

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

La familia de las orquídeas es el grupo más diverso y extenso de plantas con flor que existe sobre el planeta. La diversidad en tamaño, forma y colores, especialmente de sus flores, las convierte en un atractivo como plantas ornamentales, aunque también se han utilizado como comestibles, aromatizantes y medicinales.

Ecuador es reconocido por poseer una gran diversidad de orquídeas, sin embargo, muchas de las especies que existen en su territorio (al igual que sucede en otras partes del mundo) están en peligro de extinción. La deforestación ha provocado serios daños especialmente en las poblaciones de orquídeas epífitas, las cuales, al ser tan especializadas en su ecología, se ven seriamente afectadas por los cambios ambientales.

Además de lo anterior, las orquídeas, aunque producen millones de semillas, poseen bajos porcentajes de germinación en condiciones naturales, ya que el endospermo que rodea el embrión es muy reducido o no existe; para ello, las orquídeas han desarrollado relaciones simbióticas con hongos que digieren la materia orgánica y transfieren los carbohidratos al embrión (Arditti, 1993).

El gran valor comercial que poseen ciertas especies de orquídeas ha determinado el saqueo indiscriminado de individuos silvestres, y a la vez la

falta de conocimientos en el cultivo de estas plantas ha sido causa de grandes pérdidas de material valioso, con la consecuente erosión genética.

El género *Epidendrum* sp., según White (1996), está compuesto por epifitas, endémicas de América tropical. Su hábitat se extiende desde la península de la Florida hasta el Norte de Argentina. Su tallo puede llegar a medir hasta 2m de altura y sus flores perfumadas, aparecen en el extremo del tallo cubierto de hojas y duran varios meses, sus colores son el blanco, verde, amarillo, rojo y fucsia; sus inflorescencias llevan docenas de flores diminutas, pero muy elaboradas.

La especie *Epidendrum* sp. en Ecuador, es conocida comúnmente como “mayitas”; esta flor es utilizada en medicina tradicional para malestares febriles y molestias de riñón, es una de las especies en peligro de extinción actualmente. La urbanización, la extracción de individuos silvestres de los bosques y el mal manejo que se le ha dado por parte de aquellos que poseen ejemplares, ha determinado esta realidad.

El cultivo *in vitro* se perfila como una serie de técnicas alternativas para la reproducción de orquídeas bajo condiciones asépticas controladas. La propagación masiva *in vitro* de orquídeas, ya sea por medio de semillas o tejidos, produce altos niveles de multiplicación en períodos de tiempo cortos, además asegura la sanidad del material en multiplicación. Por lo tanto, el cultivo *in vitro* se perfila como una respuesta alternativa para el problema de las especies en peligro de extinción y en el mantenimiento de híbridos de gran valor.

Conociendo esta realidad el presente trabajo tuvo la finalidad de contribuir con un aporte investigativo y científico cuyo propósito fue medir el efecto del ácido naftaelenacético (ANA) y 6-Bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo

de segmentos nodales de la orquídea *Epidendrum* sp., bajo condiciones de laboratorio, *in vitro*.

1.2 OBJETIVOS:

1.2.1 General

Determinar el efecto de dos fitohormonas en la fase de introducción de la orquídea *Epidendrum* sp., bajo condiciones *in vitro*.

1.2.2 Específicos

- Determinar un Protocolo de desinfección efectivo para segmentos nodales de *Epidendrum* sp. utilizando compuestos químicos fácilmente disponibles y económicamente accesibles.
- Establecer la dosis más apropiada de ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP) para el desarrollo de los segmentos nodales en la fase de introducción de orquídeas (*Epidendrum* sp).
- Determinar el porcentaje de sobrevivencia de los segmentos nodales al final de la fase de Introducción.
- Determinar el costo unitario de las plantas en la fase de introducción.

1.3 HIPÓTESIS

1.3.1 Hipótesis nula

Las dosis de fitohormonas utilizadas en la fase de introducción de la orquídea *Epidendrum* sp., producen el mismo efecto entre tratamientos.

1.3.2 Hipótesis alternativa

Las dosis de fitohormonas utilizadas en la fase de introducción de la orquídea *Epidendrum* sp. promueven diferentes efectos entre tratamientos.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

2.1.1 Perspectiva histórica de las orquídeas

Los científicos consideran que las orquídeas se originaron hace aproximadamente de 100 a 120 millones de años. Se cita el Archipiélago de Borneo como el posible lugar de nacimiento de estas bellas e interesantes plantas (Sequeira, 1980).

La palabra *orchis* tomada del griego y de la cual se deriva el término orquídea, sirve de base a toda la nomenclatura de la Familia de las Orquídeas, se originó entre los años 370 a.C. y 285 a.C., cuando fue usada por primera vez por el filósofo Teofrasto, discípulo de Platón y de Aristóteles y que fue conocido como el Padre de la Botánica (Sequeira, 1980).

El uso de las orquídeas ha sido tradicionalmente ornamental y medicinal. La cultura china fue la primera en cultivarlas (500 a.C.). Luego los griegos incrementaron su uso medicinal. El nombre orquídea deriva del vocablo *Orchis*, aplicado por el aspecto testicular de los tubérculos (tallos modificados de orquídeas terrestres). Los aztecas las utilizaron en América como comestibles, aromatizantes y ornamentos (Walter, 1979)

Por más de 3000 años las orquídeas han sido apreciadas en el Lejano Oriente, y su popularización como objeto de cultivo tiene ya mucho tiempo: en la

fecha temprana de 1233 d. C., Chao Shih-Keng publicó si Ching-Chang Lan-Pu, libro dedicado enteramente a esas plantas (Walter, 1979)

En Occidente, cuando las primeras plantas tropicales fueron importadas a Europa, en el siglo XVIII, cientos de miles de plantas perecieron en el tránsito de los trópicos americanos a Europa y muchos miles más fenecieron en los invernaderos ingleses y los del continente, por ignorancia de sus dueños. Los jardineros exitosos guardaron celosamente sus procedimientos de cómo hacer prosperar aquellas extrañas plantas y llevarlas hasta la floración. Las dificultades de aquellos primeros intentos de cultivo se debieron, principalmente, a la idea errónea de que las orquídeas sólo crecían en la oscuridad húmeda y opresivamente cálida de las junglas tropicales, con lo cual las orquídeas obtuvieron la reputación de ser “frágiles parásitas”, poseedoras de casi mágicas propiedades y ser en extremo delicadas (Walter, 1979)

2.1.2 Diversidad y Distribución

Las orquídeas constituyen la familia más grande de las Angiospermas y por lo tanto la más diversa (Abdelnour y Muñoz, 1997). El número de especies fluctúa entre 17 000 y 35 000 especies conocidas, las cuales se agrupan en 650 a 900 géneros (Kuan y González, 1993).

