



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTHA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

MICROPROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS SILVESTRES

(*Encyclia oxypetala* (Lindl.) Acuña y *Encyclia phoenicea* (Lindl.) Neum)

Tesis presentada en opción al Título Académico de
Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal

Loexis Rodríguez Montoya

Santa Clara, Cuba

2002

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTHA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



MICROPROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS SILVESTRES
(*Encyclia oxypetala* (Lindl.) Acuña y *Encyclia phoenicea*
(Lindl.) Neum)

Tesis presentada en opción al Título Académico de

Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal

Loexis Rodríguez Montoya

Santa Clara, Cuba

2001

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTHA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



MICROPROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS SILVESTRES
(*Encyclia oxypetala* (Lindl.) Acuña y *Encyclia phoenicea*
(Lindl.) Neum)

Tesis presentada en opción al Título Académico de

Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal

Autor: Ing. Loexis Rodríguez Montoya

Tutor: Dr. Rafael Gómez Kosky

Consultantes: MSc. Marlenis Cala Cala

Lic. Gerardo De la Cruz Licea

Santa Clara, Cuba

2002

RESUMEN

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Desarrollo de la Montaña con el objetivo de lograr la micropropagación de las especies de orquídeas silvestres *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*, para ello como material vegetal de partida se utilizaron cápsulas provenientes de plantas cultivadas en el Banco de Germoplasma *in vivo* del propio centro. Para lograr el objetivo propuesto se realizaron siete experimentos donde se evaluaron indistintamente los factores: sales de medios de cultivo, estado de madures de las cápsulas, estado de agregación del medio de cultivo, carbón activado, pH, sacarosa y sustrato. Los resultados alcanzados permitieron determinar el esquema de micropropagación de las especies. Entre los factores de mayor incidencias en ello destacan la utilización de las cápsulas maduras, medio de cultivo en estado líquido para la germinación de las semillas, carbón activado a razón de 0,15 %, sacarosa en dosis de 2,0 % para *Encyclia oxypetala* y 4,0 % para *Encyclia phoenicea* y el empleo de fibra de coco en la adaptación de las vitroplantas.

INDICE	Pág
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Origen e importancia de las Orquídeas.....	5
2.2 Características Generales de las orquídeas.....	6
2.2.1 Características de <i>Encyclia oxypétala</i>	9
2.2.2 Características de <i>Encyclia phoenicea</i>	10
2.2.3 Exigencias Edofoclimáticas de las orquídeas.....	12
2.3 Generalidades de Cultivo <i>in vitro</i>	13
2.3.1 Micropropagación de Orquídeas	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Determinación de los medios de cultivo para la germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de las semillas.....	30
3.1.1 Influencia de diferentes factores en la germinación.....	32
3.1.2 Influencia de dos valores de pH en la germinación de las especies.....	33
3.2 Comparación de dos métodos de cultivo en la multiplicación de protocormos..	35
3.3 Influencia de la sacarosa en el crecimiento de las vitroplantas.....	36
3.4 Influencia del tipo de sustrato en la adaptación de <i>Encyclia phoenicea</i>	36
3.5 Influencia de las características morfológicas de la vitroplantas en la adaptación de <i>Encyclia phoenicea</i>	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1 Determinación de los medios de cultivo para la germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de las semillas.....	39

4.1.1	Influencia de diferentes factores en la germinación.....	41
4.1.2	Influencia de dos valores de pH en la germinación de las especies.....	45
4.2	Comparación de dos métodos de cultivo en la multiplicación de protocormos...	47
4.3	Influencia de la sacarosa en el crecimiento de las vitroplantas.....	50
4.4	Influencia del tipo de sustrato en la adaptación de <i>Encyclia phoenicea</i>	53
4.5	Influencia de las características morfológicas de la vitroplantas en la adaptación de <i>Encyclia phoenicea</i>	55
5.	CONCLUSIONES.....	58
6.	RECOMENDACIONES.....	60
7.	BIBLIOGRAFÍAS.....	61
8.	ANEXOS.....	69

1. INTRODUCCIÓN

El elevado número de especies de orquídeas silvestres nativas existentes en Cuba, la ubica en el primer lugar en cuanto a riqueza orquideológica en el caribe. El cálculo real, conservador, muestra no menos de setenta especies amenazadas, sesenta de ellas endémicas (Díaz, 1988).

En condiciones naturales las semillas son transportadas por el aire a grandes distancias desde las plantas y depositadas en el suelo, el agua o en la superficie de los árboles, pero solo podrán germinar y convertirse en plantas si son infectadas por una especie determinada de hongo al que podrá asociarse en un proceso de beneficio mutuo llamado simbiosis (Thompson, 1980).

Las semillas de orquídeas crecen lentamente y requieren años para que la planta florezca. Sin embargo, es posible disminuir este tiempo e incrementar las poblaciones a través de las técnicas biotecnológicas suministrando a las semillas todos los nutrientes que necesitan para su crecimiento (Villalobos, 1990).

Entre las limitantes del cultivo de orquídeas se destacan, la lentitud de los procesos de germinación, y crecimiento vegetativo y reproductivo. La planta desde la siembra hasta la obtención de una flor, podría pasar entre 6 y 15 años, dependiendo de las condiciones agroclimáticas específicas que se presenten. Es por lo tanto una necesidad disminuir este período (Prakash y Pierik, 1993).

Pierick (1994), planteó que la deforestación de los bosques, la degradación de los ecosistemas montañosos y la contaminación ambiental han conllevado a que algunas

especies se encuentren en peligro de extinción y con el menor conocimiento sobre su propagación.

Las regiones montañosas son las más ricas en orquídeas. Algunas especies sólo las podemos encontrar por encima de 600 a 700 m. Por ejemplo, representantes de los géneros *Lepanthes*, *Stelis*, *Pleurothallis* y *Dischaea* cumplen con esta condición. Cuba oriental, con los complejos montañosos del norte (Sierras de Nipe y Cristal, Moa y Baracoa) y la Sierra Maestra, posee una gran riqueza. Lugares como la Gran Piedra y el parque Alejandro de Humbol constituyen verdaderos jardines naturales.

Desde hace más de dos décadas se vienen realizando investigaciones en orquídeas cubanas como parte de los estudios generales sobre la Flora de Cuba. Las principales investigaciones se realizan en el campo de la taxonomía, estudios florísticos, inventarios y conservación; donde la conservación de la diversidad biológica es un punto focal en estos estudios que están orgánicamente estructurados a nivel nacional, teniendo como centro rector el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

Muy pocas islas tienen áreas de reserva, y Cuba es un ejemplo de ello. Las áreas forestales han sido incrementadas y existen áreas de reserva que están protegidas y dentro de las cuales se encuentran muchas especies de orquídeas nativas. Sin embargo, no todos los hábitat de las orquídeas están protegidos y muchas de ellas están amenazadas.

George (1996), señala que *Encyclia oxypetala* (Lindley) Acuña, es una especie rara que aparece en el herbario de Lindley en Kew, colectada en Guantánamo en el año 1844, y aparte de este, puede encontrarse en muy pocos herbarios fuera de Cuba. Frecuentemente es confundida con *Encyclia tampensis* (Ldl.), *Encyclia fucata* (Ldl.) o con *Encyclia hircina*

(Ldl.), por sus semejanzas anatómicas.

El propio George (1996), caracteriza a *Encyclia phoenicea* (Lindley) Neum, y reafirma la palabra que le da origen al nombre, "Prodigio", no solo por la belleza de sus flores sino también porque estas tienen una fuerte y agradable fragancia a vainilla o a chocolate según el clon. La especie ha sido muy demandada y es una planta popular para coleccionistas y para la hibridación, ya que aumenta la resistencia al calor, a la falta de humedad en las flores, aporta buena fragancia, intensifica el color en los pétalos y sépalos y contribuye a formar labelos bien amplio. Entre sus principales híbridos se encuentran: *Epidendrum Tapaste*, descendiente con *Epidendrum tampense*, y *Brassoepidendrum Phoenix*, hecho con *Brassovola nodosa*. A diferencia de otras *Encyclias* Cubanas, hay muy pocas plantas en colecciones Americanas y ellas son altamente cotizadas.

El plan de acción para las orquídeas está a favor de una estrategia doble para conservar su biodiversidad, hábitat naturales y fomentar la propagación de las mismas.

El cultivo de tejido es usado para la propagación rápida de orquídeas bajo determinados intereses y es empleado industrialmente en Tailandia, Singapur, Malasia, Indonesia y otros países (Arditti y Ernst, 1993). Sin embargo, los procesos de micropropagación de orquídeas continúan demandando de mayor eficiencia, fundamentalmente en la disminución del período de germinación de semillas y de acelerar el crecimiento de las vitroplantas. En la actualidad cobra fuerza el trabajo con especies silvestres por el elevado valor genético y ecológico de las mismas. Entre los autores que reporta la literatura con investigaciones sobre esta problemática se encuentran: Ichihashi y Hiraiwa, (1996); Tai (1996); Wannakrairoj (1996); adelberg et al., (1997); Weber, S., (1997) y Calderon et al., (2001).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto y concientes de la necesidad de disponer de un mayor número de individuos de las especies silvestre *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*, las cuales constituyen una importante representación de la flora orquideológica de Cuba y que demandan la atención por todo lo que desde el punto de vista medio ambiental, ecológico y económico representan, se concibió esta investigación encaminada a lograr su micropropagación.

OBJETIVOS

1. Determinar el medio de cultivo para la germinación asimbiótica de las semillas.
2. Evaluar la influencia de los factores: tipos de sales, estado de madurez de las cápsulas, estado físico del medio de cultivo y pH en la aceleración del proceso de germinación.
3. Determinar el efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación de protocormos.
4. Evaluar el efecto de la sacarosa en el crecimiento de las vitroplantas.
5. Lograr altos porcentajes de supervivencias bajo condiciones *ex vitro*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origen e Importancia de las Orquídeas

Las orquídeas se agrupan en una familia (*Orchidaceae*) con más de 25 000 especies distribuida en todo el mundo. Siendo el epifitismo un fenómeno de los bosques tropicales húmedos, fuera de estos nos encontramos fundamentalmente especies terrestres (Días, 1988), los focos fundamentales donde se encuentra el mayor número de especies de orquídeas es en América del Sur y el Sudeste Asiático.

El nombre "Orquídea" proviene del latín *Orchideae* derivado a su vez del término latino *orchis*. Este fue utilizado por el filósofo Teofrasto al referirse a una planta con un par de bulbos semejantes a testículos; se trataba, por supuesto, de una orquídea. La palabra fue adoptada posteriormente por Dioscóride cuando preparaba su manuscrito sobre plantas medicinales y le atribuía propiedades afrodisíacas.

Según el sistema actual de clasificación las orquídeas se ordenan de la forma siguiente:

División: *Magnoliophytina*

Clase: *Monocotyledonae*

Orden: *Orchidales*

Familia: *Orchidaceae*

Los géneros de orquídeas Cubanas más representativos son:

Pleurothallis (42 especies)

Encyclia (27 especies)

Lepanthes (25 especies)

Epidendrum (22 especies)

Oncidium (16 especies)

Muchas orquídeas presentan formas, colores y aromas variados, algunas poseen propiedades bioquímicas (Arditti, 1979) de marcada importancia que permiten ser empleadas de diversas maneras:

- como plantas medicinales: *Cyrtopodium punctatum* (llamada cañuela) como cicatrizante, y para la cura del asma *Oncidium luridum*.
- en la industria culinaria donde es muy utilizada la *Vanilla planifolia* para extraer la esencia de vainilla.
- son muy cultivadas por su belleza como plantas ornamentales decorando jardines e interiores.

2.2 Características Generales de las orquídeas

Según George (1993), las orquídeas son plantas herbáceas con características diversas, que pueden o no presentar un engrosamiento en el tallo, conocido como pseudobulbo. De acuerdo con su hábito de crecimiento, se agrupan en: monopodiales y simpodiales. Las primeras crecen en dirección del eje central, y las simpodiales son las que crecen a lo largo de un rizoma. Entre las monopodiales se encuentran géneros como: *Vanilla*, *Vanda* y

Phalaenopsis, entre otras; y con crecimiento simpodial: *Epidendrum*, *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* y muchas más.

Las hojas varían mucho en tamaño y consistencia, e incluso podemos encontrar plantas sin hojas (áfilas). Las principales características para reconocer a las orquídeas están en sus flores. Las hay desde grandes y vistosas flores de las *Cattleya*, hasta el caso de las pequeñas *Lepantes* donde la flor mide milímetros. Sin embargo tanto en una como en otras podemos reconocer en cuanto a forma de las piezas que componen la flor, un modelo estructural único. Cada flor está compuesta por seis piezas: tres exteriores o *sépalos* y tres interiores o *pétalos*. Uno de los *pétalos* está modificado, y generalmente es el más grande y vistoso, y se denomina *labio* o *labelo*. Las partes interiores de la flor, conocidas en otros grupos como estambres y estilo, se fusionan en una estructura central denominada *ginostemo* o *columna*. Durante el desarrollo de la flor, el pedicelo sufre un giro, lo que se conoce como resupinación, donde el labelo por lo regular queda dispuesto hacia abajo.

