el más empleado es el alginato de sodio (Ara et al., 2000)

### **3.1 Encapsulación**

La cubierta que rodea a la semilla sintética no sólo debe protegerla de cualquier daño físico que pudiera sufrir, sino que además debe permitir el paso de los nutrientes necesarios para su desarrollo. En algunos casos, esta matriz puede contener nutrimentos y/u otros compuestos que coadyuven no sólo a su bienestar, sino a su germinación.

Para la encapsulación, se emplean diversos agentes gelificantes, como son el alginato de sodio, el alginato de potasio, la carragenina, el alginato de sodio con gelatina, entre otros. Sin embargo, el alginato de sodio es el compuesto más utilizado para estos fines, dado que permite la formación de una estructura tridimensional que permite el libre intercambio de agua y nutrimentos, y además, es susceptible de albergar sustancias necesarias para la posterior germinación de la semilla.

#### **3.1.1 Alginato**

Al alginato como un polisacárido de origen natural, se le han dado muchas aplicaciones, por ejemplo, en la industria culinaria, se usa ampliamente como un emulsificador y un estabilizador en los sustitutos de productos bajos en grasa por su inherente propiedad de interaccionar con las proteínas, grasas o fibras.

---

Este biopolímero también se utiliza como agente gelificante en productos alimenticios, como mezclas de alginato-pectina, independientemente del contenido de azúcar, para producir productos bajos en calorías (Augst et al., 2006).

Por otro lado, debido a su baja toxicidad, también se emplea en las industrias de bioingeniería, farmacéutica (como excipiente de drogas y material de impresión dental) y biomedicina, en esta última se utiliza como material de apósitos para heridas agudas o crónicas (Faried et al., 2016).

Entre las propiedades físicas destacables del alginato está su amplia solubilidad en agua, la cual está limitada por tres parámetros: pH del disolvente, fuerza iónica del medio y la presencia de iones gelificantes en el disolvente. Para que los alginatos sean solubles, es esencial que la solución alcance un valor de pH tal que permita que los grupos carboxílicos se desprotonen. El alginato se hidroliza en condiciones ácidas (Lee y Mooney, 2012).

### 3.1.1.1 Estructura del alginato

El ácido algínico y sus sales son biopolímeros polielectrolitos. Está formado por dos tipos de unidades monoméricas (McHugh, 1987): el ácido  $\beta$ -D-manurónico y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (Figura 6).



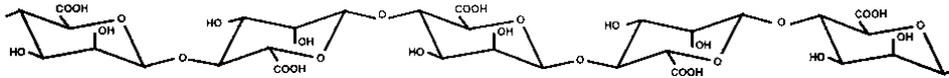
Figura 6. Monómeros del ácido algínico

Típicamente, el ácido algínico está conformado como copolímero en bloques, con secciones de unidades manurónicas alternadas con secciones de unidades gulurónicas (Figura 7). La estructura de un ácido algínico en particular depende de qué especie de alga se utilice como materia prima.

---

---

## Bloque M



## Bloque G

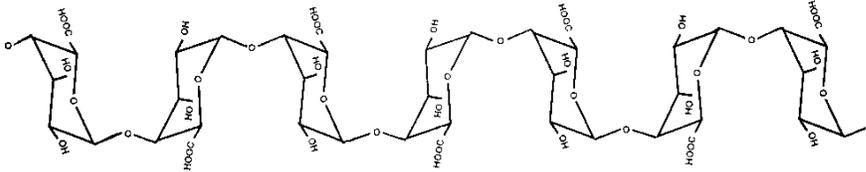


Figura 7. Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G)

Este polímero debe su carácter polianiónico a los grupos carboxilo que aparecen a lo largo de la cadena. La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos (Lupo et al., 2012).

Éstos se agrupan en o se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo bloques G (-GGG-), bloques M (-MMM-) o heteropolímeros en los que los bloques M y G se alternan (-MGMG-). Tanto la distribución de los monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos, confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido de gulurónico. Si en la estructura polimérica hay mayor cantidad de bloques G, generalmente el gel es duro y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de bloques M, el gel formado se presenta suave y elástico.

### 3.1.1.2 Solubilidad

El alginato, en forma de sal sódica, potásica o magnésica, es soluble en soluciones acuosas a pH mayores de 3.5. Las sales de cationes monovalentes [Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] del ácido algínico y su éster de propilenglicol son solubles en agua. Por el contrario, el ácido algínico y sus sales con cationes polivalentes como el calcio son insolubles en agua. El alginato también es soluble en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles con ella pero es insoluble en leche, por la presencia de calcio.

---

---

La solubilidad del alginato es influida por factores físicos y por factores químicos, los cuales se detallan a continuación.

**Factores físicos:** La solubilización de los compuestos de alginato se ve afectada tanto por el tamaño como por la forma de las partículas. Usualmente se prefiere un material de partículas gruesas que resultan más fáciles de dispersar y suspender, aunque tienen una baja velocidad de hidratación. Las partículas finas se disolverán más rápidamente, pero existe mayor riesgo de que se aglomeren; éste efecto puede disminuirse mezclando el alginato con otro polvo, por ejemplo azúcar. Al incrementarse la concentración de alginato, la solución pasa de un estado de líquido viscoso a una pasta espesa, punto en el cual se vuelve muy difícil de dispersar el alginato remanente.

**Factores químicos:** La solubilización de estos productos en agua resulta difícil si se realiza en presencia de compuestos que compiten con las moléculas de alginato por el agua necesaria para su hidratación. Así, la presencia de azúcares, almidón o proteínas en el agua reducirá la proporción de hidratación y se requerirán mayores tiempos de mezcla. Las sales de cationes monovalentes (como el NaCl) tienen un efecto similar en concentraciones cercanas al 0.5%. Por lo tanto es recomendable agregar todas estas sustancias después de que el alginato fue hidratado y disuelto.

La presencia de pequeñas cantidades de cationes polivalentes inhibe la hidratación de los alginatos y proporciones elevadas de los mismos causan su precipitación. El alginato sódico resulta de difícil disolución en aguas duras y leche debido a que ambas contienen iones calcio; éstos deben ser primero secuestrados con un agente complejante tal como hexametáfosfato de sodio o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Los alginatos en general son insolubles en solventes miscibles con el agua como alcoholes y cetonas. Las soluciones acuosas (1%) de la mayoría de los alginatos toleran la adición de 10 a 20% de tales solventes; pero proporciones mayores impiden una correcta hidratación de las moléculas.