Son plantas herbáceas, perennes, cuyo tamaño oscila entre los 3 a 4 mm hasta varios metros de longitud. Se encuentran en los cinco continentes y únicamente las regiones polares y los grandes desiertos no presentan condiciones para su sobrevivencia. Crecen en las ciénagas, en los desiertos de poca extensión, en las selvas y en las sabanas. Sin embargo, el mayor número de orquídeas se encuentra en las zonas tropicales, mencionándose la existencia de unas 20000 especies distribuidas en 600 a 900 géneros (González, 1995). Unas especies viven formando parte de la vegetación

emergente de los cuerpos de agua aunque ninguna orquídea es estrictamente acuática (Walter, 1979).

Las orquídeas están distribuidas en un ámbito que va desde 72° norte hasta 52° sur, entre el 80% y el 90% se concentra cerca del Ecuador en la zona tropical o subtropical. La mayoría de éstas plantas se localizan entre el sureste de Asia hasta Indonesia y Australia. En segundo lugar está la zona comprendida entre África y Madagascar y una tercera zona que va desde México hasta Brasil (Kuan y González, 1993).

La más pequeña de las orquídeas es, posiblemente, *Bulbophyllum globuliforme*, una especie australiana cuyas plantas en tiempo de floración, no sobrepasan los 6 mm de tamaño. Las orquídeas trepadoras del género *Galeola*, de la región Indo-Australiana, llegan a medir hasta 30 m. Las plantas de mayor tamaño, sin ser trepadoras, son quizá las de *Grammatophyllum speciosum* Bl., de Malaya, cuyos pseudobulbos miden de 7-8 m de alto y están coronados por penachos de flores de 3m de largo (Walter, 1979).

Las flores de orquídeas son tan variables como las plantas que las producen. La más pequeña mide 1 mm de diámetro (*Platystele jungermannioides*, de América tropical); la más grande alcanza un diámetro de hasta 25,5 cm (*Sobralia macrantha*, de Centroamérica) (Walter, 1979)

En lo que se refiere al color, también existe gran diversidad. Todos los colores excepto el color negro, se encuentran representados entre las flores de orquídea. Unas pocas orquídeas tienen flores de un solo color. La forma de las flores va desde la casi completa simetría radial (como el género *Thelymitra*) hasta la más extensa simetría bilateral, como en *Oncidium kramerianum* de América tropical, o bien, hasta la asimetría de géneros como *Mormodes* de México al Brasil y *Haemaria* (Indonesia) (Walter, 1979).

Otro aspecto variable de las orquídeas es el de las fragancias de sus flores. Los olores, que son complejas mezclas de sustancias químicas, se pueden producir en diferentes partes de la flor y, en algunos casos, una misma flor puede producir diferentes aromas en distintas horas del día o la noche. Aparentemente, esto sucede para atraer un mayor número y espectro de polinizadores (Walter, 1979).

2.1.3 Ecología

Las orquídeas presentan varios hábitos de crecimiento debido a su gran variabilidad morfológica. Crecen sobre los árboles (epífitas), o sobre las rocas (litofíticas) y en el suelo, pero una gran parte de la familia es epífita. Las orquídeas epífitas son más diversas y abundantes en bosques húmedos pero se encuentran algunas especies en bosques secos y estacionales (Dressler, 1993)

El epifitismo es un fenómeno básicamente tropical. Por ejemplo, en los Estados Unidos de Norteamérica hay muy pocas orquídeas epífitas y las que existen están restringidas a la zona tropical de la Florida. Por el contrario, casi un 90% de las especies tropicales de América son epífitas y sólo el 10% restantes son terrestres (Walter, 1979)

El hábito epífita le ofrece muchos beneficios a las orquídeas, especialmente a las que crecen en áreas húmedas. En bosques densos y húmedos la cantidad de luz que alcanza el suelo es poca, además, el suelo es generalmente pobre en nutrientes lo que aumenta la competencia entre las plantas; el drenaje es deficiente lo que limita aún más el crecimiento de las plantas que crecen ahí. Todos estos problemas son evitados cuando las plantas germinan y crecen sobre los árboles. Sin embargo, una característica importante que deben presentar las plantas epífitas es la capacidad de resistir condiciones de desecación. Las orquídeas presentan adaptaciones que les permiten su hábito epífita. Las raíces presentan un velamen esponjoso que las protege de la desecación y sirve también para absorber el agua y los minerales; los

seudobulbos, lo mismo que las hojas (gruesas, con cutícula y enceradas) son otra clara adaptación para almacenar agua y reducir desecación (Abdelnour y Muñoz, 1997).

Por otra parte, las semillas de las orquídeas son tan pequeñas que contienen poca o ninguna reserva para llevar a cabo la germinación, es decir, no presentan endospermo, por lo que en condiciones naturales se asocian con hongos que digieren la materia orgánica y transfieren los carbohidratos al embrión de la orquídea, permitiendo que se desarrolle la planta. Además, requieren los polinizadores específicos para que se efectúe la fecundación. La sumatoria de estos factores hace que el número de semillas que germinan en condiciones naturales sea muy bajo en comparación con el número de semillas producido (Abdelnour y Muñoz, 1997).

La mayor parte de las plantas de orquídeas son verdes por tener clorofila y capaces por esa misma razón de producir sus propios alimentos (autótrofas). Sin embargo, algunas carecen de esos pigmentos y son incapaces del autotrofismo, dependen de una relación simbiótica con ciertos tipos de hongos (la mayoría del género *Rhizoctonia*), para absorber nutrientes derivados de la descomposición de la materia orgánica. A estas plantas se les llama saprófitas (Walter, 1979).

En sus ecosistemas naturales, las orquídeas viven en un delicado balance con los otros organismos del ambiente, por lo que pequeños cambios ambientales tienen efectos adversos sobre ellas y pueden resultar en disminuciones en las poblaciones o en último caso pueden llevar a su extinción. En la mayoría de los casos el hábitat de las orquídeas son los bosques, y aquellas que son epífitas viven en estrecha dependencia con los árboles. La deforestación implica la muerte de las orquídeas que viven en los árboles: el sol directo las quema, con la muerte del árbol se desprende la corteza en donde se hallan

aferradas las orquídeas y con la lluvia, el crecimiento de las malezas y otros, se produce su destrucción (Abdelnour y Muñoz, 1997).