En las especies más evolucionadas, los granos de polen se reúnen en pequeñas masas conocidas como polinios, cuyo número oscila entre dos y ocho. Junto al desarrollo del polinio, se produce una modificación de lo que corresponde a un lóbulo del estigma en un órgano conocido como *rosetelo* y que se manifiesta generalmente como un piquito, y cuya función es la producción de una sustancia adhesiva que permite la fijación de los polinios sobre los agentes polinizantes (Días, 1988).

Una vez polinizada la flor, comienza el desarrollo del fruto, una cápsula que al madurar se abre y deja al descubierto miles de diminutas semillas que son fácilmente transportada por el viento a grandes distancias.

Thompson (1980), planteó que las orquídeas se valen de determinadas singularidades y mecanismos sofisticado para atraer a los agentes polinizantes. La tenencia de una simetría bilateral, al igual que los insectos y otros animales, es una forma de identificación con ellos; el perfume de las flores, el color y la forma, pueden atraer a determinados animales aprovechando sus instintos. Algunas son conocidas como orquídeas Moscas, por el parecido con la hembra de estos insectos lo que hace que sea visitada por el macho. En este y otros géneros se aprovechan los instintos sexuales como forma de atracción de los agentes polinizantes. Se aprovechan además con este objetivo, los mecanismos de defensa, la alimentación, etc.

Un fruto posee miles y algunos millones de pequeñas semillas, y una misma planta produce numerosos frutos en pocas generaciones, por lo que las orquídeas podrían cubrir la faz de la tierra. El problema consiste en que la mayor parte de esas semillas no tienen posibilidad para germinar, ya que carecen de reservas para alimentar al embrión en sus primeras fases de desarrollo. Ellas deben establecer una relación simbiótica con un determinado hongo que le brinda al embrión los nutrientes necesarios para el desarrollo de la pequeña plántula o protocormo, lo que ocurre en muy baja frecuencia. Es por ello que se han desarrollado las técnicas de cultivo in vitro para la propagación masiva de las orquídeas (Singh, 1993).

Las semillas de orquídeas son únicas por varias razones. Son extremadamente pequeñas (80-130 μm de ancho y 470-560 μm de largo). Cada semilla contiene un embrión indiferenciado compuesto por 80-100 células, sin un endospermo funcional (Prakash y Pierik, 1993).

2.2.1 Características de *Encyclia oxypetala*



Fig.1: Ejemplar de *Encyclia oxypetala* florecido

Existen pocos herbarios donde se pueda encontrar esta planta, y en muchos de ellos ha sido confundida con *Epidendrum tampensis* o con *Epidendrum hircinum*. Esto se debe entre otras causas a la juzgada presencia de estas especies en Cuba, pero las verdaderas plantas de *Epidendrum tampensis* no crecen aquí.

Encyclia oxypetala se encuentra en el herbario de Lindley en Kew, ejemplar colectado en Guantánamo en 1844. Los pétalos y sépalos son estrechos y puntiagudos, lanceolado-lineares y de 14-16 mm de largo. Tiene un cierto pelo pubescente en el istmo, en medio y

extremidades del lóbulo lateral del labio, una característica común con *Epidendrum tampensis*. De modo distintivo *Enc. Oxypetala* tiene en el labio un istmo que es largo y estrecho, a mediado del labelo es ovado y puntiagudo, nervios un poco verrugoso y los lóbulos laterales son alargado y obtuso. El labelo tiene entre 9-10 mm de ancho y 15 mm de largo con lóbulos laterales paralelo al eje central. La columna carente de aurícula (una diferencia profunda con *Epidendrum tampensis*), más parecida a la de *Enc. hircina* o *Enc. Fucata* la cual tiene el mismo extremo alado que termina en un punto por lo que no posee aurícula. Las flores aparentan ser verdes brillantes a oscuras o tostadas con el labelo blanquecino teniendo un marcado castaño en las nervaduras. La planta tiene hojas simples y las pequeñas flores son amontonadas en panícula en zigzag en la misma forma de *Enc. Fucata*. Florece a inicio de la primavera.

2.2.2 Características de *Encyclia phoenicea*



Fig.2: Encyclia phoenicea

Bien nombrada por sus pétalos y sépalos largo, oscuro, carnosos-coriáceo y púrpura castaño. La riqueza del color es claramente marcada por Lindley con Phoenicean purple, característica de la Túnica Real en la Roma antigua, teñida por un raro preparado con moluscos púrpura.

Los pétalos y sépalos pueden ser moteado con manchitas verdes en algunos clones y el largo labelo varía desde verde hasta un color violeta brillante con nervios oscuros del mismo color.

Un ejemplar característico puede producir flores con sépalos de 9-10 mm x 27 mm; los pétalos son de 6-7 mm x 27 mm; y el labelo aplastado puede extenderse hasta 35-38 mm entre el extremo del lóbulo lateral con un largo de 30 mm. El centro del lóbulo es de aproximadamente 28 mm de ancho X 20 mm de largo con un margen ondeado y una leve incisión en la punta.

Algunos clones tienen un labelo casi llano, pero la tendencia general es que este sea rizo alrededor de sus bordes o arrugado hacia abajo a lo largo de la línea. Las flores tienen una fuerte y agradable fragancia a vainilla o a chocolate.

La especie ha sido muy demandada y desde hace mucho tiempo es una planta popular para los coleccionistas y para la hibridación. A diferencia de otras *Encyclias* Cubanas, hay muy pocas de esta en colecciones Americanas y son altamente cotizadas.

Encyclia phoenicea crece en Cuba y Bahamas algunas como xerofíticas. Gustan estar a raíz desnuda sobre corcho costero o en cesta con osmunda, viviendo en su mayoría en humedad y ocasionalmente se fertilizan.

Las plantas han sido confundidas en los herbarios y en la naturaleza con *Enc. plicata* y las dos se encuentran en Bahamas y Cuba. Sin embargo, George (1996), plantea que a pesar de que existen reportes de que *Encyclia phoenicea* puede encontrarse en Las Bahamas y en Isla Caimán, él, solo la ha localizado en Cuba incluyendo la Isla de la Juventud, aunque afirma que sería lógico encontrarla en todas estas Islas porque geográficamente estuvieron conectada a Cuba.

Las plantas coleccionadas florecen en verano, muchos capullos aparecen en junio o julio y las flores abren en un racimo típico. Es una especie muy buena para la hibridación , ya que aumenta la resistencia al calor, a la falta de humedad en las flores, aporta buena fragancia, intensifica el color en los pétalos y sépalos y contribuye a formar labelos bien amplio. Entre sus principales híbridos se encuentran: *Epidendrum Tapaste*, descendiente con *Epidendrum tampense* y *Brassoepidendrum Phoenix*, hecho con *Brassoavola nodosa*.

2.2.3 Exigencias Edafoclimáticas de las orquídeas

La familia Orchidaceae presenta varios hábitos:

- epífitas

- terrestres
- litofíticas
- semiacuáticas
- saprófitas

Están ampliamente distribuidas en todo tipo de vegetación, desde una xeromorfa costera hasta el bosque pluvial montano, por lo que las condiciones edafoclimáticas para su cultivo depende de la especie.

Días (1988), plantea que observar como viven las Orquídeas en su medio natural es importante para el mantenimiento del cultivo, ya que a medida que ofrezcamos condiciones de cultivo semejantes a la cual provienen lograremos más éxito.

La especie silvestres que crecen en las montañas de Cuba generalmente necesitan una intensidad luminosa de 30 a 40 % y que la humedad relativa oscile entre un 80 y un 90 % (Rodriguez,1998). En el cultivo de las mismas es más importante el mantenimiento de la humedad que el riego directo (Meckenzie,1980)

Según Male (1992), las raíces de estas plantas carecen de pelos absorbentes, pero desarrollan un velamen radicular cuyas células se llenan de aire, son las encargadas de la absorción de diferentes vapores, ya sea vapor de agua o de elementos simples.

2.3 Generalidades del cultivo *in vitro*

La micropropagación posee cuatro etapas bien definidas propuestas por Murashige (1974) y citado por Roca (1991):

Establecimiento aséptico del cultivo in vitro:

El objetivo de esta fase es establecer cultivos asépticos y viables, con los cuales iniciar el proceso de propagación.

El explante con todas sus características es determinante en esta etapa (George y Sherrington, 1984). La edad y el tamaño del mismo tienen una estrecha relación con la respuesta y la contaminación (Villalobos y García, 1982).

Los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y bicloruro de mercurio (Jiménez, 1998).

Multiplicación in vitro:

Es considerada la etapa más importante del proceso donde se debe garantizar la propagación de brotes y estabilidad genética de las plantas producidas.

Según Orellana (1998), la proliferación de los diferentes explantes en el cultivo *in vitro* puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras del crecimiento como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo del proceso *in vitro*. Los explantes, al ser divididos en condiciones estériles y cultivados nuevamente en el medio fresco inducen nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr

la cantidad de propágulo deseado.

La proliferación de yemas axilares es un método muy utilizado en la multiplicación *in vitro*, ya que posibilita la mayor estabilidad genética en las plantas producidas (Murashige y Huang, 1987). El éxito de este método ha sido relativamente rápido con especies herbáceas, pero con especies leñosas ha sido más lento por desconocimiento de la información genética de estas plantas (Sangwan-Norreel et al., 1991).

Medios de cultivo:

En la actualidad la mayor parte de las publicaciones reportan el medio de Murashige y Skoog (1962), como medio basal suplementado con dosis variable de citoquininas, en algunos casos combinadas con auxinas. Más del 85 % de los medios de cultivo empleado en la micropropagación incluyen como suplemento alguna citoquinina (Orellana, 1998).

La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical. La 6- Bencilaminopurina (6-BAP) es en general la citoquinina más empleada en la inducción de yemas axilares, también se utilizan con frecuencia la Kinetina, el 2-ip y la Zeatina (Hu y Huang, 1983).

La tendencia actual en la propagación de plantas es el empleo de medios de cultivo cada vez más simple. Por ejemplo, en caña de azúcar se reporta la multiplicación sin emplear ningún regulador del crecimiento aprovechando la habilidad natural de este cultivo para el

ahijamiento axilar (Feldmann et al., 1994)

Concentración de las sales minerales:

El manejo de las concentraciones de sales minerales es recomendable ampliamente para estimular el desarrollo de los explantes y su rol puede ser más o menos significativo en dependencia del genotipo y la fase en que se utilice, como es el enraizamiento (Murashige 1982), planteándose por Hu y Wang (1983) que se logra la formación de abundantes raíces al disminuir las sales a la mitad, un tercio o un cuarto de la concentración. No obstante el procesamiento más empleado es la reducción de sales a la mitad.

Concentración de sacarosa:

Según Jiménez (1995), las plantas procedentes de los medios con mayores concentraciones de sacarosa presentan una mayor supervivencia de adaptación al ser trasplantadas al suelo, tal vez debido a una mayor adaptación para soportar el stress hídrico, motivado por las condiciones de mayor presión osmótica, donde se desarrollan, unido a una mayor constitución morfológica de las vitroplantas. En cultivos de caña y papa, con altas concentraciones de sacarosa de 5-9 %, 4-8 % respectivamente se han obtenido abundante enraizamiento. Sin embargo, existen especies que responden mejor al crecimiento en el cultivo *in vitro* con bajas concentraciones de sacarosa y otras en ausencia de la misma como es el caso de *Cymbidium* (Kano, 1965).

Estado físico de los medios de cultivos:

Los medios de cultivos líquidos ofrecen ventajas en esta fase, ya que permiten la difusión de los residuos tóxicos de las plantas, fundamentalmente los fenoles que son abundantes durante la iniciación del crecimiento de las raíces y desarrollo general de las plantas acortándose el proceso de trasplante. Aproximadamente el 12% de los medios de cultivos utilizados durante esta fase se emplean en estado líquido (Hu y Wang 1983). Además el empleo de estos medios trae consigo una disminución de los costos por concepto de los medios de cultivos al eliminarse el agar, lo cual tiene un efecto superior al ser en esta fase donde se maneja un mayor volumen de plantas en todo el proceso de propagación *in vitro*.

Aunque la mayor parte de la literatura se refiere al enraizamiento *in vitro* existe un marcado interés fundamentalmente en la micropropagación comercial para efectuar el enraizamiento in vivo (*ex vitro*) (Debegh y Read, 1991; Daquinta, 2001). El logro del enraizamiento *ex vitro* tiene varias ventajas: a) es mucho más fácil manipular una vitroplanta sin raíces, b) el sistema de raíces producido *in vitro* no siempre es funcional, c) la posibilidad de dañar las raíces al momento de su extracción del frasco es real, lo cual da la posibilidad para la penetración de enfermedades y d) es más fácil y económico crear condiciones para enraizar *ex vitro* que *in vitro* (Orellana, 1998).