### 3.1.1.3 Formación de gel de alginato por entrecruzamiento

Entrecruzamiento es el proceso de unirse químicamente dos o más moléculas, generalmente polímeros, por enlaces covalentes o iónicos.

Cuando dos cadenas de bloque G de alginato se alinean, se forma sitios de coordinación debido a la forma de bucles de estas cadenas. Las cavidades que se forman entre ellas tienen el tamaño adecuado para acomodar un catión como por ejemplo al ión calcio. Además, los grupos carboxílicos y otros átomos de oxígeno electronegativos son ligandos favorables y permiten un alto grado de coordinación con los iones calcio. Este modelo es llamado el modelo de la caja de huevos, como se observa en la figura 8.

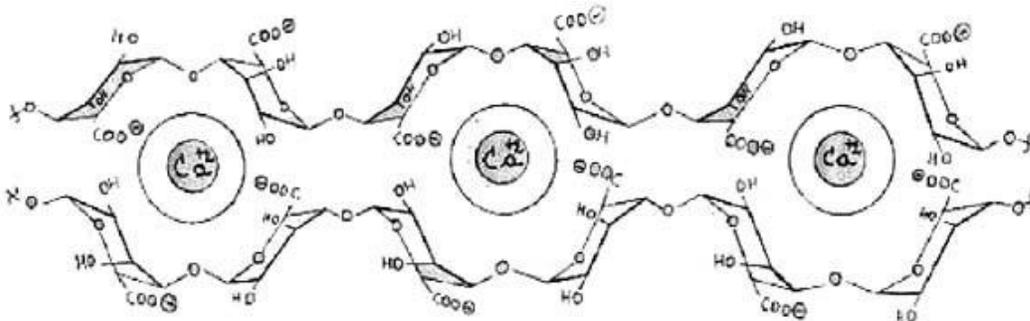


Figura 8. Estructura del gel de alginato de calcio

Es posible emplear cationes polivalentes como agentes entrecruzantes para solidificar soluciones de alginato de sodio y formar geles mecánicamente estables. El catión más empleado es el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), pero también se emplean  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ , entre otros. Al suministrar dichos cationes, éstos comienzan a reemplazar al sodio en los extremos carboxílicos del alginato. Por su valencia múltiple, estos cationes actúan atrayendo electrostáticamente los extremos aniónicos de dos cadenas adyacentes de alginato.

---

---

## DESARROLLO

### Preparación de medio de cultivo para *Cattleya trianae*

*Cattleya trianae* crece en un medio MS (Murashiage y Skoog, 1962) normal, sin reguladores, añadiendo carbón activado al medio y sacarosa al 50% del medio original, a un pH de 5.7.

El medio fue preparado y llevado a la autoclave para su esterilización. Posteriormente fue vaciado en recipientes de plástico (con tapa) previamente esterilizados en UV y desinfectados con cloro comercial.

### Selección de plántulas de *Cattleya trianae*

Las plántulas fueron seleccionadas a partir del material vegetal existente en el laboratorio de cultivos vegetales que se encuentra en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, donde existen muestras de diferentes especies de orquídeas, dentro de las cuales está *Cattleya trianae*.

Se eligieron plántulas de entre 0.5 y 1cm de longitud, como se observa en la Figura 9, con el fin de que sus dimensiones no afectaran su encapsulación en el alginato de sodio. Estas fueron separadas de las demás y sembradas en un nuevo recipiente con medio de cultivo, a la espera de ser encapsuladas.

Todo se llevó a cabo en ambiente estéril en campana de flujo laminar.



Figura 9. Tamaño de plántulas seleccionadas.

---

---

## **Elaboración de perlas de alginato de sodio**

Para la elaboración de las perlas de alginato de sodio, las concentraciones seleccionadas fueron: Alginato de sodio al 4% y Cloruro de calcio 0.1M.

Se prepararon ambas soluciones en ambiente estéril. Una plántula de *Cattleya trianae* fue colocada dentro de cada porción (2.5mL) de alginato de sodio destinado para una perla. Cuando la plántula estaba introducida por completo en el alginato, se sumergía en la solución de Cloruro de Calcio para su encapsulación.

Las perlas formadas se dejaron dentro de la solución de Cloruro de Calcio 0.1M durante una hora para su completa formación. Posteriormente se sacaron y se procedió a su introducción en frascos estériles destinados a contenerlas durante el tiempo de almacenamiento.

## **Liofilización de perlas de alginato de sodio**

La mitad de las perlas formadas fueron congeladas en nitrógeno líquido por 2 minutos y liofilizadas a 0.2 mbar y -40°C durante 48 horas. Posteriormente fueron guardadas en bolsas herméticas para su almacenamiento y monitoreo.

## **Rehidratación de perlas de alginato de sodio liofilizadas**

Para la rehidratación de las perlas liofilizadas, después de quince días, ocho de estas se introdujeron en un recipiente con medio líquido estéril y se dejaron en él para su observación y monitoreo.

## **Elaboración de perlas de alginato de sodio con medio de cultivo**

Estas perlas fueron preparadas de forma similar a las primeras, la diferencia consistió en cambiar el agua estéril para la preparación del alginato de sodio al 4% por medio líquido MS (Murashiage y Skoog, 1962) que es utilizado como medio de cultivo para *Cattleya trianae*. Para la preparación del Cloruro de calcio 0.1M se

---

---

utilizó agua destilada estéril. Una vez encapsuladas, fueron introducidas en frascos estériles para su almacenamiento.

### **Almacenamiento de perlas de alginato de sodio**

La mitad de los frascos estériles que contenían las perlas de alginato de sodio (con medio MS y sin medio) fueron almacenados a temperatura ambiente y los demás a 4°C. De las perlas liofilizadas y guardadas en bolsas herméticas, la mitad fueron almacenadas a temperatura ambiente mientras que las restantes se almacenaron a 4°C dentro de un refrigerador comercial.

---

---

## RESULTADOS

### Plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS

Las plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS (Murashiage y Skoog, 1962) fueron separadas y almacenadas a 4°C y temperatura ambiente, su monitoreo se realizó en dos tiempos, a los 30 y 60 días después de su encapsulación:

#### Almacenadas a 4°C

En el tiempo 0 corresponde al día que se realizó la encapsulación de las plántulas en las perlas de alginato de sodio. Aquí las plántulas se observaban verdes y las perlas sólo ligeramente oscuras debido al carbón activado añadido al medio MS.

Para el tiempo 1 treinta días después de la encapsulación las plántulas seguían observándose verdes y las perlas tenían una apariencia similar al mes anterior. Ninguna plántula había perforado la perla o mostrado signos de crecimiento.