2.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y ANATÓMICA DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE

2.2.1 Tipo de crecimiento

La familia Orchidaceae se divide en dos grupos, dependiendo del tipo de crecimiento básico que presenten: simpodial y monopodial. Las orquídeas simpodiales (*Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Lycaste*, entre otros) se caracterizan por tener retoños individuales de crecimiento finito. De los tallos rastreros (rizomas), brotan retoños que se desarrollan en otros tallos y hojas, y que al madurar producen flores. Los tallos de muchas orquídeas simpodiales, se convierten en pseudobulbos. Las orquídeas monopodiales (*Epidendrum Phalaenopsis*, *Vanda*, *Aerides*), en cambio, tienen un tallo central cuyo extremo crece continuamente, produciendo hojas alternadas e inflorescencias entre las hojas (Kuan y González, 1993).

2.2.2 Estructuras vegetativas

El sistema radical de las orquídeas, tiene notables modificaciones del tipo normal de raíz. Sin embargo, al igual que en el resto de las plantas es un órgano vital para el anclaje de la planta y la absorción de nutrientes. En las orquídeas terrestres, las raíces son estructuras alargadas y ramificadas, cubiertas de pelillos absorbentes. Están cubiertas por hifas que las penetran y forman dentro de las raíces nódulos. La combinación raíz / hongo recibe el nombre de micorriza (Kuan y González, 1993).

Poseen un corto o elongado rizoma, un cormo o tubérculo. Las raíces pueden ser subterráneas o aéreas, fibrosas, carnosas o tuberosas, fasciculadas o adventicias, distribuidas sobre el rizoma o el tallo (Rodríguez *et al*, 1986).

Las raíces de las epífitas son aún más especializadas que las orquídeas terrestres. En ellas, muchos pelillos radicales se han sustituido por una funda de células muertas, esponjosas, que se llama velamen. Este velamen facilita la absorción de agua y minerales (Walter, 1979).

Las raíces de las epífitas pueden originarse en cualquier punto del tallo; además pueden crecer en todas direcciones y no sólo hacia abajo. Su tendencia positiva a hacer contacto les permite servir de soporte. Las raíces de las epífitas pueden ser fotosintéticas, lo cual explica la coloración verdosa de sus plantas (Walter, 1979).

En muchas especies terrestres, los tallos subterráneos se comprimen y abultan a manera de tubérculos. En los tallos aéreos (en las epífitas) también se almacenan agua y nutrientes y por eso pueden aparecer abultados. Estos pseudobulbos (se llaman así porque técnicamente no son bulbos verdaderos), pueden estar formados por un solo entrenudo o por varios; pueden ser pequeños o enormes y de formas muy variadas: esféricos, ovalados, globosos, comprimidos, lisos o acostillados. (Walter, 1979)

Del extremo apical o de su parte media, en un pseudobulbo se originan una o más hojas. Los pedúnculos de las inflorescencias se originan en la base, parte media o extremo apical del pseudobulbo (Kuan y González, 1993)

Las hojas de las orquídeas siempre son simples, sus márgenes son enteros (no tienen espinas, ni son aserrados), y por lo general son angostas y alargadas (Kuan y González, 1993).

Las hojas pueden ser basales o caulinares, persistentes o deciduas, varían de una vaina foliácea a una lámina ancha o angosta con o sin pecíolo. Lámina filiforme u orbicular, de membranácea a carnosa o caríácea, plegada, convoluta, conduplicada o equitante (Rodríguez *et al*, 1986).

En las epífitas, la regla general es la de tener hojas gruesas, con una cutícula de cierto espesor y encerada, que les permite resistir no sólo la depredación por insectos, sino también los fuertes vientos secos de los trópicos y subtropicos (Kuan y González, 1993).

Muchas orquídeas poseen hojas muy gruesas que sirven para almacenar agua y por tanto funcionan como tallos. Numerosas especies que habitan lugares muy calientes e insolados, tienen hojas casi cilíndricas para reducir la relación superficie / volumen y evitar así el sobrecalentamiento y la deshidratación. Algunas autótrofas carecen de hojas y las saprófitas normalmente áfilas a veces presentan pequeñas brácteas no funcionales para la fotosíntesis (Walter, 1979).

2.2.3 Estructura Floral

Como en la mayoría de las monocotiledóneas, la flor de las orquídeas está construida en verticilos o series de tres partes cada uno: tres sépalos, tres pétalos (de los que uno se modifica para formar el labelo), seis estambres (3, 4 ó 5 de ellos eliminados durante la evolución) y 3 carpelos unidos (Walter, 1979).

Cuando se trata de inflorescencias, éstas pueden ser terminales o laterales, subtendidas por un pedúnculo largo o abreviado, de una o más flores, comúnmente una espiga, un racimo simple o una panícula (Rodríguez *et al*, 1986).

Los sépalos son por lo general órganos desprovistos de clorofila que forman la funda del capullo y que protegen así la flor. Cuando ésta se abre, los sépalos sirven como órganos de atracción junto con los pétalos. El tamaño, forma, etc. de éstos es variable según las especie, aunque es normal que, en una misma flor los sépalos sean casi idénticos entre sí (Kuan y González, 1993).

Los pétalos laterales usualmente son estructuras vistosas aunque de menor tamaño que el tercer pétalo (central), modificado para formar el labelo, labio o corneta de la flor (Walter, 1979).

Como los sépalos, los pétalos sirven para atraer polinizadores a la planta, especialmente el labelo, que funciona como plataforma para el aterrizaje de los insectos, por lo cual difiere en forma, tamaño, color y fragancia de los otros pétalos. El labelo da al estereotipo de la flor de orquídea su forma y simetría bilateral (Kuan y González, 1993).

El labelo siempre se sitúa opuesto a la columna, aunque en orquídeas muy evolucionadas, la antera fértil se recurva hacia abajo hasta quedar frontal al labelo (Walter, 1979).

Las flores de las orquídeas son bisexuales o perfectas. Son notables las excepciones en que las flores son unisexuales (ejemplo *Catasetum* y *Cynoches*) (Kuan y González, 1993).

La columna es la estructura más característica de las orquídeas y está formada por la fusión del pistilo y los estambres; en el ápice o sobre la parte dorsal de ésta se encuentra la antera, protegiendo los polinios, éstos son suaves, céreos o duros, desnudos o con caudículas, o adheridos a un estípite o viscidio para formar una estructura compleja: el polinario. El estigma se ubica cerca del ápice de la columna, es entero a bilobulado. El ovario es ínfero, trilocular o unicelular a la madurez (Rodríguez *et al*, 1986).