Enraizamiento y preparación del inóculo:

Su objetivo es preparar las plantas para su restablecimiento en condiciones del suelo

Es la fase más voluminosa de todo el proceso, ya que cada esqueje, brote o yema debe de

manejarse de forma individual en condiciones *in vitro* para que además de crecer y formar un seudotallo o tallo, forme y desarrolle raíces que le permitan absorber los nutrientes al trasplante sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una vitroplanta aclimatizada lista para llevarse al campo (Orellana, 1998).

Para lograr la mayor eficiencia biológica, económica y productiva, en esta fase, deben manejarse varios factores, entre ellos: medio de cultivo simple y de ser posible en estado líquido, uso de componentes del medio con sustancias químicas de calidad técnica, luz natural como fuente de iluminación, frascos de cultivo con dimensiones adecuadas para la especie que se produce, disminuir al mínimo los riesgos de contaminación, entre otros.

Existen tres estado de desarrollo involucrado en la rizogénesis: a) inducción, b) iniciación y c) elongación. Ya que es bastante difícil separar los estados a y b, generalmente estos se combinan en el estado de iniciación (Hu y Huang, 1983).

El rol de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocido (Vázquez y Torres, 1981) recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de enraizamiento, excepto en aquellas especies donde su empleo no es necesario. Las auxinas más usadas en esta fase son el ANA, AIB, AIA y 2,4-D. Para muchas especies de plantas se ha demostrado que la auxina más importante es el ANA (Kito y Youg, 1981; Johnson, 1978).

Orellana (1995), refirió que ya que los brotes jóvenes son una fuente rica en la producción

de auxinas, la adición de estas a los medios de cultivo durante esta fase, se ha encontrado que es innecesaria para muchas especies.

Durante la fase de enraizamiento también es importante manejar otros factores en el medio de cultivo tales como: concentración de sales minerales y de sacarosa, sustitución de sales con calidad reactivo, estado físico del medio de cultivo, entre otros (Orellana, 1998).

Aclimatización

Los objetivos de ésta fase es lograr la supervivencia al momento del trasplante y el inicio del crecimiento de la misma. Durante esta etapa se produce un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales después de la etapa *in vitro*.

Problemas fundamentales de la aclimatización:

Ziv (1995), planteó que el trasplante y re-establecimiento de las plantas propagadas asépticamente, bajo condiciones no asépticas es uno de los problemas más importantes en la propagación de cultivos de tejidos en muchas plantas, siendo ésta una de las fases más críticas del cultivo de tejidos.

Según George (1993), la pérdida de agua por excesiva transpiración es uno de los problemas fundamentales a la hora de establecer las plantas a las condiciones *ex vitro*, debido a que éstas plantas son cultivadas en un medio de agar y en una atmósfera saturada, lo que provoca un pobre funcionamiento de la cera epicuticular y un mal

funcionamiento de los estomas, porque los mismos no responden frente aquellos estímulos que inducen al cierre.

Otra gran dificultad durante el trasplante son las plantas vitrificadas, lo cual retarda el crecimiento, rápidamente se marchitan. Reducen la acumulación de lignina y celulosa. En estas plantas se reducen la presión de la pared celular, incrementándose la salida de agua tomada por la células, se reduce la capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo o mixótrofo (Denng y Donnelly, 1993).

Cuidados que deben tenerse en cuenta durante el trasplante:

- Disminución progresiva de la humedad relativa: Para esto es recomendable destapar los frascos días antes del trasplante o mantener la planta de 24-48 h en bandejas con agua destilada.
- Lavar cuidadosamente la planta para eliminar restos de agar de los brotes y raíces.
- Sumergir la planta en una solución fungicida.
- Mantener la humedad relativa alta de un 80-90% durante las dos primeras semanas y reducir la intensidad luminosa.
- A partir de la segunda semana incrementar progresivamente la luz y espaciar los riegos.
- Iniciar la fertilización tan pronto se haya establecido el sistema radicular, esto normalmente ocurre a la segunda y tercera semana.

Instalaciones utilizadas para la aclimatización:.

Para establecer el tipo de instalación que se va a emplear en la aclimatización se debe tener en cuenta el tipo de planta que se va a adaptar con sus requerimientos ambientales y el clima de la zona.

Se utilizan invernaderos que son instalaciones muy costosas donde existe un buen control de la temperatura, humedad relativa, dióxido de carbono e iluminación. En climas más cálidos se emplean instalaciones más sencillas como los umbráculos, de menor costo inicial y mantenimiento (Agramonte et al., 1998)

Sustratos:

El sustrato es el soporte de la planta donde se desarrollan las raíces y donde éstas deben encontrar el agua y los elementos necesarios para su crecimiento.

Características que debe cumplir el sustrato.

- Estabilidad física: No debe perder sus cualidades físicas hasta transcurrido un tiempo razonable.
- Densidad del sustrato: Debe ser ligero para facilitar el manejo y transporte de los contenedores.
- Aereación: Las raíces necesitan buena aereación para desarrollarse. Cuando se riegan una parte del agua drena dejando un espacio que ocupa el aire, el cual debe ser como mínimo 20 % del volumen total y a veces más.
- Acidez: Para la mayoría de las plantas el pH óptimo se sitúa entre 5.5 y 6.5.
- Sanidad: Debe estar libre de patógenos de cualquier tipo que puedan dañar a la planta.

- Capacidad de retención de los nutrientes: Los nutrientes se aportan por lo general por el agua de riego, el sustrato debe ser capaz de retenerlo. La medida de la capacidad de retención es la mediada de la capacidad de intercambio iónico, que indica la capacidad con que el sustrato retiene y sede iones. El sustrato óptimo debe tener entre 15 y 50 mg /100 cm³.
- Capacidad de retención del agua: El sustrato debe retener la mayor cantidad de agua posible sin poner en peligro la aereación.
- Fertilidad: La planta debe encontrar en el los nutrientes aunque estos puedan suministrarse externamente.

Materiales empleados en la preparación del sustrato:

1. Turba: Por sus cualidades es el material base para cada sustrato. Debe tenerse en cuenta el origen y grado de descomposición de la misma, pues con el tiempo pierde sus características físicas, sanidad y el pH.
2. Arenas y grabas: se utilizan en pequeñas cantidades en algunas mezclas para dar un poco de peso y mejorar la estructura.
3. Materiales sintéticos: Son vario los materiales sintéticos que pueden utilizarse como Vermiculita, Lana de Roca y Zeolita.
4. Residuos de plantas: Entre los más utilizados están las fibras procedentes de cortezas de árboles (pinos, fibras de coco, aserrín, etc).
5. Otros productos orgánicos: Se utilizan con mucha frecuencia residuos agrícolas y el humus de lombriz.

2.3.1 Micropropagación de orquídeas

Tipos de explantes:

En la micropropagación de las orquídeas son varios los tipos de explantes que pueden utilizarse, y de este depende la desinfección que se realice. Entre los más frecuentes están: segmentos de hojas jóvenes, secciones nodales, pedúnculo florales, inflorescencia jóvenes, raíces, entre otros (Singh y Prakash, 1984 y 1990; Goh, 1989; Stewart, 1989 y Tanaka y Sakanishi, 1980). Sin embargo, la micropropagación de orquídeas a través de la germinación de semillas es uno de los métodos más empleado (Singh, 1993). Para la esterilización se tiene en cuenta el estado de madures de las cápsulas, ya que estas pueden utilizarse verdes o en estado de madures avanzado o dehiscentes.

Desinfección:

El explante colectado en casas de cultivo o en condiciones de campo, generalmente está contaminado con microorganismos u otros contaminantes. Durante la preparación del explante los microorganismos pueden ser eliminados, pero en ocasiones se multiplican rápidamente en el medio de cultivo donde las condiciones son propicias para su crecimiento (Read, 1997 y Singh, 1993).

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas y frágiles, y también pueden contaminarse con esporas de hongos y bacterias. Debido a que las semillas no soportan la presión del autoclaveado, es preciso realizar desinfecciones químicas para eliminar los contaminantes.

Los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO) y el hipoclorito de calcio (CaClO) en rango desde 0.4 – 8%. Su efectividad aumenta si se adiciona algún agente humectante como Tween 20 (Thompson, (1980).

Condiciones de cultivo:

Durante la germinación in vitro de semillas de orquídeas los factores que más afectan son la luz, temperatura y pH. Pierik et al. (1988), coincidieron en que los requerimientos de luz y su fotoperiodo varían según las especies. Algunas requieren de un tiempo en la oscuridad para estimular la germinación, otras se desarrollan mejor en la oscuridad, pero la mayoría requieren intensidad de luz alrededor de 1500 lux.

La humedad relativa debe ser bastante alta, y la temperatura en muchas especies debe estar entre 20-25 °C pero el rango puede variar desde 6-49 °C (Arditti, 1979). Por su parte el pH puede oscilar en un rango de 4.8-5.8 (Praskash y Pierik, 1993).

Medios de cultivo:

Existen varios medios que son utilizados para las diferentes fases de la micropropagación de orquídeas en dependencia de la especie. Entre los más frecuentes se encuentran: Knudson C(1946), Murashige y Skoog (1962), Thompson (1974), Thomale (1954) y otros (Hew y Yong, 1997). A ellos es común adicionarles extractos naturales como agua de coco o pulpa de plátano. En dependencia de que si la especie con que se trabaje ocurre oxidación de los tejidos pueden suministrarse al medio antioxidantes (carbón activado, ácido cítrico y

ácido ascórbico entre los más utilizados), (Mackendrick, 2000).

Chute y Toothaker (1996), plantearon que el medio de cultivo en estado líquido es preferible para la iniciación y proliferación de protocormos. Cuando estos se emplean debe utilizarse una zaranda orbital, lo que proporciona las ventajas siguientes:

- a) el medio se auto oxigeniza
- b) fácil disponibilidad de nutrientes para los explantes
- c) dispersión y dilución de las sustancias tóxicas producidas por el explante
- d) facilita el establecimiento de la polaridad
- e) si después de algunos días el medio se torna turbio, se puede realizar cambios frecuente del mismo por simple transferencia

Reguladores del crecimientos:

Los reguladores del crecimiento pueden o no utilizarse y entre los más empleado se encuentran: 6-BAP, Kin, 2.4-D y ANA fundamentalmente en fase de multiplicación y enraizamiento (Calderón et al., 2001).

Multiplicación:

La multiplicación *in vitro* de orquídeas es un proceso que predominantemente se realiza aprovechando las potencialidades de división que poseen los callos o protocormos formados durante el cultivo de tejidos o la germinación *in vitro* de semillas (Kishi y Takagi, 1997).

En el medio de cultivo los protocormos que emergen desde las semillas forman protocormos secundarios de modo espontáneo y en ocasiones los mayores esfuerzos están encaminados a frenar su proliferación. Las semillas que se encuentra en números de cientos de miles en solo una cápsula y que frecuentemente alcanzan porcentajes de germinación elevados, son suficientes para lograr las cantidades deseadas de vitroplantas (George y Ravishankar, 1997). En estos casos los protocormos deben ser separados en subcultivos posteriores empleando medios sólidos para que se desarrollen hasta formar las plántulas con las características apropiadas para ser trasplantadas. No obstante existen razones que justifican transitar por este proceso para obtener mayores cantidades de plantas entre los cuales se encuentran: escasa disponibilidad de semillas u otras fuentes de explantes, bajos porcentajes de germinación de semillas, multiplicación de híbridos, etcétera (Davidonis et al., 1997).

Crecimiento y desarrollo:

Para el crecimiento de las vitroplantas de orquídeas se tienen indicaciones generales que se cumplen satisfactoriamente pero que es importante mantener un seguimiento por especies para detectar las variaciones que puede desprenderse de algunas de ellas.

Cuando se tienen suficientes protocormos estos se subcultivan en medio sólido para formar plántulas. El primer síntoma de crecimiento es que los protocormos se tornen verde y los brotes crezcan en el medio de cultivo. Para esto se reduce el número de protocormos en el frasco y con la adición de algún suplemento orgánico que puede ser pulpa de plátano

aplastado, agua de coco, jugo de piña, jugo de tomate entre otros, se garantiza buen crecimiento y enraizamiento de las vitroplantas por lo que no se requiere de la utilización de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo (Malemnganba, et al., 1996).