Finalmente en el tiempo 2 las plántulas aún conservaban su coloración verde, aunque las perlas se encontraban ligeramente más oscuras en comparación con el tiempo 0. Ninguna plántula mostró signos de crecimiento ni perforó la perla. No se observó oscurecimiento o muerte de la plántula, ni cualquier tipo de contaminación en ningún tiempo.

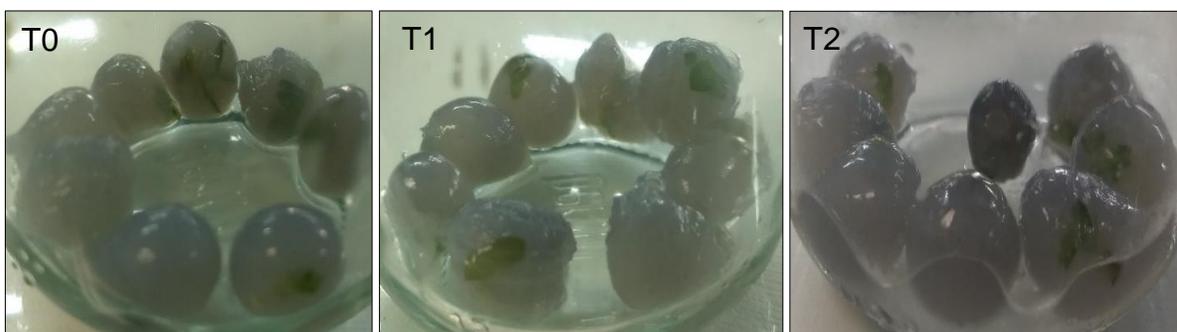


Figura 10. Plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS almacenadas a 4°C. **T0**. Tiempo 0. **T1**. Tiempo 1, después de treinta días. **T2**. Tiempo 2, luego de sesenta días de ser encapsuladas.

---

---

### Almacenadas a temperatura ambiente

El tiempo 0 corresponde al día que se realizó la encapsulación de las plántulas en las perlas de alginato de sodio. Aquí las plántulas se observaban verdes y las perlas sólo ligeramente oscuras debido al carbón activado añadido al medio MS.

Para el tiempo 1 treinta días después de haber sido encapsuladas, las perlas de alginato de sodio mostraban signos de contaminación por hongos, sin embargo las plántulas aún conservaban su tono verde. Ninguna rompió la perla ni mostró signos de crecimiento.

En el tiempo 2, sesenta días después de haber sido encapsuladas, las plántulas mostraban coloraciones más oscuras y el tono verde original ya no lo portaban en su totalidad. Ninguna rompió la perla ni mostró signos de crecimiento. Además la contaminación por hongos era más evidente: invadía a todas las perlas en el exterior de las mismas de forma significativa.



Figura 11. Plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS almacenadas a temperatura ambiente. **T0**: Tiempo 0. **T1**: Tiempo 1, después de treinta días. **T2**: Tiempo 2, luego de sesenta días de ser encapsuladas.

---

## Plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS

Las plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS (Murashiage y Skoog, 1962) fueron separadas y almacenadas a 4°C y temperatura ambiente, su monitoreo se realizó en tres tiempos, a los 30, 60 y 75 días después de su encapsulación:

### Almacenadas a 4°C

El tiempo 0 corresponde al día que las plántulas fueron encapsuladas. Las perlas se observaban claras y transparentes, mientras que el tono verde de las plántulas estaba intacto. Esta situación no varió a lo largo de los tres tiempos, dado que las plántulas conservaron su coloración, no se presentó ninguna clase de contaminación y las perlas no perdieron su transparencia. No se apreció crecimiento visible de las plántulas, por tanto las perlas mantuvieron su integridad al no haber rompimiento por crecimiento de las plántulas.

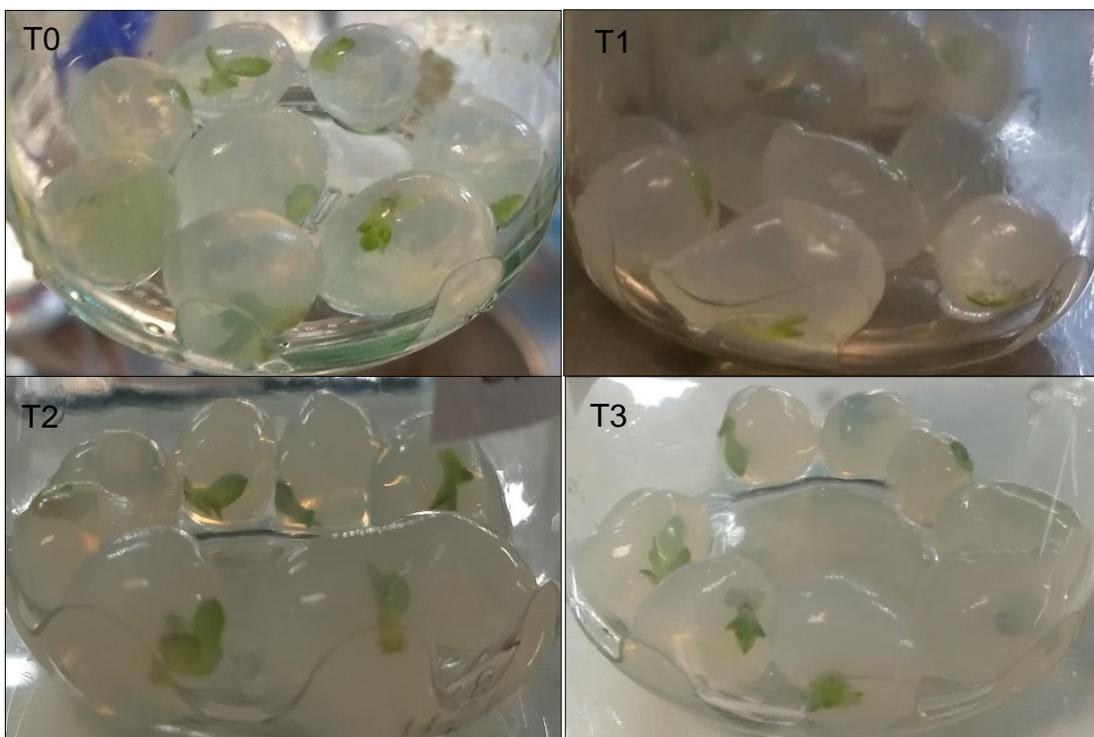


Figura 12. Plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS almacenadas a 4°C. **T0**: Tiempo 0. **T1**: Tiempo 1, después de treinta días. **T2**: Tiempo 2, luego de sesenta días de ser encapsuladas. **T3**: Tiempo 3, setenta y cinco días posteriores a la encapsulación.