La columna de las orquídeas más evolucionadas se caracteriza por tener una única antera terminal con 2 a 12 polinios. Hacia el ovario y de frente al labelo se encuentran tres estigmas unidos formando una cavidad pegajosa inmediatamente próxima a la antera; en esa depresión germina el polen para iniciar su viaje hasta los óvulos. Separando el área estigmática funcional de la antera se puede localizar el rostelo, cuya función es la de coadyuvar el intercambio cruzado de polen, lo que se logra de dos formas: el rostelo pegajoso sobresale dentro de la apertura entre la columna y el labelo y cuando un insecto recula para abandonar la flor, el polinizador se ve obligado a tocar el rostelo con lo cual una capa de goma queda sobre el cuerpo del mismo, la cual afianza los polinios y arrastra el polen hacia otra flor (esto es propio de las orquídeas menos evolucionadas); la otra manera es cuando el viscidio (parte muy especializada del rostelo) se desprende y se adhiere al insecto que, al dejar la flor, arrastra el polinio atado al otro extremo de este sistema (es característico de orquídeas más evolucionadas) (Walter, 1979).

En los procesos de polinización, aunque los visitantes acarrean polen, es paradójico el hecho de que en ningún caso el polen es una recompensa nutritiva. En su lugar, ésta consiste en néctar, aceites o compuestos aromáticos (Walter, 1979).

2.2.4 Frutos y semillas

Luego de la polinización, los granos de polen germinan sobre la superficie estigmática y los tubos polínicos se extienden hasta el ovario. Si la fertilización no ocurre la cápsula o el fruto detiene su desarrollo y muere, de lo contrario, se desarrollan los embriones. El embrión está rodeado por una cubierta o testa, por lo que necesitan fuentes de nutrición externas hasta desarrollarse lo suficiente como para sobrevivir de una forma autótrofa. En condiciones naturales, estas fuentes de alimento las obtienen de la asociación con hongos (Kuan y González, 1993).

2.3 EL GÉNERO *Epidendrum*

2.3.1 Descripción

La familia Orchidaceae se divide en seis subfamilias. Una de las más importantes es Epidendroideae ya que es la más evolucionada (derivada) y además comprende al 90% de las especies de las orquídeas americanas. Dentro de Epidendroideae existen varias tribus y subtribus, una de las cuales es la subtribu Laeliinae, que incluye el género *Cattleya* y a sus parientes: *Brassavola*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Rhyncholaelia*, *Schomburgkia*, *Sophranitis*, etc. (García, 1995)

La clasificación citada por García (1995) es la siguiente:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida.
Orden:	Asparagales
Familia:	Orchidaceae
Subfamilia:	Epidendroideae
Tribu:	Epidendreae
Subtribu:	Laeliinae
Género:	<i>Epidendrum</i>
Especie:	<i>Epidendrum</i> sp.
Nombre Común:	Orquídeas estrella

Las orquídeas de la especie *Epidendrum* según White J, (1996) son epifitas y originarias de América tropical, desde Florida hasta el Norte de Argentina. El término *Epidendrum* procede de las palabras griegas *ept* = sobre y *dendron* = árbol.

Luer (1987), manifiesta que el tallo de la especie puede llegar a medir hasta 2m de altura. Sus flores perfumadas aparecen en el extremo del tallo cubierto de hojas y duran varios meses, sus colores son el blanco, verde, amarillo,

rojo. Además, expresa que las inflorescencias llevan docenas de flores diminutas, pero muy elaboradas y que los agentes polinizadores son las mariposas, polillas diurnas y nocturnas y también los colibríes.

Gonzales, Dirzo y Vogt (1997), señalan que la especie vive aproximadamente un año en casa y hasta siete años en invernadero; que deben estar expuestas a la luz intensa, pero nunca al sol directo y que pueden soportar temperaturas variables desde muy frías a calurosas.

Según Férreas (2000), el riego debe hacerse dos veces por semana en verano, una vez por semana en invierno y que el sustrato recomendado para que esta especie se desarrolle, debe ser poroso y permanecer aireado, así las raíces no quedan empapadas. Añade que deben ser abonadas una vez por semana con un abono líquido sobre todo cuando arranque la nueva vegetación y recomienda el cambio de maceta cada dos años.

Foldats (1969), indica que las plagas que atacan a la especie son pulgones, babosas, caracoles, cochinillas y ácaros. Respecto a las enfermedades las más comunes son las fungosas que se presentan por exceso de humedad.

2.4 Cultivo *in vitro*

Originalmente, el cultivo *in vitro* se definió como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación de plantas, órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como el de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se producen pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva. Krikorian (1991b).

Villalobos y Thorpe (1991) señalan las siguientes ventajas del cultivo *in vitro*:

- a. Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- b. Reducción del tiempo de multiplicación.
- c. Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable.
- d. Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- e. Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- f. Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

Villalobos y Thorpe (1991), propone las siguientes desventajas del cultivo *in vitro*:

- a. Requiere de implantación de una infraestructura y equipos costosos como la cámara de flujo laminar.
- b. El material químico empleado en la preparación de los medios de cultivo es costoso y poco disponible en el mercado local.
- c. No es posible instalar laboratorios *in vitro* donde no se cuenta con fluido eléctrico o donde se presentan interrupciones periódicas.
- d. Se requiere de personal de laboratorio especializado: biólogos, químicos, fisiólogos, fitomejoradores, agrónomos.

Debido a que la micropropagación se refiere a un fenómeno de reproducción asexual, el riesgo de tener “variantes” fenotípicas o genéticas es bajo. Sin embargo eso puede suceder cuando no se domina el proceso *in vitro*. Las plantas que provienen de un mismo meristemo, ápice o estaca son llamadas “clones” (Krikorian, 1991b).

La obtención de una planta entera puede ocurrir a través de tres vías diferentes, de acuerdo con Abdelnour y Vincent (1994):

- a.* A partir de brotes, primordio, meristemo y embriones pre-existentes en el explante utilizado.
- b.* A partir de un brote o meristemo iniciado dentro de un callo o directamente sobre un explante inicial. En este caso los brotes o meristemas se forman *in vitro* (brotes adventicios o *de novo*).
- c.* A partir de un embrión somático formado en semillas apomícticas, a partir de tejido somático por embriogénesis somática.

Murashige (1974, 1977), encontró que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, de la siguiente manera:

Etapa I. Iniciación o establecimiento (se establece el cultivo inicial o primario).

Etapa II. Multiplicación de brotes o multiplicación de plantas.

Etapa III. Corresponde al enraizamiento o etapa de pretransplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del transplante al suelo (Krikorian, 1991b).