Aclimatización:

Generalmente se requieren de 2-4 subcultivos en un periodo de 4-8 meses hasta que las vitroplantas alcancen un tamaño de 2-3 cm, tres hojas como mínimo y estén bien enraizadas para ser trasplantadas a condiciones *ex vitro*. A medida que las plántulas crecen y se les dan nuevos subcultivos es conveniente reducir el número de ellas en los frascos. Algunas especies necesitan mayor o menor tiempo para cumplimentar los requerimientos para el trasplante, en donde la fibra de coco es un sustrato de excelentes condiciones para brindar a las plántulas mayor posibilidad de supervivencia y desarrollo (Anónimo, 2000 y Nogueira, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM) en el periodo comprendido de Enero del 2000 – Diciembre del 2001.

Procedimientos generales:

Material Vegetal

El material vegetal de partida utilizado provino del Banco de Germoplasma *in vivo* de orquídeas silvestres ubicado en las proximidades del CDM (Fig. 3), y consistió en semillas de cápsulas que procedían de flores polinizadas artificialmente con el objetivo de mantener la estabilidad genética de las descendencias.



Fig.3: Vistas del banco de germoplasma de orquídeas silvestres

Frascos de cultivo

En los experimentos en que solo se utilizó medio de cultivo semisólido se emplearon frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, y en los que se evaluaron medios de cultivo

semisólido y líquido se utilizaron Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, en todos los casos se le añadió 25 ml del medio de cultivo.

Medios de cultivo y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo se citan en cada uno de los experimentos. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave vertical a 1.2 Kg. f. cm² durante 20 minutos. El pH fue ajustado antes del autoclaveado a 5.6 en todos los casos, excepto cuando se evaluó la influencia de este en el medio de cultivo. El ajuste de pH se realizó con NaOH (v/v) y HCl (v/v) a una concentración de 1,0 M. Para los medios de cultivo líquidos se utilizó una agitador orbital a 100 rpm (revoluciones por minutos), (Fig.4).



Fig.4: Medio líquido en agitador orbital

La cámara de cultivo se mantuvo con una temperatura de 25 ± 2 °C , bajo condiciones de luz natural. Los medios de cultivo en reposo antes de la inoculación del material vegetal se

mantuvieron en la oscuridad, así como durante los siete primeros días después de la siembra de las semillas. Posterior a esta fecha los frascos pasaron a las condiciones de luz natural.

Condiciones de trabajo

Una vez en el Laboratorio, la manipulación del material vegetal se realizó bajo condiciones de asepsia en cabina de Flujo Laminar horizontal “Faster”, sobre platos metálicos y /o placas de Petri esterilizadas en estufas a 180 °C durante dos horas. El instrumental empleado (pinzas y bisturí) se desinfectó con solución de hipoclorito de sodio al 1,0 % (p/v) durante 20 minutos.

3.1 Determinación de los medios de cultivo para la germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas

Con el objetivo de conocer las repuestas de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* en la germinación bajo diferentes formulaciones de sales de medio de cultivo y dosis de carbón activado, se realizó la investigación. Para ello se utilizaron cápsulas verdes (entre 60 y 80 días de edad después de la polinización) las cuales se desinfectaron de la forma siguiente:

Las cápsulas fueron lavadas con detergente al 1,0 % y sumergidas cinco minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,0 % de cloro activo al que se le añadieron dos gotas de Tween 20 y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. En la cabina de flujo laminar se sumergieron las cápsulas en solución de sulfato de cobre al 2,0 % durante

5,0 minutos, luego en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,0 %, y finalmente se enjuagaron con suficiente agua destilada estéril. Antes de ser seccionadas, las cápsulas fueron pasadas por alcohol al 70 % y flameadas.

Las distintas combinaciones ensayadas se describen en la tabla 1 y fueron empleadas indistintamente para las dos especies.

Tabla 1: Combinaciones de Sales y Carbón activado ensayadas.

Sales	Carbón activado (%)	
Knudson C(1946)	0	0,15
Vacin y Went (1949)	0	0,15
0,5 Murashige y Skoog (1962)	0	0,15
Morel (1965)	0	0,15

Estas combinaciones fueron suplementadas con agua de coco al 10 %, sacarosa 2 %, tiamina $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ y gelificadas con $7,0 \text{ g.l}^{-1}$ de agar técnico # 3. Las cápsulas se seccionaron con bisturí y se extrajeron las semillas que fueron distribuidas de forma homogénea sobre los medios de cultivo. Se evaluó la fenolización de las semillas y semanalmente su germinación, con un tamaño de muestra de 20 frascos por tratamientos bajo un diseño completamente aleatorizado. Para el procesamiento estadístico de los resultados se escogieron los tratamientos donde ocurrió la germinación y se analizaron a

través de un ANOVA simple y el test de Duncan para $p \leq 0,05$ en la comparación múltiple de medias de *Enc. oxypetala* y test – student para las de *Enc. phoenicea*.

3.2 Influencia de los factores: tipos de sales, estado de madurez de las cápsulas, estado físico del medio de cultivo en la aceleración del proceso de germinación.

Para la realización de este estudio se utilizaron cápsulas con las mismas características que las del epígrafe anterior y cápsulas maduras (Fig. 5) que se encontraban parcialmente dehiscentes.



Fig.5: Cápsulas fuentes de explantes. .izquierda: madura, derecha: inmaduras

Las primeras se desinfectaron según el procedimiento descrito anteriormente y para las segunda fue necesario realizar un tipo de desinfección diferente a la del experimento anterior. Para ello se procedió de la forma siguiente:

Las semillas fueron expuestas directamente a los desinfectantes, para esto primeramente se seccionaron las cápsulas y las semillas se sumergieron en solución de hipoclorito de

sodio (NaOCl) al 1,0 % acompañado con dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos en agitación constante. En condiciones de cabina de flujo laminar y con la ayuda de bomba de vacío, embudo y papel de filtro de 11 cm de diámetro se filtraron las semillas y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. (Fig. 6).



Fig. 6: Materiales necesario para la desinfección de cápsulas maduras

Los medios de cultivos se emplearon en estados semisólido y líquido y estuvieron compuestos por los siguientes sales (tabla 2):

Tabla 2: Sales de los medios de cultivo utilizados en el experimento.

Símbolo	Sales macroelementos	Sales microelementos
A	Knudson C (1946)	Knudson C (1946)
B	Knudson C (1946)	½ MS (1962)
C	½ MS (1962)	½ MS (1962)

Todos los medios fueron suplementados con 10 % de agua de coco, 2% de sacarosa, 0,1 mg.l⁻¹ de tiamina y para los medios semisólidos 0.15 % de carbón activado y 0.7 g.l⁻¹ de agar. Se evaluó la germinación y su resultado fue expresado en días. Las muestras (20 frascos por tratamientos) se ubicaron en un diseño completamente al azar, y el procesamiento estadístico se realizó con un análisis de varianza de Contrastes Ortogonales a Priori para 0.01 nivel de probabilidad.

3.2.1 Influencia del pH en la aceleración de la germinación

Teniendo en cuenta los resultados positivos en la disminución del período de germinación en el epígrafe 3.2 con la utilización de cápsulas maduras y el medio de cultivo en estado líquido, se fijaron dichas condiciones para desarrollar esta investigación con el objetivo de evaluar el efecto de los valores de pH 5,0 y 5,6 en la germinación.

El medio de cultivo estuvo compuesto por ½ de las sales MS (1962) suplementado con 10% de agua de coco, 2,0 % de sacarosa y 0,1 mg.l⁻¹ de tiamina. La variable a evaluar fue la germinación de las semillas y sus resultados se expresaron en días. Se utilizaron 20 frascos por tratamientos en un diseño completamente al azar y el procesamiento estadístico se realizó según la prueba no paramétrica de Wilcoxon Matched Pairs.

3.3 Efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación de protocormos

Se utilizaron protocormos procedentes de semillas germinadas y las sales del medio de

cultivo MS (1962) en estado líquido y semisólido con los suplementos 3,0 % de sacarosa, 15 % de agua de coco, 0,1 mg.l⁻¹ de tiamina y para el estado semisólido 7,0 g.l⁻¹ de agar, y 0,15 % de carbón activado y en ambos casos el pH fue ajustado a 5,6; para evaluar la efectividad de los dos métodos de cultivo en la multiplicación de protocormos.

En ambos casos se inició con 50 protocormos en cada recipiente, en un total de 10 por tratamientos los cuales contenían 25 ml del medio de cultivo y se contabilizaron los protocormos a los 10, 20 y 30 días posterior a la incubación que fue realizada en agitador orbital (100 rpm) para el método de cultivo en estado líquido. El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con ANOVA simple y las medias comparadas a través de LSD (Steel y Torrie, 1980) para 0,05 nivel de probabilidad.

3.4 Influencia de la sacarosa en el crecimiento de las vitroplantas.

En un medio de cultivo que contenía las sales MS (1962) suplementado con 15 % de agua de coco, 0,1 mg.l⁻¹ de tiamina, 7,0 g.l⁻¹ de agar, 0,15 % de carbón activado y pH ajustado a 5,6; se evaluó la influencia de la sacarosa (0, 10, 20 y 40 %) en el incremento de la altura de las vitroplantas. Estas tenían una altura inicial que oscilaba entre 1 – 1,5 cm y fueron mantenidas en cultivo durante 60 días.

Los tubos de ensayos de 1,5 x 20 cm con 10 ml del medio de cultivo los cuales contenían una vitroplanta cada uno y en números de 15 por tratamiento se distribuyeron bajo un diseño

en bloque al azar. Al concluir el período de incubación de las vitroplantas, los resultados se procesaron estadísticamente mediante el test de Kruskal – Wallis y una prueba de comparación múltiple de media con una distribución libre.

3.5 Influencia del tipo de sustrato en la adaptación de *Encyclia phoenicea*

La parte experimental se realizó en la casa de vegetación del CDM. Se utilizaron vitroplantas de *Encyclia phoenicea* con una altura inicial entre 2,5 – 3,5 cm; 3 – 4 hojas y 3 – 4 raíces para evaluar la influencia que ejercen los sustratos: fibra de coco, zeolita, carbón vegetal, algarrobo y materia orgánica en la adaptación de las mismas.

Todos los sustratos se esterilizaron con formol al 1,0 %. La siembra se realizó en macetas plásticas con drenaje adecuado, en las que se sembraron 3,0 plantas por macetas y un total de 10 macetas por tratamientos. Se realizaron tres riegos diario durante las dos primeras semanas para mantener la humedad relativa alta, y posteriormente dos veces al día con riego por micro aspersion aérea.

Las evaluaciones de las supervivencias se realizaron a los 60 días de realizado el trasplante a condiciones *ex vitro*, y los datos fueron procesados a través de tablas de contingencia de 2 x 2 y R x C, utilizando como prueba de independencia la prueba G (Soakal y Rohla, 1995), empleando la tabla de X^2 para los niveles de significación de $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ y $P \leq 0.001$.

Las condiciones ambientales en la casa de adaptación fueron mantenidas en los rangos siguientes: humedad relativa entre un 60 - 90 %, temperatura entre los 27 y 31 °C y un 30 % de iluminación natural.

3.5.1 Influencia de las características morfológicas de las vitroplantas en la adaptación de *Encyclia phoenicea*

Para la realización de este experimento se establecieron escalas para tres variables diferentes con el objetivo de evaluar su influencia en la supervivencia de las vitroplantas durante el proceso de aclimatización en el que se utilizó fibras de coco como sustrato. Las variables que se tuvieron en cuenta fueron: longitud de las vitroplantas, número de hojas por plantas y número de raíces por plantas (tabla 3).

Tabla 3: Rangos de las variables que se tuvieron en cuenta para evaluar la influencia de estas en la supervivencia de las vitroplantas en la aclimatización

variables	Rangos
Longitud	0.5-1.5
Planta (cm)	1.5-2.0
	2.0-3.5
	>3.5
Número de hojas	1-2
	3-4
	>5
Número de raíces	1-2
	3-4
	>5

Antes de realizar la siembra se prepararon bandejas de poliespuma de 120 alvéolos que fueron previamente desinfectadas con una solución de fenol al 0,1 %. Las vitroplantas se regaron tres veces al día durante las dos primeras semanas para mantener la humedad relativa alta, similar a las condiciones *in vitro* y posteriormente dos veces al día con riego por micro aspersión aérea.