---

---

### **Almacenadas a temperatura ambiente**

El tiempo 0 corresponde al día que las plántulas fueron encapsuladas. Las perlas se observaban claras y transparentes, mientras que el tono verde de las plántulas estaba intacto.

Para el tiempo 1, las plántulas seguían observándose verdes y las perlas tenían una apariencia similar al mes anterior: transparentes, aunque ligeramente más opacas. Sin embargo, ninguna plántula había perforado la perla o mostrado signos de crecimiento. Tampoco se observó contaminación.

Al tiempo 2 las diferencias desarrolladas en las perlas fueron evidentes. Las plántulas empezaron a presentar una coloración ligeramente amarillenta, tornándose café en algunos puntos. Las perlas presentaban menor claridad, observándose más opacas que el tiempo 1, con un tono un poco más oscuro alrededor de las plántulas. Ninguna plántula perforó el encapsulado, tampoco hubo presencia de contaminación visible.

En el tiempo 3 las plántulas se observaban mayormente con una coloración amarilla y café, conservando en pocos puntos el tono verde, mientras que las perlas de alginato de sodio adquirieron una tonalidad amarillenta, opaca y sin brillo, que dificultaba la observación de las plántulas. Ninguna plántula perforó el encapsulado, tampoco hubo presencia de contaminación.

El contraste en la evolución del aspecto de las plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS y almacenadas a temperatura ambiente puede observarse en la Figura 13:

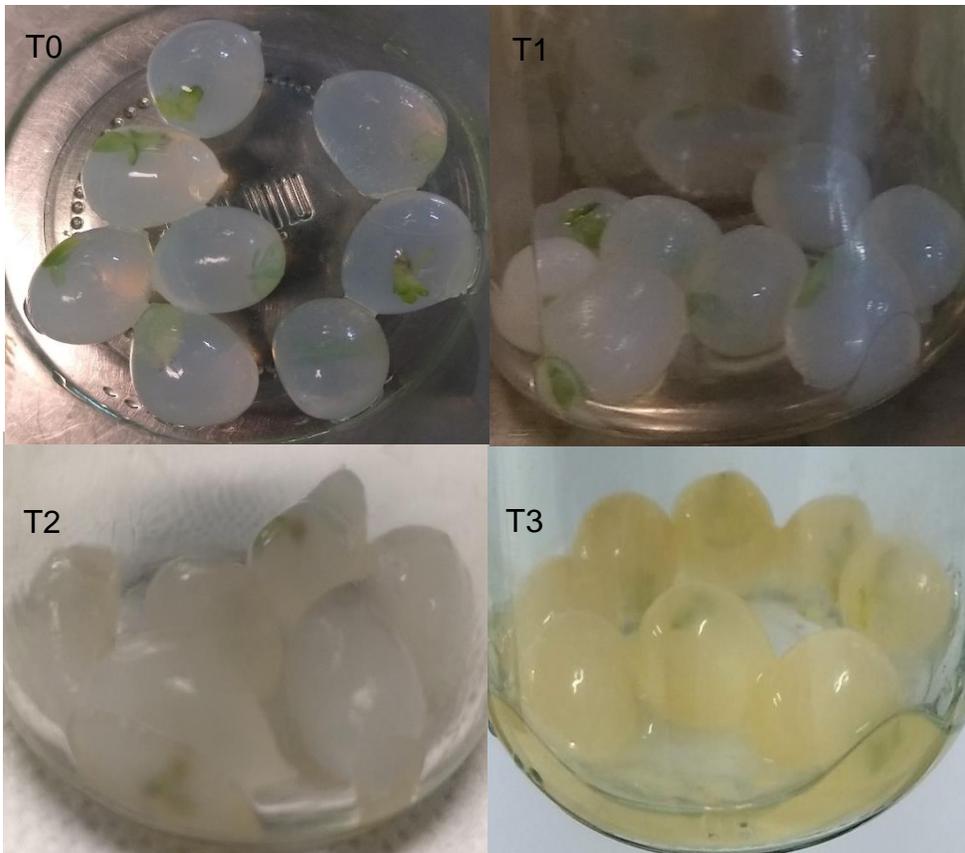


Figura 13. Plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS almacenadas a temperatura ambiente. **T0**: Tiempo 0. **T1**: Tiempo 1, después de treinta días. **T2**: Tiempo 2, luego de sesenta días de ser encapsuladas. **T3**: Tiempo 3, setenta y cinco días posteriores a la encapsulación.

### **Plántulas encapsuladas en perlas de alginato de sodio liofilizadas**

Se tomaron dos muestras de las perlas de alginato de sodio sin medio MS liofilizadas y almacenadas a 4°C y T° ambiente respectivamente para ponerlas a rehidratar en agua destilada estéril dentro de un envase plástico previamente esterilizado, dejándolas reposar a Temperatura ambiente.

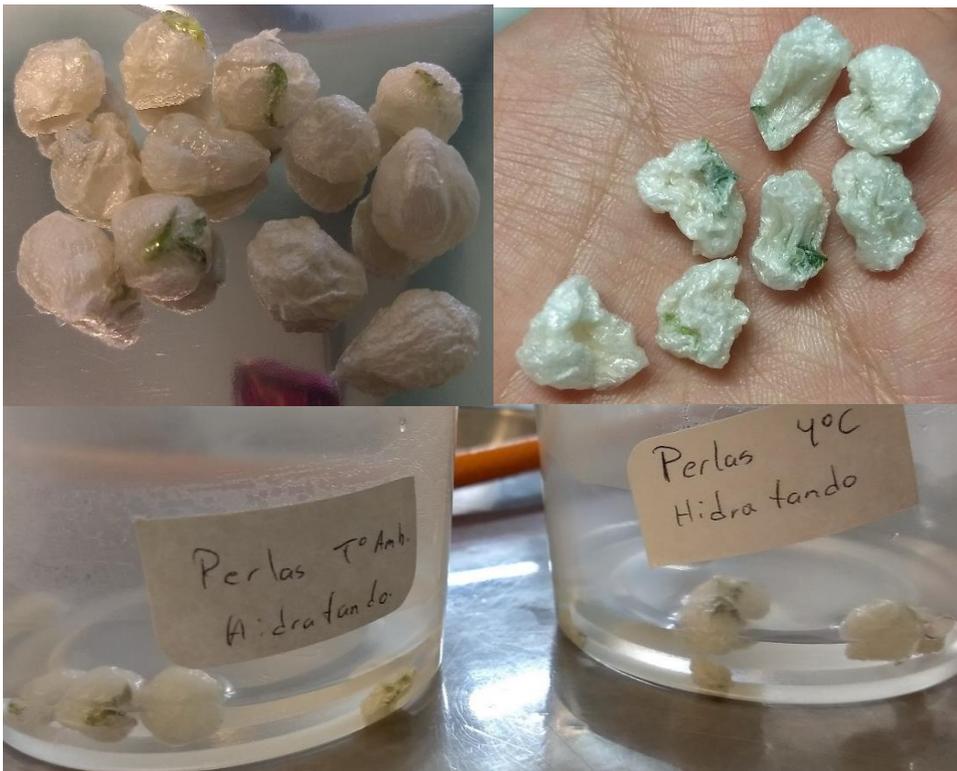


Figura 14. Rehidratación de perlas de alginato de sodio sin medio MS liofilizadas.