Además de las anteriores, pueden considerarse otras dos etapas como parte integral del procedimiento:

Etapa IV: Transferencia final a la etapa de medio ambiente.

Etapa 0. Etapa inicial, que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pre - tratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte (Krikorian, 1991b).

Los factores que afectan la micropropagación son:

- Planta donadora de explante: el estado fisiológico y la edad de la planta fuente de explantes influyen en la morfogénesis. Mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (los meristemos apicales y axilares han sido muy exitosos). La posición de las yemas es un factor importante.
- El explante: si las plantas que se van a micropropagar tienen reproducción por semilla, las partes embrionales o de la plántula son las fuentes más comunes de explantes. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de explantes. Sólo en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemos (sin primordios foliares) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas.
- Factores físicos: La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28° C. La luz es un factor fundamental en la morfogénesis, involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad.
- Medio de cultivo: el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y forma física (Villalobos y Thorpe, 1991). Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación; existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes minerales, vitaminas, agente gelificante (en caso de medios semisólidos), sustancias reguladoras del crecimiento, y otros compuestos (Mroginski y Roca, 1991).

2.5 FITOHORMONAS

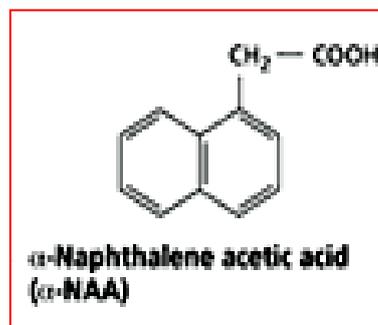
2.5.1 Auxinas

Son compuestos que tienen un núcleo indólico, éste se sintetiza a partir del aminoácido Triptofano que se sintetiza por la vía Shikimica. (Larousse 2002).

El efecto de las auxinas está estrechamente ligado al alargamiento celular, que se explica por sus efectos sobre la celulosa-sintetasa, el aumento de la plasticidad parietal y el aumento de la absorción de agua. Por esta razón una práctica usual es elevar el efecto auxínico mediante la evaluación del incremento del peso fresco de los tejidos. Las auxinas también tienen un efecto marcado sobre la división celular citocinesis. (Weaver, J.R. 1990).

Las auxinas participan en muchos procesos del desarrollo vegetal: crecimiento, dominancia apical, enraizamiento, partenocarpia, tropismos, abscisión, elongación celular y frecuentemente en embriogénesis y organogénesis en cultivos en suspensión. Uno de los reguladores más utilizados en la formación de raíces es el ácido naftalenacético (ANA) debido a que no causa efectos fitotóxicos, (Pierik 1990, Salisbury & Ross 2000).

Estructura química del Ácido Naftalénacético (ANA)



FUENTE: (Pierik 1990, Salisbury & Ross 2000).

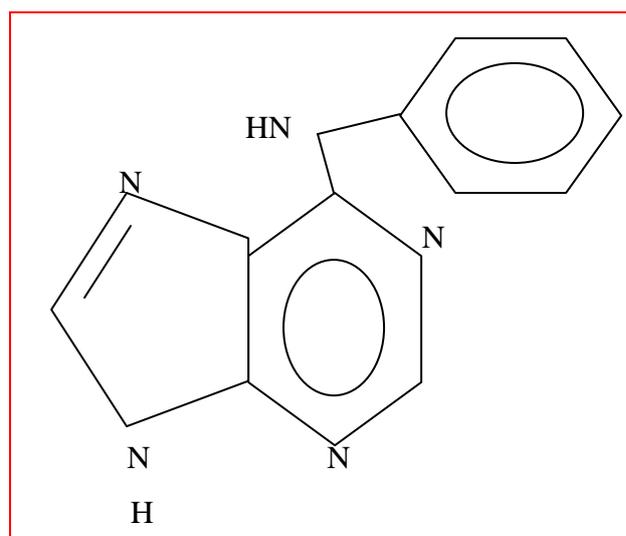
2.5.2 Citoquininas

En la década del 40 Johannes Van Overbeer descubrió que el endospermo lechoso de cocos inmaduros, eran ricos en compuestos que provocaban la citocinesis y a principios de 1950 .Folkeskoog y sus colaboradores encontraron que las células de secciones de medulas de tallos de tabaco se

dividían con mucha mayor rapidez cuando se colocaba un fragmento de tejido vascular sobre la medula superior comprobando los resultados de Haberlandt que había descubierto el compuesto citoquinina en tejidos vasculares que causaban formación del cambium del corcho y la cicatrización de heridas. (Weaver, J.R. 1990).

Las citoquininas son derivados de la adenina, poseen la propiedad específica de provocar el crecimiento de cultivos de tejidos en forma de callosidad, y en algunas plantas si se hacen flotar secciones o discos de hojas sobre soluciones de citoquininas en la oscuridad, estas retrasan la pérdida de clorofila de la hoja. Los efectos de la citoquinina sobre las plantas son las siguientes: Inducción de partenocarpio en algunos frutos, activación de la división celular en algunos microorganismos, formación de yemas en hojas separadas de la planta y en algunos musgos, estimulación de la formación de tubérculo en la papa, inducción de iniciación del crecimiento en los tallos y ramas, rompimiento del letargo de las yemas y semillas en muchas especies. (Pierik 1990, Salisbury & Ross 2000).

Estructura química de la 6-Bencilaminopurina (BAP)



FUENTE: (Pierik 1990, Salisbury & Ross 2000).

2.6 MICROPROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS

Las orquídeas se pueden multiplicar tanto de forma vegetativa como sexual. Si se utiliza la propagación vegetativa, la descendencia es idéntica a la planta madre. Sin embargo, si se emplea la propagación generativa, sólo raras veces se obtiene una descendencia semejante a los padres, y esto solo en caso de especies silvestres. Si se utilizan semillas procedentes de una orquídea cultivada (generalmente obtenida por un cruce, y fuertemente heterocigota), la descendencia será muy heterogénea y rara vez idéntica al material inicial. La propagación tradicional de orquídeas es un proceso muy lento, y se pueden requerir a veces 10 años antes de conseguir un clon de un tamaño aceptable (Pierik, 1987).

La micropropagación de las orquídeas se puede dividir en dos grupos importantes, basados principalmente en el objetivo de trabajo y la fuente del explante: micropropagación sexual y micropropagación asexual (Kuan y González, 1993).