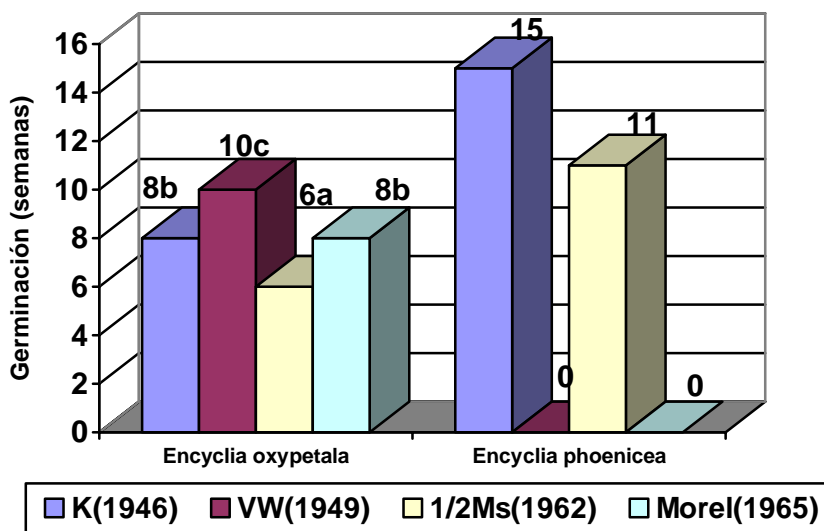
De igual forma que en el epígrafe anterior la evaluaciones donde se recogieron los niveles de supervivencias alcanzados se realizaron a los 60 días de encontrarse las plantas bajo condiciones *ex vitro*. El procesamiento estadístico de los resultados fue realizado similar al epígrafe anterior.

Las condiciones ambientales en la casa de adaptación fueron similares a las señaladas en el epígrafe 3.5.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de los medios de cultivo para la germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas

Los resultados alcanzados en la investigación demuestran el carácter heterogéneo de las respuestas de las orquídeas ante diferentes formulaciones de sales de medio de cultivo. Se aprecia que *Encyclia oxypetala* a pesar de que germinó en todas las sales probada, difieren estadísticamente las medias de los valores del tiempo expresado en semanas en que alcanza germinar. Por su parte *Encyclia phoenicea* fue más específica aún al tipo de sal ya que solo germinó en dos de las cuatro probadas. Es importante destacar que ninguna de las dos especies germinaron sin la adición de carbón activado al medio de cultivo (fig. 7).



Medias de *Encyclia oxypetala* con letras diferentes difieren estadísticamente para $p \leq 0,05$ del test de Duncan ($SE \pm 0,23$)

Las medias de *Encyclia phoenicea* difieren estadísticamente según *t*- student para $p \leq 0,05$

Fig.7: Influencia de las diferentes formulaciones de sales en el inicio de la germinación.

La adición al medio de cultivo de carbón activado es un método que ha sido empleado por una gran cantidad de autores (Thompson, 1980; Singh, 1993; George, 1996; Tisserat y Jones, 1999; Yang et al, 1999 y McKendrick, 2000) y se ha demostrado que influye positivamente en la germinación y el crecimiento de las orquídeas sobre todo de aquellas que son propensas a la fenolización.

Sin la presencia de carbón activado en el medio de cultivo la fenolización estuvo presente y limitó de forma total la germinación. En tanto *Encyclia phoenicea* se fenolizó en dos de los cuatro medio de cultivo que tenían carbón activado, lo cual afectó indudablemente la germinación de esta especie.

Tisserat y Jones (1999), coinciden en plantear que la exudación de fenoles fitotóxicos durante el cultivo de tejidos de orquídeas constituye un serio problema para su cultivo *in vitro*, y que la vía más efectiva para solucionar este problema es realizar cambios frecuentes al medio de cultivo y/o añadir carbón activado.

Arditti y Ernst (1993), plantearon qué entre las posibles explicaciones al efecto positivo que ejerce el carbón activado en el cultivo de tejidos de orquídeas se encuentra el aumento de la aireación del medio de cultivo. Una segunda razón es que absorbe el etileno el cual puede

inhibir el crecimiento y la diferenciación, y basado en el estudio de las características de absorción y cambios que se producen en el medio de cultivo durante el autoclaveado, el carbón activado absorbe el 5-hydroxymethylfurfural que se forma por la deshidratación de la sacarosa durante este proceso el cual es inhibidor del crecimiento así como productos fenólicos y carboxílico producidos por los tejidos. El carbón también puede absorber las hormonas vegetales y las vitaminas lo que explica porque en ocasiones puede ser inhibidor del crecimiento.

Las preferencias que muestran las especies por un medio de cultivo determinado tienen lugar debido a que varía bastante de un genotipo a otro las exigencias nutritivas, por eso muchas especies pueden proliferar muy bien en medios simple como el Knudson C(1946), pero otras como las pertenecientes al género *Cattleya* requieren de medios más complejos para la germinación (Singh, 1993).

Es importante destacar que las dos especies germinaron más temprano en ½ MS (1962) y que *Encyclia oxypetala* fue la más precoz al ocurrir la germinación de las semillas a las 6,0 semanas.

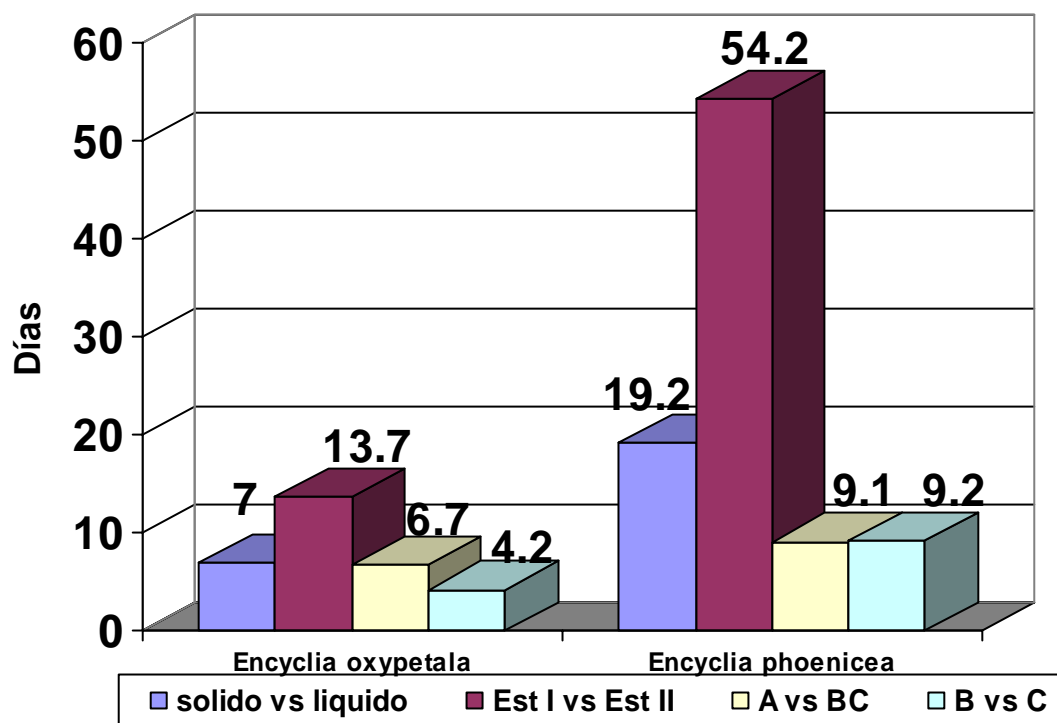
Las diferencias en las respuestas a la germinación teniendo en cuenta los factores analizados, también han tenido lugar en experimentos realizados con otras especies por Adelberg et al., (1997), George (1996) y McKendrick (2000), quienes plantean la gran

influencia que ejerce el genotipo en estos casos, lo que obliga a un estudio detallado para cada especie.

4.2 Influencia de los factores: tipos de sales, estado de madurez de las cápsulas, estado físico del medio de cultivo en la aceleración del proceso de germinación.

Las germinación de las semillas de las especies *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* representada en días se muestra en el Anexo 1. El análisis estadístico de estos resultados realizados mediante contrastes a Priori con el objetivo de conocer como influyen cada uno de los factores en la aceleración de la germinación de las semillas, puede observarse en los Anexos 2 y 3.

Para una mayor comprensión de los resultados se realizó un gráfico (fig. 8) donde se muestran las diferencias entre las medias de los nivel de cada factor. Al comparar el comportamiento del medio de cultivo líquido en agitador orbital (100 rpm) frente al medio de cultivo semisólido, los resultados muestran diferencias altamente significativas favorable al medio líquido para las dos especies evaluadas, con importantes reducciones del tiempo para la germinación que alcanza su mayor valor en *Encyclia phoenicea* con 54.2 días (Fig. 8)



A – Knudson C; (1946); B – Micro Knudson C (1946) y Macro ½ MS; C - ½ MS
 Est I: Cápsulas inmaduras, Est II: Cápsulas maduras

Fig.8: Cantidad de días en que se reduce el período para la germinación de las semillas de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*

Antiguamente para el cultivo de semillas de orquídeas solo se utilizaba medio de cultivo en estado semisólido. Singh y Prakash (1985), demostraron que el medio líquido es más efectivo para la germinación, proliferación y desarrollo en el cultivo *in vitro* de las orquídeas.

Se puso de manifiesto el efecto positivo del medio líquido en la germinación. La aceleración del proceso se logra porque intervienen factores físicos y químicos que propician condiciones favorables para la respiración, síntesis de proteínas, toma de nutrientes y

facilita la dilución de algunos inhibidores específicos o movimientos de productos creados en los procesos de crecimiento y diferenciación (Singh, 1993).

La respuesta de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* a la germinación utilizando cápsulas maduras e inmaduras brinda diferencias estadística altamente significativas que demuestran como los días que se requieren para la germinación de las semillas se reducen cuando se emplean cápsulas maduras, principalmente para *Encyclia phoenicea* que disminuye este periodo en más de tres veces.

A pesar de que algunos autores (Tsuchiya, 1954 y Prakash y Pierik, 1993) atribuyen algunas ventajas con el uso de cápsulas inmaduras para la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas, la respuesta a este proceso puede ser diferente según las especies con que se trabaje. En ocasiones es difícil seleccionar el momento óptimo para la recolección de las cápsulas ya que se debe garantizar que el embrión halla alcanzado un grado de diferenciación tal que le permita germinar.

La disminución del período para la micropropagación de las orquídeas constituye uno de los principales problemas del cultivo de esta familia de plantas, ya que se conoce que ellas crecen muy lento y que es frecuente que demoren varios años hasta que lleguen a producir flores (Thompson 1980). Es por ello que resulta importante haber alcanzado la disminución en 13.7 y 54.2 días del periodo de germinación de semillas para *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* respectivamente.

Raghavan y Torrey (1964) llegaron a la conclusión de que las diferentes respuestas de las semillas de orquídeas a la germinación *in vitro* dependen fundamentalmente de su estado de madurez cuando se cosecha la cápsula al comprobar que la habilidad para sintetizar la nitrato reductasa en *Cattleya* fue observada solamente en estados de desarrollo tardíos. Los mismos autores plantean que debido a la constitución hereditaria tan disímil en cada una de las especies, las diferencias en el metabolismo del nitrógeno especialmente en el de los aminoácidos durante el proceso de germinación puede ser determinante para las diferentes respuestas de las semillas de orquídeas en el medio.

Los contrastes realizados para la comparación de los tres medios de cultivo empleado en la investigación mostraron que para las dos especies las diferencias son altamente significativas favorables a la utilización de las sales $\frac{1}{2}$ MS en el medio de cultivo. Aunque los tres medios evaluados han sido utilizados indistintamente para la germinación *in vitro* de semillas de otras especies de orquídeas, la aceleración en la germinación depende en buena medida de las preferencias por las fuentes apropiadas de nitrógeno, cosa esta que varía en especies de un mismo género (Arditti, 1995).

Mitra (1987), plantea que el nitrato de amonio es la mejor fuente de nitrógeno para garantizar el crecimiento y desarrollo de un gran número de especies de orquídeas y que las sales de amonio promueven el crecimiento y la formación de protocormos durante la

germinación. Después que las raíces y hojas se forman, las plántulas prefiere nitrato para continuar creciendo.

Aunque el medio MS (1962) fue desarrollado inicialmente para uso del cultivo de tejido del tabaco, el mismo ha sido muy efectivo como sustrato nutritivo para muchas especies de orquídeas. Este presenta altos niveles de nitrógeno y potasio, en concentraciones superiores a los restantes medios utilizados además de ser el único de ellos en aportar nitrógeno en forma de nitrato de amonio, por lo que los resultados obtenidos coinciden con los autores ya señalados.

Adelberg et al. (1997), compraron tres disoluciones de las sales MS (1962) y tres sales de medios de cultivo específico para orquídeas en la germinación y proliferación de *Cattleya*, y las respuestas de las tres variantes de MS fue superior que las restantes formulaciones.

4.2.1 Influencia del pH en la aceleración de la germinación

Los resultados obtenidos en el estudio revelan que a valores de pH 5,0 y 5,6 hubo respuestas similares en la germinación de las especies evaluadas, sin diferencias estadísticas significativas. Las diferencias en el tiempo para la germinación entre las especies coinciden con los resultados de los experimentos anteriores.

Disímiles son las referencias que ilustran resultados sobre valores de pH empleados en la germinación de orquídeas. Kano (1965), reveló que el mejor pH para la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas oscilaba entre 4,8 y 5,2. Más recientemente Mckendrick (2000), en estudios sobre la germinación *in vitro* de orquídeas pertenecientes a la Reserva Orquideológica El Pahuma, encontró que la mayoría de las especies germinan a pH de 5,5. Sin embargo, refiere el propio autor que las especies andinas prefieren niveles más altos de pH (5,6 – 5,9).