Sin embargo luego de cinco días sumergidas las perlas no mostraban signos de una rehidratación completa, por lo que se decidió tomar una nueva muestra e introducir las plántulas encapsuladas en perlas de alginato de sodio liofilizadas en medio líquido MS, con el fin de que las plántulas pudieran emerger de la perla al ser absorbidos los nutrientes del medio. Las perlas se dejaron rehidratando a temperatura ambiente.



Figura 15. Perlas de alginato de sodio liofilizadas rehidratando en medio líquido MS.

No obstante, el medio líquido MS presentó signos de contaminación por hongos. Aunque las perlas continuaron inmersas en el medio, después de un mes estas seguían sin hidratarse, las plántulas nunca lograron emerger de ellas, más bien adquirieron una tonalidad oscura.

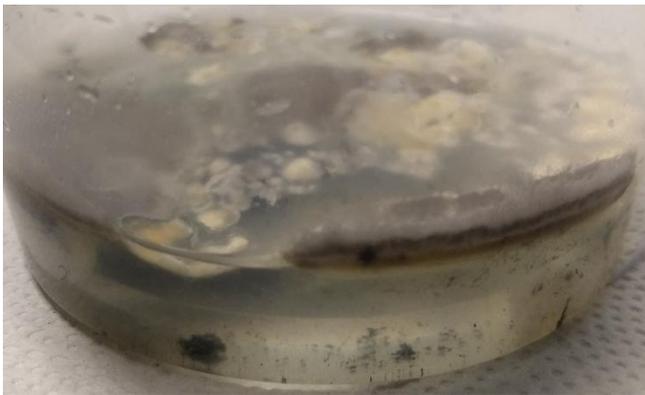


Figura 16. Contaminación de las perlas de alginato de sodio liofilizadas sumergidas en medio líquido MS.

---

---

## Sobrevivencia de plántulas encapsuladas

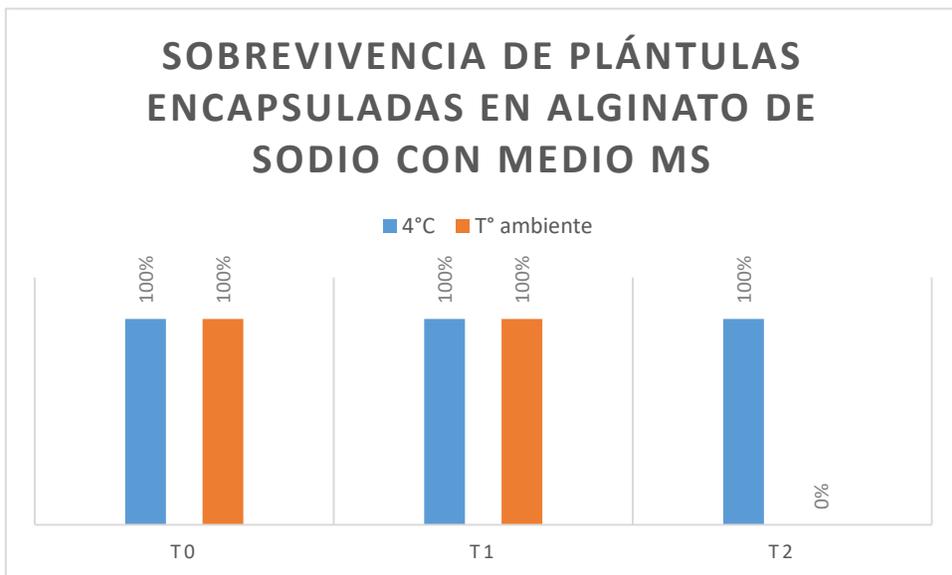
A continuación se puede observar con mayor detalle en los gráficos el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas encapsuladas en los diferentes experimentos.

### Plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS

De estas plántulas encapsuladas, las que fueron almacenadas a 4°C presentaron la mayor tasa de sobrevivencia, pues todas permanecían intactas después del Tiempo 2. Por otra parte, aunque las plántulas almacenadas a temperatura ambiente sobrevivieron al Tiempo 1, al llegar al Tiempo 2 se encontraban oscuras en su totalidad, por lo que se considera una pérdida del 100%.

Tabla 1. Sobrevivencia de plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS

Tiempos	4°C	T° ambiente
T0	100%	100%
T1	100%	100%
T2	100%	0%



Gráfica 1. Sobrevivencia de plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS

---

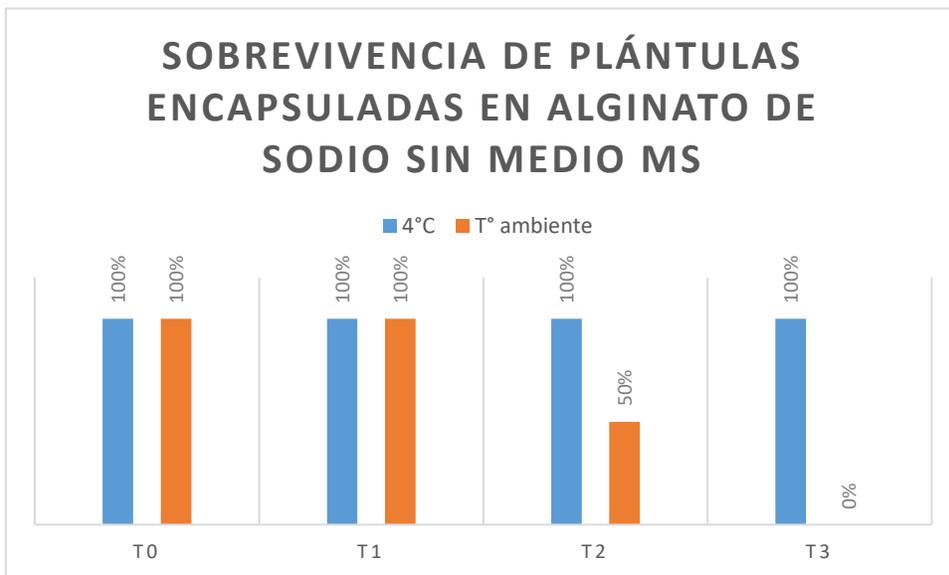
---

## Plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS

En las plántulas almacenadas a 4°C se observa la mayor tasa de sobrevivencia de los experimentos, pues todas las plántulas llegaron visiblemente vivas hasta el Tiempo 3. Esto ocurrió de forma similar en el primer tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, pero a partir del tiempo dos se notó una baja considerable en la sobrevivencia de las plántulas, hasta que finalmente llegó al 0% en el Tiempo 3.