La micropropagación sexual consiste básicamente en la propagación por medio de semilla, con lo cual se asegura la variabilidad del material genético. Su aplicación se justifica cuando se producen híbridos de gran valor cuya semilla de otra forma no germinaría, además de que en condiciones naturales la germinación de orquídeas es muy baja (alrededor del 5% del total producido en una cápsula). La germinación de semillas *in vitro* fortifica los esfuerzos de conservación de orquídeas al ofrecer una mayor cantidad de plantas a un menor precio, evitándose así el saqueo de individuos silvestres (Kuan y González, 1993)

Las semillas pueden extraerse de cápsulas verdes (antes de su apertura), las cuales deben tener un 60% de maduración. La cápsula debe esterilizarse y las semillas se inoculan en la cámara de flujo laminar. En caso de semillas

expuestas (fuera de la cápsula), éstas deben ser removidas y ser tratadas con un desinfectante antes de inocularlas *in vitro* (Kuan y González, 1993).

A partir de 1960 se produjo una revolución en la propagación vegetativa de las orquídeas. Morel (1960) intentó obtener *Cymbidium* libres de virus, por cultivo de meristemos; y para este propósito aisló ápices del vástago *in vitro* (Pierik, 1987).

La micropropagación asexual de las orquídeas, se realiza partiendo de diferentes tipos de explantes según sea el crecimiento de la orquídea (meristemo apical, meristemo lateral, yema en dormancia, nudo de tallo, yema floral, tallo floral joven, sección de hoja nueva, sección de raíz, pétalo de flor). Además debe considerarse otros factores como la facilidad para ser cultivable desde el punto de vista de comportamiento celular como aséptico. Los objetivos principales de la micropropagación asexual en orquídeas son la limpieza del material vegetal de cualquier tipo de virus (por cultivo de meristemos) y otros patógenos, y la propagación masiva de las plantas (Kuan y González, 1993).

2.6.1 Cultivo de ápices y meristemos en orquídeas

En los años 60, el desarrollo de procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos recibió un impulso dramático; ello se debió al descubrimiento de la capacidad que tienen las puntas de los brotes y los meristemos de *Cymbidium* sp., cortados apropiadamente y sembrados en cultivo aséptico, para producir protuberancias que asemejan protocormos normales capaces de crecer y desarrollarse en plántulas (Krikorian, 1991b).

Desde entonces se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemos de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de una punta de brote cultivado o de un explante, en algunos casos,

se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Krikorian, 1991b).

A partir de los ápices de vástago de *Cymbidium* que extrajo Morel (1960) se obtuvieron unos “cuerpos protocórmicos” que eran extremadamente parecidos a los que se forman después de la germinación de la semilla. A veces este protocormo se divide en forma espontánea, pero generalmente esto se consigue cortando el protocormo en porciones. En el caso de *Cymbidium* se pueden producir 6-8 nuevos protocormos, a partir de uno inicial en alrededor 6 semanas; en principio este esquejado de los protocormos se puede repetir de forma indefinida. Si no se obtienen nuevos esquejes, el ápice del vástago de cada protocormo puede en principio desarrollar un vástago con hojas y raíces (Pierik, 1987).

Se determinó que si los cuerpos protocórmicos se cultivan en medio líquido y se colocan en agitación continua, el número de protocormos se incrementa considerablemente. Morel (1965) estimó que se pueden obtener 4 millones de plántulas al año, a partir de un meristemo de *Cymbidium*. De esta forma la clonación de orquídeas por cultivo de meristemas, se convirtió en la primera aplicación comercial de la propagación vegetativa *in vitro*. Este método se modificó más tarde en *Cattleya* y otros géneros (Pierik, 1987).

Los protocormos que se desarrollan después de la germinación de una semilla de orquídea, tienen un estado morfológico entre un embrión indiferenciado y un vástago.

La formación de cuerpos protocórmicos formados con el cultivo de meristemas, significa que el ápice del vástago de una planta adulta se rejuvenece. Debido a que los protocormos obtenidos por germinación de semillas tienen muchas semejanzas (formación de rizoides, formación espontánea o inducida de protocormos a partir de fragmentos de protocormo,

polaridad débil) con los producidos a partir de ápices de vástagos, se introdujo el término *cuerpo protocórmico*, cuando se clonan orquídeas por cultivo de meristemas (Pierik, 1987)

Morel (1960), en cuanto al crecimiento de los explantes observó que en las formulaciones de BAP y ANA de 2mg/litro el crecimiento del protocormo era inferior al resto de formulaciones probadas.

La propagación de orquídeas por cultivo de meristemas se puede dividir en tres fases:

- a. Transformación del meristemo en un cuerpo protocórmico o tipo protocormo.
- b. La propagación de los protocormos dividiéndolos en fragmentos y,
- c. La conversión de los protocormos en vástagos con raíces (Pierik, 1987).

Una de las aplicaciones del cultivo de meristemas en la limpieza de virus en plantas enfermas, para lo cual se requiere el aislamiento del meristemo con uno o dos primordios foliares; porciones apicales de vástago más grandes tienen pocas probabilidades de producir plantas libres de virus, pero tienen más probabilidades de sobrevivir (Pierik, 1987)

2.6.2 Micropropagación de *Cattleya* por cultivo de ápices y meristemas.

En el caso de *Cattleya* deben seleccionarse brotes de crecimiento rápido que tengan de 3 a 5 cm de longitud, los cuales deben ser cortados y separados de la planta madre con un bisturí previamente desinfectado. El brote debe cortarse tan cerca de la base como sea posible (Kuan y González, 1993).

Kuan y González (1993) mencionan una desinfección cuádruple de brotes de *Cattleya* en hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial: una inicial con una

solución al 10% (v/v) por 15-10 minutos, luego se eliminó 2 o 3 hojas del brote y se sumergió en NaOCl al 5% (v/v) por 8-10 minutos; posteriormente, y luego de eliminar los primordios de hoja, se colocó en una solución al 3% (v/v) por 3-5 minutos; seguidamente se eliminaron los primordios de hoja y se sumergió un cubo apical de 2 mm en NaOCl al 1% (v/v) colocándolo finalmente en un medio Murashige y Skoog (1962).

Gutiérrez y Chen- Han (1994) utilizaron tres tipos de híbridos de *Cattleya*: Lc. Dismore Perfection, Lc. Puppy love y Lc. Shellie Compton. Los brotes (de 5-8 cm) fueron sometidos a una desinfección doble con NaOCl. Antes de la primera desinfección se eliminaron de 1-2 hojas del brote dejando expuestas las yemas laterales. La desinfección superficial se realizó con NaOCl al 1% más tres gotas de Tween 20 por 5 minutos en un lavador ultrasónico y 10 minutos fuera de éste.