A valores muy bajos de pH el embrión muere, pero el punto crítico de este rango en el que el embrión muere difiere entre géneros y especies de orquídeas. La muerte es probablemente debido al incremento en la disponibilidad de elementos menores como hierro o manganeso y en parte a la falta de absorción del calcio. Por otra parte cuando la solución es menos ácida (pH>6), estos microelementos precipitan y no son utilizados por el embrión. Por tanto el efecto del pH en el medio de cultivo afecta indirectamente a la germinación de semillas de orquídeas a través de la disponibilidad de hierro, manganeso y otras sustancias en la solución, y si estas pueden mantenerse disponible, la germinación y el crecimiento de las orquídeas pueden ser buenos tanto a pH 5 como a pH 6 (Knudson, 1952).

Withner (1959), planteó sobre el problema del pH en el medio de cultivo para orquídeas que “excepto por el efecto del pH en la disponibilidad de macro y micro elementos que tienden a precipitar como complejos insolubles, este no parece tener un efecto bien definido en el crecimiento”. En estudios sobre problemas de pH en soluciones nutritivas, el propio autor

sugiere el empleo de formas de complejos o quelatos del ion metálico como fuente disponible de nutrientes que no es influenciado fácilmente por la acidez de la solución.

4.3 Efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación de protocormos

Los resultados mostrados en la tabla 4 reafirman todas las bondades referidas en experimentos anteriores sobre el empleo del medio líquido, puestas de manifiesto también para la multiplicación de los protocormos.

Tabla 4: Comparación de dos métodos de cultivo en la multiplicación in vitro de protocormos de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*

Especies	Días	<u>Medias del número de protocormos</u> ^a	
		Cultivo Líquido	Cultivo semisólido
<i>Encyclia phoenicea</i>	0	50 (1.0)	50 (1.0)
	10	115 (2.30±0.6)	96 (1.92±0.6) * ^a
	20	297 (5.94±0.73)	217 (4.34±0.73) *
	30	511 (10.22±0.55)	341 (6.82±0.55) *

<i>Encyclia oxypetala</i>	0	50 (1.0)	50 (1.0)
	10	98 (1.96±0.63)	83 (1.66±0.63)*
	20	220 (4.4±0.67)	177 (3.54±0.67)*
	30	437 (8.74±0.59)	336 (6.72±0.59)*

* las medias comparadas por LSD (Steel and Torrie 1980) poseen diferencias significativas para 0.05 nivel de probabilidad.

^a los números dentro del paréntesis representan el coeficiente de multiplicación ± SE. El coeficiente de multiplicación es resultado de la división del número total de protocormos entre el valor inicial de 50.

En todos los períodos evaluados y para las dos especies en estudios el cultivo líquido superó estadísticamente al cultivo semisólido. Sobresalen los resultados en *Encyclia phoenicea* que multiplicó 10 veces el número de protocormos a los 30 días de cultivo en medio líquido. En la fig. 9 se muestra la multiplicación de los protocormos en ambos métodos de cultivo.

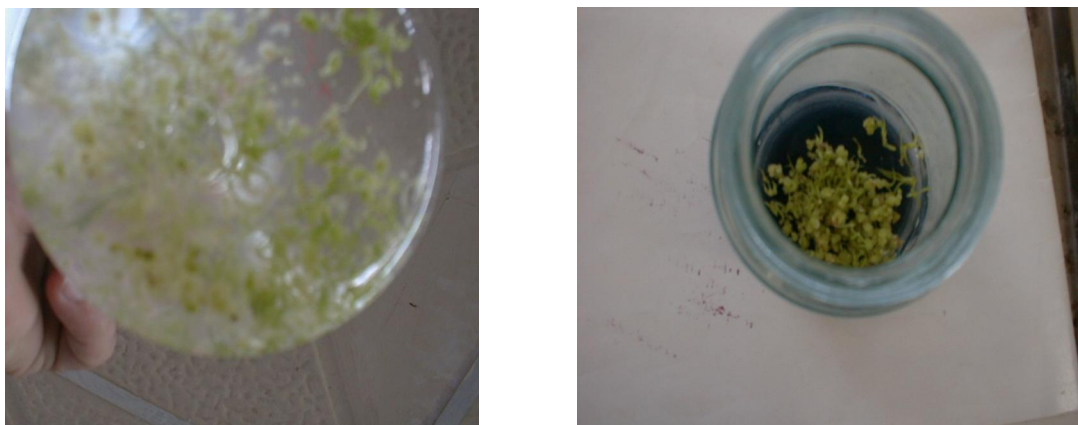


Fig.9: Multiplicación de protocormos. Izquierda: medio de cultivo líquido. Derecha: medio de cultivo semisólido

La continuidad del proceso de germinación desde la formación del protocormo hasta la obtención de una vitroplanta se muestra en la Fig. 10.

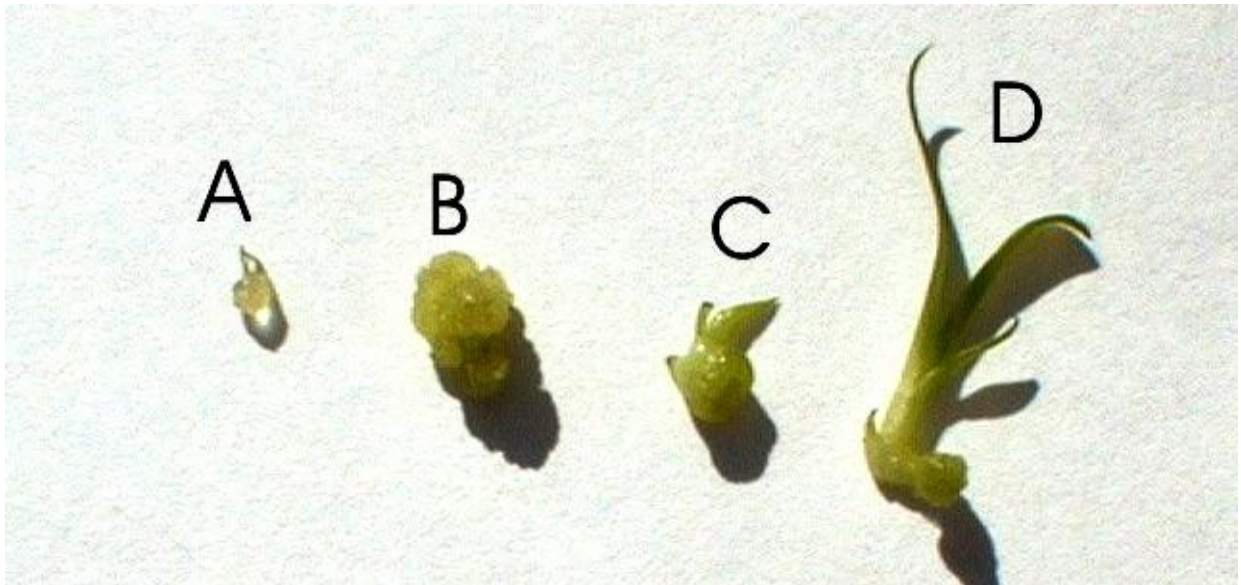


Fig.10: Proceso de micropropagación de orquídeas. A: formación de protocormo a partir de la semilla. B: formación de protocormos secundario. C: diferenciación del protocormo. D: crecimiento de la vitroplanta.

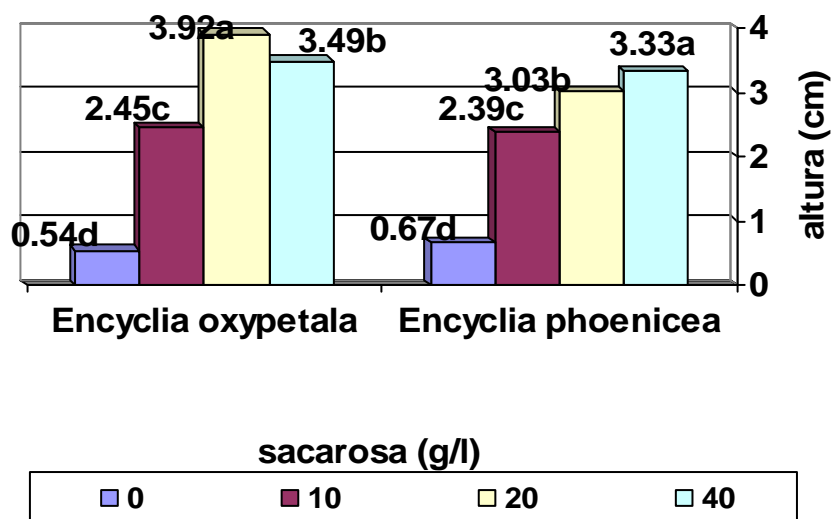
En estudios relacionados con el uso del medio líquido Singh y Prakash (1985), mostraron la efectividad de esta forma de cultivo en la proliferación y desarrollo de orquídeas, atribuido fundamentalmente al incremento del área de superficie lo que permite mayor toma de nutriente y por tanto mejor crecimiento. Además debido a la agitación constante a que es sometido el cultivo, aumenta la aireación del medio y favorece las condiciones para la respiración y síntesis de proteínas.

Yang et al. (1999), compararon el cultivo líquido versus cultivo semisólido en la

multiplicación de protocormos de *Cymbidium* a los 3, 5, 7, 10 y 30 días. En todos los casos el coeficiente de multiplicación fue significativamente superior en el cultivo líquido.

4.4 Influencia de la sacarosa en el crecimiento de las vitroplantas

El incremento de la altura de las vitroplantas bajo la influencia de las dosis de sacarosa se muestra en la fig. 11, en la cual se observa una tendencia a aumentar proporcionalmente con las concentraciones en *Encyclia phoenicea* mientras que en *Encyclia oxypetala* el ritmo de crecimiento disminuye cuando se emplea 40 g.l⁻¹.



Letras distintas difieren estadísticamente para $p \leq 0,01$ según el test de Kruskal-Wallis y una prueba de comparación múltiple de medias de rangos con una distribución libre

Fig. 11 Influencia de la sacarosa en el crecimiento de las vitroplantas

Se puede apreciar que *Encyclia oxypetala* mantiene un incremento proporcional con la altura y las concentración de sacarosa hasta 20 g.l⁻¹, y que la diferencia estadística es altamente significativa. Superior a 20 g.l⁻¹ disminuye el crecimiento en comparación con este valor,

por lo que esta dosis es la indicada para estimular el crecimiento de esta especie, coincidiendo con algunos de los autores que recomiendan 2 % de sacarosa para la micropropagación de orquídeas (Arditti, 1992; Hew y Yong, 1997 y Alvarado, 2001).

El incremento de la altura que muestra *Encyclia oxypetala* (3,92 cm) en tan solo 60 días de cultivo explica que no requiere de mayor período de tiempo para pasar a condiciones *ex vitro*. Mientras que los 3,03 cm que incrementó *Encyclia phoenicea* en el mismo período indica que esta especie necesita de mayor tiempo en el cultivo *in vitro* para alcanzar condiciones propicias para la aclimatización o requiere de concentraciones de sacarosa superior a las evaluadas, ya que con 40 g.l⁻¹, la mayor concentración probada, esta especie continuó aumentando su crecimiento.

Es posible que la concentración de 40 g.l⁻¹ no sea el límite para estimular el mayor crecimiento de *Enc. phoenicea*, hecho que requiere ser demostrado por un experimento donde se evalúen concentraciones superiores.

Kano (1965), encontró que las concentraciones óptimas de sacarosa para el crecimiento de tallos y raíces fue diferente en *Brassolaeliocattleya* y *Dendrobium* al favorecer la altura de las plantas con 2 y 4 % respectivamente, en ambos casos las concentraciones de 4 y 8 % favorecieron el enraizamiento. Arditti (1992), refiere que el uso más común de la sacarosa en el cultivo *in vitro* de orquídeas es en concentraciones de 2 %.

No obstante, las necesidades por la sacarosa en el medio de cultivo se ha demostrado que son muy variables, ya que según Jiménez (1995), las plantas procedentes de los medios con mayores concentraciones de sacarosa presentan una mayor supervivencia de adaptación al ser trasplantadas al suelo, tal vez debido a una mayor adaptación para soportar el estrés hídrico, motivado por las condiciones de mayor presión osmótica, donde se desarrollan, unido a una mayor constitución morfológica de las vitroplantas. En cultivos de caña de azúcar y papa, con altas concentraciones de sacarosa de 5-9 %, 4-8 % respectivamente se han obtenido abundante enraizamiento. Sin embargo, existen especies que responden mejor al crecimiento en el cultivo *in vitro* con bajas concentraciones de sacarosa y otras en ausencia de la misma como es el caso de *Cymbidium* (Kano, 1965).