Tabla 2. Sobrevivencia de plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS

Tiempos	4°C	T° ambiente
T0	100%	100%
T1	100%	100%
T2	100%	50%
T3	100%	0%



Gráfica 2. Sobrevivencia de plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS

---

---

## Contaminación de plántulas encapsuladas

A continuación se puede observar con mayor detalle en los gráficos el porcentaje de contaminación de las plántulas encapsuladas en los diferentes experimentos.

### Plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS

Las plántulas encapsuladas y almacenadas a 4°C son las que no presentaron contaminación en ninguno de los tres tiempos, mientras que para las que se almacenaron a temperatura ambiente se observó contaminación por hongos desde el tiempo 1.

Tabla 3. Contaminación de plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS

Tiempos	4°C	T° ambiente
T0	0%	0%
T1	0%	100%
T2	0%	100%

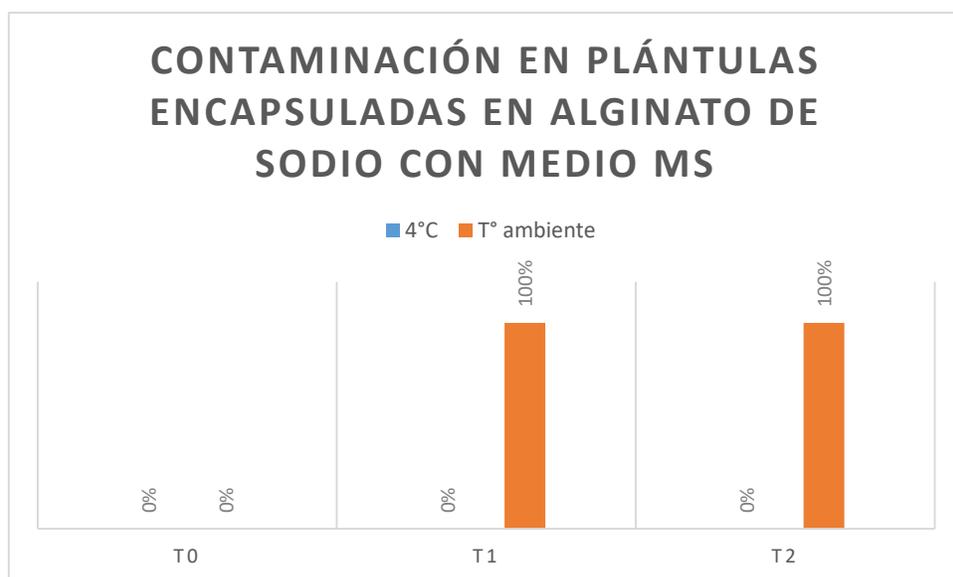


Gráfico 3. Contaminación en plántulas encapsuladas en alginato de sodio con medio MS

---

---

## Plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS

En este caso, tanto las plántulas encapsuladas y almacenadas a 4°C como las almacenadas a temperatura ambiente, se encontraron libres de contaminación, como se observa en los gráficos siguientes:

Tabla 4. Contaminación de plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS

Tiempos	4°C	T° ambiente
T0	0%	0%
T1	0%	0%
T2	0%	0%
T3	0%	0%



Gráfico 4. Contaminación en plántulas encapsuladas en alginato de sodio sin medio MS

---

---

## DISCUSIÓN

El uso de semillas sintéticas se va extendiendo cada vez más en diferentes regiones del mundo, debido a las ventajas que presenta en especies difíciles de cultivar o en peligro de extinción, como las orquídeas.

Las cubiertas que se han probado para este fin han sido muy diversas, como son el Poliox (resina soluble en agua), agar, agarosa, alginato de sodio, alginato de potasio, carboximetilcelulosa, goma guar, Gelrite, carragenina, goma tragacanto, nitrocelulosa y la combinación de alginato de sodio con gelatina, entre otras. Sin embargo, el más empleado es el alginato de sodio por las ventajas que ofrece, como son su baja toxicidad, bajo costo, rápida gelificación, disponibilidad y características de biocompatibilidad (Reddy et al., 2012; Ara et al., 2000).

En este caso se encapsularon plántulas de la orquídea *Cattleya trianae* en alginato de sodio al 4% y 0.1M. Se determinó utilizar estas concentraciones después de realizar diversos ensayos a concentraciones diferentes, los cuales arrojaron las mejores características en perlas de alginato formadas a esta concentración, debido a su claridad y firmeza adecuada que permitía proteger a la plántula en su interior pero sin ser extremadamente dura.

De acuerdo con (Rai et al., 2009), la encapsulación permite proteger a los diferentes explantes producidos mediante el cultivo in vitro de tejidos vegetales, tales como meristemas apicales, meristemas radiculares, segmentos nodales, etc., con cubiertas artificiales que simulan los endospermos de las semillas cigóticas. El endospermo es un tejido existente en las semillas de la mayoría de las plantas. Este endospermo normalmente rodea el embrión y sirve como su almacén de nutrientes durante la germinación y primeras etapas de la vida.

En este caso, la cubierta artificial empleada fue el alginato de sodio. Al fungir como una especie de "endospermo artificial" permite la sobrevivencia de la plántula encapsulada en su interior, actuando como soporte y protección para la misma, posiblemente sirviendo para evitar la pérdida de agua de la plántula, ayudando a

---

---

prolongar su sobrevivencia durante el almacenamiento. Adhikari S (2014) encapsuló brotes de *Cucumis sativus L.* con la intención de proporcionar un "endospermo artificial" que rodeara a los brotes. Menciona que los ingredientes nutritivos que puedan añadirse a las perlas de alginato son de importancia clave tanto para el almacenamiento como para la eficiencia de conversión de los brotes encapsulados al proporcionarles nutrientes. Los brotes encapsulados se almacenaron con éxito en 4°C hasta 8 semanas.