Después de realizar tres lavados en la cámara de flujo laminar y de extraer 2-3 hojas más del brote se introdujo en NaOCl al 0,5% más tres gotas de Tween 20 durante 15 minutos. Finalmente se efectuaron tres lavados con agua y un lavado en Ácido Cítrico (100 mg/l) antes de extraer las yemas laterales y el meristemo e introducirlos en medio de iniciación líquido (120 rpm), que consistió en un MS (1962) con 1/3 de la concentración de sales, 10 mg/l de Adenina, 1,75 mg/l de Bencil Adenina (BA), 1,75 mg/l de Ácido Naftalenacético (ANA), 2 mg/l de Glicina, 15% (v/v) de Agua de coco y 20 g/l de sacarosa; en este medio los explantes estuvieron por 4 semanas.

Morel (1965) cultivó puntas de brotes en medio semisólido Knudson C (1946) enriquecido con 1 mg/l de Ácido Indolacético (AIA) ó 1 mg/l de ANA obteniendo formación de cuerpos protocórmicos. Estas estructuras proliferaron en un medio Morel (1965) enriquecido con los mismos reguladores de crecimiento y en las mismas concentraciones.

Reinert y Mohr (1967) cultivaron yemas laterales de brotes de *Cattleya* sp en un medio Reinert & Mohr (1967) enriquecido con 1,75 mg/l de ANA y 1,75 de Ácido Indolbutírico (AIB); luego de tres semanas de introducidas las yemas se utilizó un medio igual al primero pero con adición de 1 mg/l de Cinetina (KIN) y semisólido para obtener los cuerpos protocórmicos.

Un medio igual a este último pero en estado líquido se utilizó para mantener en crecimiento los cuerpos protocórmicos y el callo producido (ocasional); así como la regeneración a plántulas (Arditti y Ernst, 1993).

Brotes vegetativos de *Cattleya* sp de longitudes entre 1-8 cm fueron utilizados por Scully (1967). Se utilizó una desinfección doble con Clorox (NaOCl): ambas al 20% (v/v) pero con duración variable (la primera de 5 minutos y la segunda de 10 minutos). Se utilizaron dos tipos de medios en las etapas de introducción y enraizamiento: Vacin & Went (1949) y Morel (1965). La etapa inicial se realizó en medio líquido (160 rpm) por 2-5 semanas y la de enraizamiento en medio semisólido por 6-8 semanas. Todos los medios se utilizaron con 1 mg/l de ANA y 10% (v/v) de Agua de coco.

Lindemann *et al* (1970), utilizaron brotes axilares, los cuales fueron desinfectados superficialmente con alcohol etílico de 95°, y luego se sumergieron en Hipoclorito de Calcio (Ca(OCl)₂) al 0,4%-0,5% por 20-30 minutos; después de cada desinfección se realizó un lavado con agua estéril. Los explantes se cultivaron en un medio de iniciación Lindemann *et al.* (1970) líquido enriquecido con 0,1 mg/l de ANA, 0,2 de KIN y 15% de Agua de coco hasta formar el cuerpo protocormica le llevo tres meses. Luego de 2 meses, se formaron los cuerpos protocórmicos, los cuales fueron multiplicados en un medio líquido Lindemann *et al.* (1970) conteniendo 0,2 mg/l de ANA, 0,22 mg/l de KIN, 0,35 mg/l de Ácido Giberélico (GA3), 15% de Agua de coco y 100 mg/l de Caseína Hidrolizada.

Las subdivisiones de los cuerpos protocórmicos se realizaron en intervalos de un mes. El enraizamiento se realizó en un medio Knudson C (1946) donde las plantas tardaron 10 días en emitir raíces.

Morel (1970) utilizó tejido meristemático de yemas situadas en la base de brotes jóvenes y altas concentraciones de fitohormonas en los explantes de *Cymbidium* sp., observó que el crecimiento de los explantes fue menor en relación a las otras formulaciones con dosis inferiores a 2.5mg/l de BAP y ANA.

Como medio de iniciación se sugieren varios medios de cultivo, todos ellos líquidos:

- Medio MS (1962) modificado conteniendo 0,1 mg/l de ANA, 0,2 mg/l de KIN y 15% (v/v) de Agua de coco.
- Otra modificación de medio MS (1962) enriquecido con 0,1 mg/l de ANA, 0,2 mg/l de KIN y 100 mg/l de Caseína Hidrolizada
- Medio de iniciación Lidemann *et al.* (1970) conteniendo 0,1 mg/l de ANA, 0,2 mg/l de KIN y 15% (v/v) de Agua de coco, seguido de medio de mantenimiento
- Lidemann *et al.* (1970) conteniendo 0,2 mg/l de ANA, 0,22 mg/l de KIN, 0,35 mg/l de Ácido Giberélico (AG3) y 15% de Agua de coco y 100 mg/l de Caseína Hidrolizada.
- Medio Kundson C (1946) modificado, ya sea con ausencia de reguladores de crecimiento o utilizando 0,1 mg/l de ANA y 0,2 mg/l de KIN, además de 15% (v/v) de Agua de coco.

Después de obtener cuerpos protocórmicos en cualquiera de los anteriores medios (en un período de 2 meses después de la introducción), Morel (1970) utilizó como medio de multiplicación y regeneración un medio semisólido Knudson C (1946) modificado.

Ápices de brotes de 2-5 cm de longitud sin las hojas desplegadas fueron utilizados por Huang (1984). Después de remover las hojas superficiales, los brotes fueron lavados y sumergidos en una solución antioxidante de 100 mg/l de Ácido Ascórbico y 150 mg/l de Ácido Cítrico; posteriormente se

introdujeron en una dilución 1:10 de Purex (NaOCl al 5% -5,25%) por 20 minutos al vacío. Luego se realizó un lavado con agua estéril y los brotes se introdujeron nuevamente en Purex pero en una dilución 1:10 por 1 minuto para finalmente hacer un baño con una dilución 1:1000. Los explantes fueron inoculados en un medio líquido de iniciación MS (1962) modificado conteniendo 0,1 mg/l de ANA, 1 mg/l de Bencil Adenina (BA), 10 mg/l de Sulfato de Adenina y 15% de Agua de coco. Para la multiplicación de los cuerpos protocórmicos se utilizó un medio semisólido MS (1962) modificado con 0,1 mg/l de ANA, 1 mg/l de BA, 10 mg/l de Sulfato de Adenina y 15% de Agua de coco.

En el caso del cultivo de meristemas de *Cattleya*, se produce muy rápidamente una coloración marrón en los tejidos lesionados debido a la oxidación; por esta razón se recomienda cortar el meristemo en líquido, y cultivarlo después en un medio de cultivo líquido, en el cual la coloración marrón difunde con más facilidad (Pierik, 1987).