4.5 Influencia del tipo de sustrato en la adaptación de *Encyclia phoenicea*

Es preciso señalar que no se han encontrado referencias de trabajos precedentes similares a este, tanto a escala nacional como internacional por lo cual constituyen resultados que solo pueden ser discutidos en función de los diferentes tratamientos realizados. Se evidencia en la tabla 5 que la fibra de coco fue el mejor sustrato al evaluar la supervivencia, mostrando un 99 % superando a los demás sustratos evaluados. La Zeolita aunque con diferencias estadísticas significativas respecto a la fibra de coco, alcanzó un valor de supervivencia muy bueno.

Tabla 5. Comportamiento de la supervivencia expresada en porcentaje, tomando como criterio el sustrato.

Sustratos	<i>Encyclea phoenicea</i> Supervivencia (%)
Fibra coco	97 (1)
Carbón vegetal	83 (3)
Algarrobo	63 (5)
Zeolita	94 (2)
M. Orgánica	78 (4)
Significación	***

Pérez (1998), planteó que en la adaptación de vitroplantas se pueden utilizar residuos de plantas, y entre los más utilizados están las fibras procedentes de corteza de árboles (pinos, fibras de coco, aserrín, etc.). Por su parte la fibra de coco ha sido reportada por Roca (1991) y Nogueira (2001) como un sustrato de excelentes condiciones para la adaptación de vitroplantas de un gran número de cultivo. Las conveniencias para la aclimatización con el empleo de fibra de coco puede observarse en la fig. 12.



Fig12: Características de la fibra de coco utilizada como sustrato en la adaptación

Según Nogueira (2001), la fibra de coco es el sustrato que posee las características físicas y químicas (Anexo 4) más cercana al sustrato ideal y que le confiere condiciones favorables para la utilización del mismo en el cultivo de muchas plantas.

4.5.1 Influencia de las características morfológicas de las vitroplantas en la adaptación de *Encyclia phoenicea*

En *Encyclia phoenicea* se evidencia una dependencia de la supervivencia con la longitud de la planta (tabla 7). Se demostró que cuando en esta especie se utiliza un sustrato como el de fibras de coco, se logran altos porcentajes de supervivencia independientemente del rango de las diferentes variables analizadas. La supervivencia de las plantas fue independiente tanto del número de raíces como de hojas, no existiendo diferencias significativas en los diferentes niveles de las escalas utilizadas.

Tabla 7: Influencia de los diferentes rangos de longitud de las vitroplantas en la supervivencia

Variable	Rangos	<i>Encyclea phoenicea</i> Supervivencia (%)
Longitud de la Planta (cm)	0.5-1.5	81
	1.5-2.0	78
	2.0-3.5	85
	>3.5	94
Significación ($P \leq 0,05$)		*

De modo general se evidenció que a medida que aumentaban los rangos en las tres variables, los valores de los porcentaje de supervivencia también se elevaron, aunque sin alcanzar a diferenciarse estadísticamente, por lo que los bajos niveles de las variables no influyeron en la respuesta a la adaptación presentando valores muy similares indistintamente del número de hojas y raíces. La razón por la cual los resultados no mostraron diferencias significativas a pesar de evaluar variables con rangos diferentes, se le atribuyen al efecto favorable del sustrato (fibra de coco) en la adaptación de las vitroplantas (fig.13), y por otra parte a que las condiciones ambientales en la casa de cultivo fueron propicias para el buen mantenimiento de las plantas.

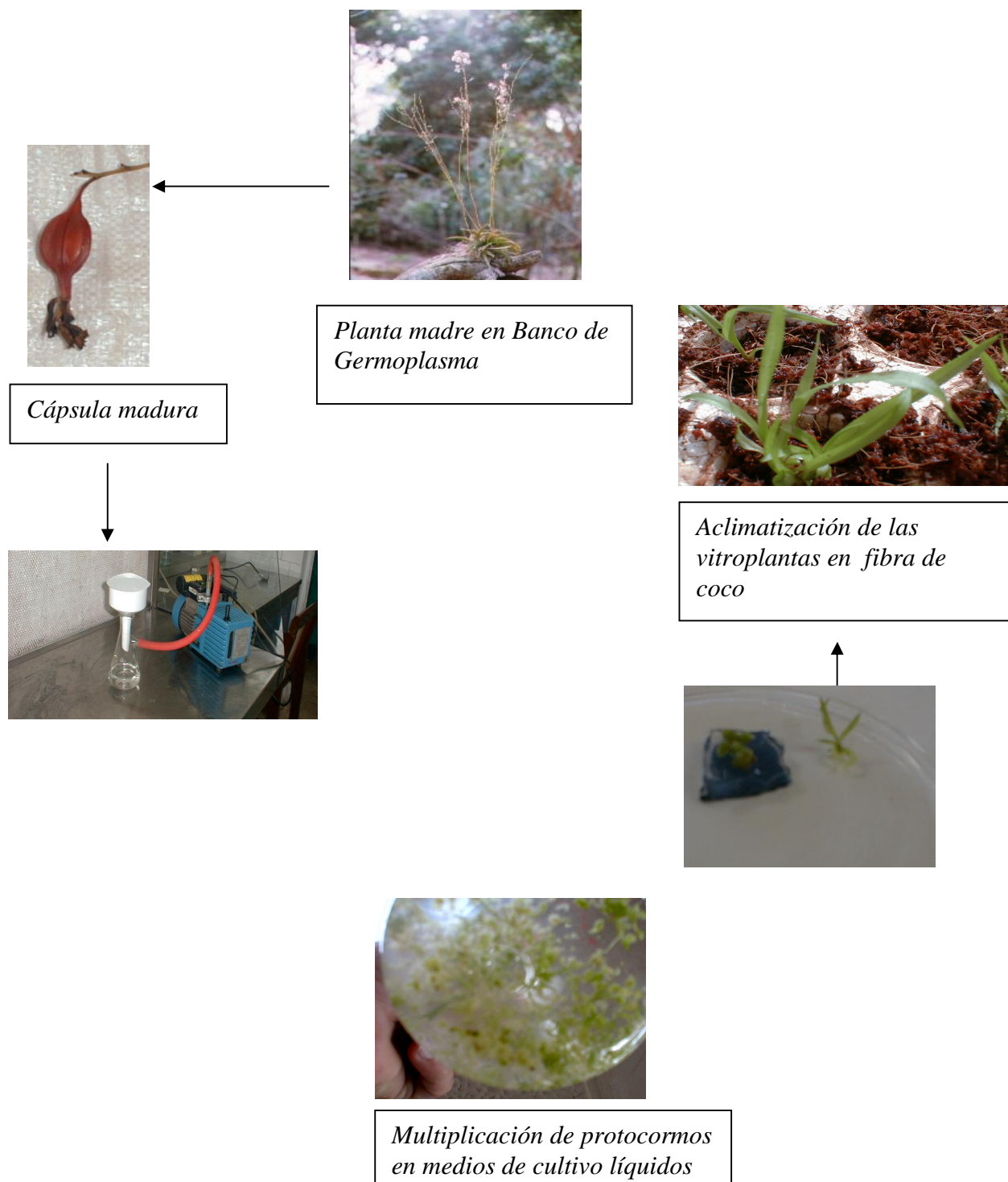


Fig 13: Respuesta de las vitroplantas al proceso de aclimatización con el empleo de fibra de coco

La fibra de coco presenta buena capacidad de retención de humedad, estabilización del pH y es fácil de manejar, por lo que se destina a diversos usos como cultivos ornamentales, hortícolas, frutales, semilleros, jardinería, viveros de plantas forestales, producción de

esquejes, entre otros. La creciente demanda por este material está respaldada además de sus características químicas y físicas, por ser un material orgánico que soporta hasta diez años de uso y no contamina al medio ambiente (Anónimo, 2000).

Tomando en consideración los resultado alcanzados en el presente trabajo se propone el siguiente esquema para la micropropagación de las especies *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* el cual se muestra en la fig. 14.



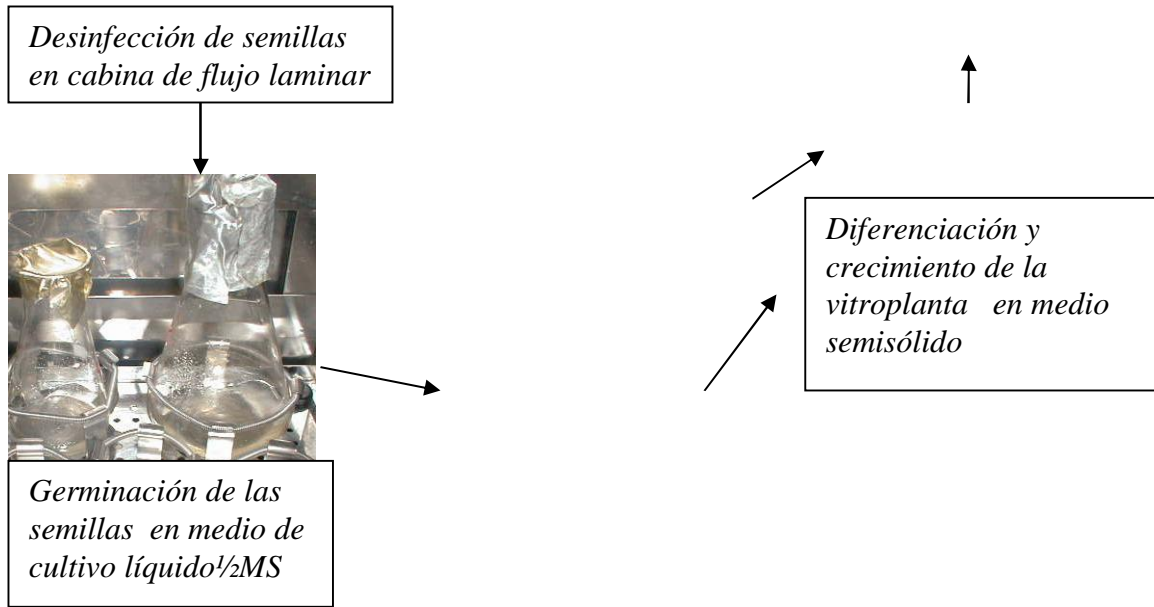


Fig.14: Esquema de micropropagación para *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*

5. CONCLUSIONES

Después de analizar los resultados expuestos en las investigaciones realizadas con las especies de orquídeas silvestres *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* se plantean las siguientes conclusiones:

1. Se logró iniciar la germinación *in vitro* de las semillas en mas corto tiempo con las sales $1/2 MS$ (1962) suplementadas con carbón activado al 0,15 % para las dos especies de orquídeas estudiadas.
2. Al emplear medio de cultivo en estado líquido, cápsulas maduras y sales $1/2 MS$ permitió acelerar el proceso de germinación *in vitro* de *Encyclia oxypetala* y

Encyclia phoenicea.

3. Se alcanzó una mayor multiplicación de los protocormos de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*. con el empleo de medio de cultivo en estado líquido en agitación.
4. Con la concentración de 20 g.l⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al incremento en la altura para *Encyclia oxypetala*, mientras que para *Encyclia phoenicea* el mayor incremento se alcanzó con 40 g.l⁻¹.
5. La fibras de coco resultó ser el sustrato más idóneo en la adaptación de *Encyclea phoenicea* alcanzado valores de supervivencia del 99 % y como alternativa se puede emplear la zeolita.
6. Los mayores valores de supervivencia de las vitroplantas de *Encyclia phoenicea* se lograron al emplear vitroplantas con una longitud superior a 3,5 cm. Mientras que esta valor fue independiente tanto del número de raíces como de hojas.

6. RECOMENDACIONES

1. Emplear el esquema propuesto en el presente trabajo para la micropropagación de las especies de orquídea silvestres *Encyclia phoenicea* y *Encyclia oxypetala*.
2. Continuar los estudios de las concentraciones de sacarosa superiores a 40 g.l⁻¹ para la especie *Encyclia phoenicea*.