A pesar de que las plántulas encapsuladas que mostraron mejores resultados a nivel de almacenamiento debido a su apariencia fueron las que se encontraban a 4°C, en ninguna plántula se logró observar un crecimiento visible de esta, mucho menos un rompimiento de la cápsula de alginato de sodio, tanto en las encapsuladas con medio MS como en las que solamente se utilizó agua destilada. Esto podría deberse a que la baja temperatura vuelve significativamente lento su crecimiento, aunado a la limitante de nutrientes en algunas de ellas, así como la falta de reguladores de crecimiento.

Según (Arun Kumar et al., 2005), la baja conversión de las semillas sintéticas se debe a la ausencia de un tejido nutritivo como el endospermo de la semilla natural. Proporcionar un endospermo sintético/artificial con la adición de una combinación adecuada de nutrientes, reguladores del crecimiento y protectores en las perlas de alginato podría superar estas deficiencias. Sin embargo, al encapsular brotes de *Solanum nigrum L.*, Satish K. (2010) menciona que no se observó una diferencia significativa en la conversión cuando los brotes se encapsularon en alginato de sodio preparado en agua bidestilada (97.2%) o en medio líquido MS de concentración completa (91.6%); aunque el alginato de sodio combinado con el medio MS demostró una superioridad significativa sobre el agua bidestilada con respecto al crecimiento de los brotes (4.2 y 3.5 respectivamente).

En el desarrollo de este proyecto uno de los principales retos a enfrentar fue la contaminación de las semillas sintéticas. Esto ocurría debido a que la longitud de

---

---

las plántulas impedía su encapsulación mediante el uso de pipetas (más sencillas de lograr su correcta esterilización) como mayormente se realizan los encapsulados.

De esta forma, fue necesario implementar diversos protocolos de desinfección y esterilización a todos los materiales que se emplearon. Sin embargo la contaminación llegó a algunas de las plántulas encapsuladas donde se utilizó medio MS para su elaboración. Esto es comprensible debido a que los nutrientes presentes en el medio facilitaron el crecimiento de hongos después de un tiempo de almacenaje.

Es importante recalcar que las semillas afectadas fueron aquellas almacenadas a temperatura ambiente, dado que las almacenadas a 4°C no presentaron ningún problema de esta índole, por el contrario, se conservaron en perfecto estado, tanto las que contenían medio MS como las que no. Esta situación se ve respaldada por Lee (20018), quien logró establecer una metodología exitosa para producir semillas artificiales de *Laelia anceps*, y que menciona que un embrión somático encapsulado de esta orquídea puede conservarse sin germinar hasta dos años, siempre y cuando se refrigere a cuatro grados centígrados.

La rehidratación de las plántulas encapsuladas y liofilizadas no fue satisfactoria, ya que se esperaba una hidratación completa de la perla de alginato de sodio que pudiera reblandecerla y permitir de esta forma el crecimiento de la plántula. Sin embargo las rehidrataciones a las que se sometieron las perlas no fueron completas, ya que solamente se reblandecía la capa exterior de estas pero el interior se mantenía firme.

Se intentó rehidratarlas usando medio líquido, con la finalidad de que, al hidratarse eventualmente, las plántulas empezaran a crecer tomando los nutrientes del medio. A pesar de esto, las perlas de alginato de sodio con las plántulas en su interior no se rehidrataron, y después del primer mes fue notorio que el medio se contaminó.

Es posible que esta circunstancia se deba a la fuerte interacción que existe cuando dos cadenas de bloque G de alginato se alinean y forman sitios de coordinación

---

---

propiciando que entre estas cadenas pueda alojarse un ión de calcio, en el llamado modelo de la caja de huevo; esto aunado a que también estas cadenas están revestidas con grupos carboxílicos y otros átomos de oxígeno electronegativos hace que sea muy difícil que el agua pueda ingresar nuevamente en esos espacios. Esto concuerda con lo expuesto por Hernández (et al., 2005) quien refiere que después de la adición de iones de calcio, el alginato sufre cambios conformacionales, dando lugar al conocido modelo de gelificación del alginato conocido como “caja de huevo”. Esto se basa en la dimerización de la cadena y, finalmente, en la mayor agregación de los dímeros. Lo anterior es importante, ya que los alginatos que presentan grandes regiones de bloques G forman un gel de fuerza alta y exhiben una alta porosidad. Los que presentan grandes bloques M forman un gel de fuerza media, pero con una alta resistencia a la sinéresis y exhiben poros más pequeños que los hacen más suaves. Para evitar la disgregación del alginato se requiere que el medio en el que se mantendrán las partículas tenga una concentración mínima del ión entrecruzante, por ejemplo, 0.003 M de calcio. Esto también podría aclarar por qué la hidratación fue tan difícil, dado que la concentración utilizada de cloruro de calcio en el experimento fue de 0.1M, mayor que la mínima requerida para formar el gel, aunque la ideal para la obtención de perlas de alginato no frágiles y consistentes.

---

---

## CONCLUSIONES

Se estableció la metodología para producir semillas sintéticas de *Cattleya trianae*, determinándose que las concentraciones óptimas de alginato de sodio así como la del cloruro de calcio para la encapsulación de plántulas de esta orquídea fueron de 4% y 0.1M, respectivamente.

Se determinó que la temperatura ideal de almacenamiento para las semillas sintéticas de *Cattleya trianae* encapsuladas utilizando o no medio MS es de 4°C, al conservarse perfectamente después de 60 y 75 días, respectivamente.

El mejoramiento de los protocolos de desinfección y esterilización es un punto crítico de control para limitar las posibilidades de contaminación hacia las plántulas encapsuladas antes, durante y después de su almacenamiento.

Es necesario revisar la metodología utilizada en la rehidratación de las perlas de alginato de sodio liofilizadas con el fin de obtener posteriormente los resultados deseados.

---

---

## COMPETENCIAS DESARROLLADAS

La principal competencia desarrollada durante este proyecto fue la tecnología de encapsulación para la producción de semillas sintéticas, que es una técnica que tiene como propósito la conservación de diferentes especies vegetales. Esta técnica permite una mayor versatilidad para la manipulación y el intercambio de estas mismas. El haber desarrollado este proyecto me generó una visión mucho más amplia sobre las posibilidades que existen hoy en día ante fenómenos que hace algunos años se veían muy lejanos de resolver. El más claro ejemplo se encuentra aquí, donde la tecnología y la innovación permiten generar soluciones sustentables hacia los retos que se enfrenta la humanidad, que cada vez son mayores.

Debido al aumento en la demanda de recursos vegetales, la tecnología de encapsulación y el cultivo de tejidos *in vitro* ofrecen alternativas para cubrir la demanda de estos recursos, ya que con estas técnicas de propagación es posible obtener material libre de patógenos, que tenga un alto porcentaje de probabilidad de completar su ciclo como planta y, por lo tanto, de aumentar la producción de especies agrícolas que hasta hoy se han visto limitadas por problemas en su propagación, como es el caso de las orquídeas, pero existen muchos más.

Dentro de las competencias aplicadas considero que se encuentran también las técnicas y el uso del material y equipo de laboratorio al que recurrí para llevar a cabo el proyecto, puesto que aunque lo conocía en su mayor parte, estar en contacto todo el tiempo con ellos hace que se agilicen las aptitudes previas.

Finalmente, espero que a futuro las semillas sintéticas de *Cattleya trianae* tengan la capacidad de germinar en condiciones *ex vitro*, sin el temor a la contaminación por agentes biológicos y de esta forma ser una solución a los problemas que presentan tanto su cultivo como su estatus de en peligro en extinción.

---

---

## FUENTES DE INFORMACIÓN

Ara, H., U. Jaiswal y V.S. Jaiswal (2000). Synthetic seed: prospects and limitations. *Current Science*, 78, 1438-1444

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Willy & Sons. New York.

Arditti, J.; Ernst, R. 1993. *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Sons, New York. USA. 640 p.

Arun Kumar, M.B., Vakeswaran, V., Krisnasamy, V., 2005. Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 81, 97–100.

Adhikari S, Bandyopadhyay TK, Ghosh P. Assessment of genetic stability of *Cucumis sativus* L. regenerated from encapsulated shoot tips. *Sci. Hort.* 2014; 170: 115–122.

Atwood, J.T. 1986. "The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids". *Selbyana*. 9:86-171.

Augst, A.D., H.J. Kong y D.J. Mooney (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6, 623-633.

Calderón, E. (2007). Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 6, primera parte. Orquídeas. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, D. C.

Cameron, K.M.; W.M. Whitten; P.J. Kores; D.C. Jarrell; V.A. Albert; T. Yukawa, H.G. Hills y D.H Goldman. 1999. "A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from *rbcl* nucleotide sequences" . *Amer. J. Bot.* 86:208-224.

Cardoza, V. (2008). *Tissue culture: The manipulation of plant development*. Plant Biotechnology and Genetics. Stewart, C.N.Jr. (ed.). John Wiley & Sons, Hoboken.

---

---

Chase, M.W., K.M. Cameron, R.L. Barrett y J.V. Freudenstein. 2003. "DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification". En: K.W. Dixo, S.P. Kell, R.L. Barrett y P.J. Cribb (eds.). Orchid conservation. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah.

Constantino, E. (2001). Las orquídeas del género *Cattleya* en Colombia: las especies, sus variantes, su distribución, su hábitat y el estado actual de su conservación. Cali, Colombia.

Damon, A., et. Al. (2004), Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México., Revista Chapingo, Serie Horticultura 10(2): 195-203, 2004.

Díaz-Piedrahita, S. (2001). La Flor de Mayo, *Cattleya trianae*, flor nacional. Revista Credencial Historia, edición 139

Dressler, R. L. (1981). The Orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.

Faried, M., K. Shameli, M. Miyake, Z. Zakaria, H. Hara, N.A. Khairudin y M. Etemadi (2016). Ultrasound-assisted in the synthesis of silver nanoparticles using sodium alginate mediated by green method. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 11, 547-552.

Fritzen-Freire CB, Prudêncio ES, Amboni RD, Pinto SS, Negrão-Murakami AN, Murakami FS. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. Food Research International 2012; 45: 06–312.

Hernández E. M., López G. Y. R. y García P. A. 2005. Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como superabsorbente. Revista Cubana de Química. Vol. XVII. 3: 239-240.

Lee, H. (2008). Semillas artificiales de *Laelia anceps*. Revista Universo, Universidad Veracruzana. Año 8, No. 309, Mayo 12 de 2008. Xalapa, Veracruz, México

---

---

Lee, K.Y. y D.J. Mooney (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106-126.

Lupo P. B., González A.C. y Maestro G. A. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (1): 130-151

McHugh D.J. (1987) "Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds", *FAO Fisheries Technical Paper* 288

Muñoz Rojas, A. (2015). Prospección geográfica de especies del género *Cattleya* en el departamento de Cundinamarca. Tesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cundinamarca. Fusagasugá, Colombia.

Nieves, N., Zambrano, Y., et. Al. (2003). Field performance of artificial seed-derived sugarcane plants.

Olmos, Sofia & Luciani, Gabriela & Galdeano, Ernestina. (2010). IV. Capítulo 1. Micropropagación.

Pinzon, Katherin L., (2016) Asymbiotic germination and development of seedlings of *C. trianae* (orchidaceae). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia., Tunja, Colombia

Rai, M.K., Asthana, P., Singh, S.K., Jaiswal, V.S., Jaiswal, U., 2009. The encapsulation technology in fruit plants—a review. *Biotechnol. Adv.* 27, 671–679.

Rai, M.K., P. Asthana, S.K. Singh, V.S. Jaiswal y U. Jaiswal (2009). The encapsulation technology in fruit plants - a review. *Biotechnology Advances*, 27, 671-679

Reddy, M.C., K.S.R. Murthy y T. Pullaiah (2012). Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. *African Journal of Biotechnology*, 11, 14254-14275.

---

---

Satish K. Verma; Manoj K. Rai; Pooja Asthana; V. S. Jaiswal; U. Jaiswal (2010). In vitro plantlets from alginate-encapsulated shoot tips of *Solanum nigrum* L. *Scientia Horticulturae*, ISSN: 0304-4238, Vol: 124, Issue: 4, Page: 517-521

Suárez B.E. y J. Mora L., 2007. Como cultivar orquídeas en su casa. Mundo Grafico, San Jose Costa Rica.225 p.

Téllez V., M. A. A. y L. Flores V. 2008. Orquídeas Terrestres. UNAM.México, D.F.

Thorpe, T. A. y Yeung, E. C. (2011). Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 710

---

---

## **ANEXOS**

Anexos (carta de autorización por parte de la empresa para la titulación y otros)

Registros de productos (patentes, derechos de autor, compra-venta del proyecto, etc)