3. Evaluar el comportamiento hasta la floración de las vitroplantas obtenida de ambas especies en condiciones de invernadero y/o naturales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adelberg, J. W; Desamero, N.V; Hale,S. A; Young, R.E. (1997) Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. Department of Horticulture, Clemson University, Clemson, SC 29634, USA. *Plant-Cell,-Tissue-and-Organ-Culture*. 48: 1, 1-7
- Agramonte, D. P., Jiménez F. T. y Dita M. R (1998) Aclimatización. En: Pérez J.N Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. IBP. Santa Clara.
- Alvarado, K; Telles, E; Vallés, R; Rodríguez, L y Cala, M (2001) Efecto de tres concentraciones de sacarosa en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de Ruda (*Ruta graveolens*). Informe final de proyecto territorial –055. Guantánamo.
- Anónimo (2000) Para cosecha de primera calidad. La fibra de coco como sustrato. Horticultura 146 Julio 2000
- Arditti, J. (1979) Aspects of the physiology of orchids. In: Woohouse (ed.). advances in Botanical Research, Vol. 7, pp. 422-638 Academic Press, New York
- Arditti, J. y Ernst, R. (1993) Micropropagation of Orchids. John Wiley-Sons, INC. New York.
- Calderon, B.; Baltierra, X.; Le-Feubre, R.; Lopez, I.; Jofré, M. y Matthei, E. (2001) Enraizamiento *in vitro* de orquídeas Chilena. IV Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 2001. Brasil.
- Chute, A. L. y Toothaker, S. R (1996) Proteins expressed in orchid protocorms upon transfer from suspension to stationary culture. Department of Biology, Bowdoin College, Brunswick, *Plant-Physiol* 111, 2, Suppl.,142

- Daquinta, M. G (2001) Comunicación personal. Centro de Bioplanta. Ciego de Ávila.
- Davidonis, G., Knorr, D.W. y Romagnoli, L.G (1997) Increasing the amount of vanillin produced by *Vanilla planifolia* orchid callus Univ. Delaware Newark, DE, USA.
- Deberg, P. C. y Read P. E (1991) Micropropagation. En: Micropropagation: Technology and Application. Deberg, P. C. y Zimmerman, R. H. (Eds)- Kluwer Academic Publishers p. 1-13
- De la Cruz, G.; Temo, D.; Veitia, E. y González, J (1999) Efecto del fertilizante FERMAG en el proceso de endurecimiento *in vitro* de *Oncidium luridum*.
- Denng, R. y Donnelly, D. J (1993) In vitro hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. Can. J. Plant Sci. 73: 1105-1113.
- Díaz, M. A (1988) Las orquídeas nativas de Cuba. La Habana: Cient. Técnica. 63 p.
- Feldmann, P., Sapotille J., Grédoire P. y P. Rott (1994) Micropropagation of sugarcane. En : In vitro culture of tropical plants. Ed. by Claude Teisson. CIRAD. p. 23-25
- George, E.F (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 2.
- George, E. F. (1996) Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd. Edington, Wilts. England. Second Edition pp. 575-1361
- George, E. F. y Sherrington, P.D (1984) Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd; Basingtoke, England.
- George, P. S y Ravishankar (1997) In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. Culture medium optimisation. Plant-Cell-Rep 16, 7, 490-94

- Goh, C. J. (1989) Orchids – Monopodials. In: Ammirato P. V., Evans, D. A., Sharp W. R. and Bajaj V. P. S. (eds), Handbook of Plant Cell Culture. V. Ornamental Species, pp 598-603, McGraw Hill., New York.
- Hew C. S. y Yong J. W. H (1997) The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry. World Scientific. National University of Singapore. 331 pp
- Hu, C. V. y Huang J. (1983) Meristem, shoot tip and bud culture. En: Handbook of Plant Cell. Ed By Evans, D. A.; Ammirato, P. V.; Yameda, Y. p 256-290
- Ichihashi, S; Hiraiwa, H. (1996) Effect of solidifier, coconut water, and carbohydrate source on growth of embryogenic callus in Phalaenopsis and allied genera. Department of Life Sciences, Aichi University of Education, Hirosawa, Igaya-cho, Japan. Orchid-Society-of-India, 10: 1-2, 81-88
- Jimenez, E. (1998) Cultivo de Apices y Meristemas. En: Pérez J.N Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. IBP. Santa Clara.
- Jonhson, B. B (1978) HortScience 13: 596
- Kano, K. (1965) Memoirs of faculty of Agriculture Kagawa University. Studies on the medio for Orchid Seed Germination. Mikityo, Kagawa, Japan.
- Kishi, F. y Takagi, K (1997) Efficient method for the preservation and regeneration of orchid protocorm-like bodies Sci.Hortic.(Amsterdam) 68 1-4, 149-56
- Kitto, S. L. y Yong, M. J (1981) HortScience 16: 305-306
- Knudson, L. (1946) A New Nutrient Solution for Germination of Orchid Seeds. Ibid. 15: 214-217

- Knudson, L. (1952) Nutrient Solution for Germination of Orchid Seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 21: 94-96
- Male, J.C (1992) Biological effects of magnetic fields: A possible mechanism, p. 87-89
- Malemnganba, H., Ray, B.K., Bhattacharyya, S. y Deka, P.C (1996) Regeneration of encapsulated protocorms of *Phaius tankervilleae* stored at low temperature. Department of Agricultural Biotechnology, Assam Agricultural University, Indian. J. Exp. Biol 34, 8, 802-05
- Mckendrick, S. (2000) Manual para la Germinación *in vitro* de Orquídeas. Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito.
- Mitra, G. C. (1987) some aspects of asymbiotic nutrition of orchid embryos. J. Orch. Soc. Ind., 1: 91-108
- Morel, G. (1965) A new means of clonal propagation of orchids. Amer. Orch. Soc. Bull., 473 – 477
- Murashige, T. y Skoog, F. S. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiology. 15. p. 173-197
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Pl. Physiol., 25: 135-165
- Nogueira V. (2001) Comunicación personal. Baracoa.
- Orellana, P (1995) Tecnología para la micropropagación de clones de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. IBP-Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

- Orellana, P (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez J.N Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. IBP. Santa Clara.
- Ortega, E. y Roder R (1986) Manual de prácticas de laboratorio de fisiología vegetal. Ed. Pueblo y Educación. Universidad de La Habana, Fac. de Biología, Dep. de Fisiología Vegetal, Ciudad de La Habana, Cuba.
- Pérez J.N (1998) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. IBP. Santa Clara.
- Pierik, R. L. M. (1994) Biotecnología Vegetal como herramienta en la Horticultura Ornamental. Chapingo. 1 (1): 45-57
- Pierik, R. L. M., Sprenkels, B., Vander Harst and Vander Meyes, Q. G. (1988) Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolares* Pfizt. In vitro. *Scientia Hortic.*, 34: 139-153.
- Prakash, D. y Pierik, R. L. M. (1993) Plant Biotechnology and Problems. Science Publishers, Inc. Lebanon, USA. 289 pp
- Raghavan, V. y Torrey J. G. (1964) Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. Amer. Jour. Bot. 51: 264-274
- Read, P. E (1997) *Platanthera praeclara*; a threatened temperate prairie orchid species. In Vitro Biology Congress, Society for In Vitro Biology 1997 Meeting, Washington, DC, 14-18 June.
- Roca W. M (1991) Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT.
- Saugwan – Norreel, B., Dubois F., Flandre F., Paul H. y Sangwuan R (1991) In vitro culture

- and plant improvement. *Acta Horticulturae*, 289. plant Biotechnology.
- Singh, F. (1993) *In Vitro* Orchid Seed Germination and Cloning of Orchids. In: Plant Biotechnology. Science publishers, Inc. Lebanon, USA. 289 p.
- Singh, F. y Prakash, D. (1984) *In vitro* propagation of *Thunia alba* (Wall.) Reichb. F. through flower stalk cuttings. *Scientia Hort.*, 24: 385-390
- Singh, F. y Prakash, D. (1985) Suspension culture technique for the culture of orchid embryos. *Garten bau wissen Schaft* 50: 236-238
- Singh, F. y Prakash, D. (1990) Chromosomal instability in callus cultures of *Cymbidium aloifolium*. XXII Int. Hort. Cong. Italy. Abst. No. 1342
- Steele R.G.D. y Torrie J. H. (1980) Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Co, New York, pp 495-520
- Stewart, J. (1989) Orchid propagation and tissue culture techniques. Past, Present and Future. In: Pritchard, H. W. (ed.), *Modern Methods in Orchid Conservation*, pp. 87-101, Cambridge Univ. Press, U.K.
- Tai, K. S. (1996) Preliminary studies on the fruit setting of orchid. Department of Plant Industry, National Pingtung Polytechnic Institute, Taiwan. *Bulletin-of-National-Pingtung-Polytechnic-Institute*. 5: 3, 7-13
- Tanaka, M. y Sakanishi, Y. (1980) Clonal propagation of *Phalaenopsis* through tissue culture. *Proc. IX World Orchid Conf.* pp. 215-221
- Thompson, P. A. (1974) Growing orchids from seed. *Roy. Hort. Soc.* 99

- Thompson, P. A. (1980) Orchids from Seed. Royal Botanic Gardens New Wakehurst place.
30 p.
- Thomale, H (1954) Die Orchideen. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Tisserat B. y Jones D (1999) Clonal propagation of Orchids. In: Plant Cell Culture Protocols.
Hall R. D. CPRO – DLO Wageningen, The Netherlands p 127 - 134
- Tsuchiva, I. (1954) Germination of orchid seeds from premature pods. Na Pua Okika o
Hawaii Nei. 4: 130-134
- Vacin, E. y Went F. (1949) Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz., 110: 605 –
613
- Vázquez, B. E. y Torres, G. S (1981) Fisiología Vegetal. Crecimiento y Desarrollo, p. 317-
362. Ed. Pueblo y educación. Ciudad de la Habana.
- Villalobos, V. N. (1990) Historia del Cultivo de Tejido Vegetal. En: Rossel y J. N. Villalobos.
(Ed) Fundamentos Teóricos – Prácticos del Cultivo de Tejido Vegetales. pp 1-3
FAO. Roma
- Villalobos, A. y García, V. A. (1982) Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*)
libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos, Agrociencia.
48: 107-118
- Wannakrairoj, S; Tanyasonti, P. (1996) Micronutrient and pH requirements for
micropropagation of monopodial orchids. Laboratory for Plant Variety Development,
Department of Horticulture, Kasetsart University, Nakhonpathom 731 40, Thailand.
Journal-of-the-Orchid-Society-of-India. 10: 1-2, 13-17

- Weber, S. (1997) Going native. Bluestem Farm, S5920 Lehman Road, Baraboo, Wisconsin 53913, USA. *Orchids* 66: 5, 478-483
- Withner, C. L. (1959) Orchid Physiology. *The Orchids*. (ed. Withner, C. L.), New York.
- Yang, J.; Lee, H. J.; Shin, D. H.; Oh, S. K.; Seon, J. H.; Paek, K. Y. y Han, K. H. (1999) Genetic tranformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. Plant Cell Reports 18: 978-984
- Zar, J. (1974) Biostatistical analysis, Prentice Hall, Londres.
- Ziv, M (1995) In vitro acclimatization. En: Aiken-Cristie, Kosai, T. y Lila Smith, M. (Eds), *Automatization and enviromental control in plant tissue culture*, pp 493-516. Netherlands Klumer Publisher.

8. ANEXOS

Anexo 1: Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* expresada en días

Estado Físico	Especies	Estado I			Estado II		
		A	B	C	A	B	C
Semisólido	<i>Encyclia</i>	50	44	41	34	29	23
	<i>Oxypetala</i>						
Líquido	<i>Encyclia</i>	105	96	78	26	26	22
	<i>phoenicea</i>						
Líquido	<i>Encyclia</i>	39	34	33	28	26	19
	<i>Oxypetala</i>						
Líquido	<i>Encyclia</i>	66	61	53	24	20	14
	<i>phoenicea</i>						

Leyenda

A – Knudson C (1946)

B – Macro Knudson C (1946) y Micro ½ MS

C - ½ MS

Anexo 2: Contrastes polinomiales para la comparación entre los niveles de los factores evaluados en la germinación de *Encyclia oxypetala*.

Comparación	Contraste	Significación
Sólido vs Líquido	36,8 vs 29,8	**

Estado I vs Estado II	40,2 vs 26,5	**
A vs B,C	37,8 vs 31,1	**
B vs C	33,2 vs 29,0	**

SE ± 0,15

Anexo 3: Contrastes polinomiales para la comparación entre los niveles de los factores evaluados en la germinación de *Encyclia phoenicea*.

Comparación	Contraste	Significación
Sólido vs Líquido	58,9 vs 39,7	**
Estado I vs Estado II	76,4 vs 22,2	**
A vs B,C	55,4 vs 46,3	**
B vs C	50,9 vs 41,7	**

SE ± 0,14

Anexo 4: Características físico química de la fibra de coco

Propiedad	Valores	Sustrato ideal
-----------	---------	----------------

Denc. Ap (g/cm ³)	0.056	< 0.4
P. total (% vol)	96.3	> 85
Aereac (g/vol)	48.8	20 –30
Agua disponib (g/vol)	19.2	20 –30
Agua reserva (g/vol)	3.7	4 –10
Cap. Ret. Agua (g/vol)	491	600 – 1000
PH	4.9	5.2 – 6.3
CE	1.7	0.75 – 1.99
CCC (me/100g)	117	> 20
Rel C/N	98	20 –40
N-NO ₃	no	40 –199
P	no	3 –10
K	269	60 – 249
Ca	26	80- 200
Mg	12	30 -70