La formación de cuerpos protocórmicos en *Cattleya* necesita bastante tiempo y generalmente empieza en las bases de las hojas más viejas; aquí el meristemo apical no juega de hecho ningún papel y al final se pierde. los primordios foliares de *Cattleya* aislados responden también de forma positiva forman cuerpos protocórmicos (Pierik, 1987).

El aislamiento de meristemas generalmente tiene lugar en medios sólidos con la excepción de *Cattleya*; la propagación de cuerpos protocórmicos generalmente tiene lugar en medios líquidos, y el crecimiento de estas estructuras hasta plántulas, nuevamente en medio sólido (Leffring, 1968).

La propagación y el crecimiento son, en general, mejores en un medio en movimiento que en un medio sólido. En los medios líquidos existe un mejor

suministro de oxígeno y el transporte de nutrientes es más eficaz (Pierik, 1987).

2.7 ESTUDIO DE CASOS

2.7.1 Micropropagación de *Phalaenopsis* (Orchidaceae)

Jiménez y Guevara (1996) utilizaron segmentos de tallo con entrenudo, los cuales habían perdido todas sus flores, provenientes de híbridos comerciales de *Phalaenopsis*. Algunos de estos materiales fueron tomados de plantas de invernadero sometidos a riego por aspersión, mientras que otros se tomaron de lugares totalmente, expuestos, protegidos únicamente por un techo, pero donde el riego fue localizado a las raíces, en el cual se presentó mayores índices de contaminación ya están invariablemente contaminadas con microorganismos y enfermedades; debido a que se parte de explantes pequeños que deben ser inoculados en un medio nutritivo, que es favorable para el crecimiento y la multiplicación de estos microorganismos, el cultivo de tejidos debe ser establecido y mantenido en condiciones asépticas, lo que significa realizar un tratamiento de desinfección de las superficies expuestas

Se siguió el proceso de desinfección y disección descrito por (Intuwong *et al.* 1972). Se cortaron los escapos por encima del último se lavaron con agua corriente y jabón líquido por 20 minutos se seccionaron en segmentos con aproximadamente de 2cm de entrenudo a cada lado del nudo, y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (0.525% v/v) adicionada con 15ml de Tween 20 por cada 1000ml de solución, por 20 minutos. En condiciones asépticas se eliminaron las brácteas de las yemas y se desinfectaron de nuevo con hipoclorito de sodio (0.2625% v/v) con Tween 20 por 15 minutos en agitación. Luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

El corte inferior se hizo en diagonal para facilitar la entrada del segmento en el medio, los explantes se colocaron en forma vertical, y dejando el entrenudo a nivel del medio de cultivo.

Para el establecimiento inicial del material se utilizó una modificación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). Se añadió además 1.5 mg/l de BAP y 2.0mg/l de ANA. El pH se ajustó a 5.5.

Se observó mayor contaminación principalmente fungosa, en los explantes tomados de plantas mantenidas en el invernadero (52%) en comparación con las que se encontraban en lugares cubiertos (15%). Los explantes contaminados se redesinfectaron. Las redesinfecciones sucesivas dañaron el tejido y retardaron el desarrollo de las yemas.

Las yemas terminales se necrosaron fácilmente sin manifestar respuesta alguna. Lo mismo ocurrió con el primer nudo basal. Los explantes mediales respondieron de tres maneras: ausencia de crecimiento, formación de brotes vegetativos y producción de escapos florales. El seccionamiento en nudos de estos tallos y su transferencia a medio fresco induce al desarrollo vegetativo de las yemas axilantes.

En general la mejor respuesta fue observada con los segmentos de mayor grosor, observándose crecimiento de las yemas en estado latente situados en la parte media del tallo. Con la formación de las primeras hojas se observó en la mayoría de los explantes la aparición de raíces vigorosas.

2.7.2 Regeneración *in vitro* de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC.

La forma de propagación tradicional de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C., es por semillas o estacas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la tasa de regeneración *in vitro* y el estudio histológico de su regeneración. Se implantaron segmentos nodales en medio de cultivo Murashige y Skoog y se

evaluó el efecto de diferentes fitorreguladores: Bencilaminopurina (BAP), (ANA), la concentración de cada regulador fue de 1mg/l. Las mejores respuestas se obtuvieron con BAP y ANA al promover el crecimiento en longitud de las yemas axilares. En el estudio histológico se evidenció que el medio suplementado con BAP, fue el que mejor estimuló la proliferación y diferenciación celular (Severin *et al*, 2008)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte.

Provincia:	Imbabura
Cantón:	Ibarra
Parroquia:	Caranqui
Latitud Norte:	0° 21' 53"
Longitud Oeste:	78° 6' 32"
Altitud:	2254msnm

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1 Material experimental

- Segmentos nodales de la orquídea (*Epidendrum* sp.)
- Medio de cultivo Murashige - Skoog (MS) más diferentes dosis de 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Naftalénacético (ANA).

3.2.2 Cristalería

- Agitador
- Balón de aforo 1000 ml
- Cajas petri
- Embudo
- Pipetas de 1 ml, 5 ml, 10 ml y 25 ml
- Probetas de 100 ml
- Tubos de ensayo de 14 cm de longitud.
- Vasos de precipitación de 1000 ml.

3.2.3 Insumos

- Plástico osmótico.
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Pinzas
- Tijeras
- Toallas de papel
- Bisturíes

3.2.4 Equipos

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Destilador de agua
- Estufa
- Refrigerador

3.2.5 Reactivos

- Ácido Naftalénacético (ANA).
- Agar
- Alcohol al 100%
- 6- Benzilaminopurina (BAP)
- Hipoclorito de Sodio al 5%
- Glicina
- Inositol
- Jabón líquido
- Medio Murashige Skoog (MS)
- Sucrosa
- Desinfectante Tween[®] 20
- Fungicida Captan[®] 80%DF
- Peróxido de Hidrógeno al 3%

3.3 MÉTODOS

En la Investigación todos los instrumentos empleados fueron esterilizados en el autoclave a 121 °C y 15 libras de presión.

La investigación comprendió dos partes:

PRIMERA PARTE: Protocolo de desinfección.

SEGUNDA PARTE: Iniciación o introducción.

PRIMERA PARTE

En esta etapa preparatoria, se realizaron trabajos de tipo exploratorio, con el propósito de determinar el protocolo de desinfección más idóneo para la especie. Se probaron diferentes dosis y tiempos de desinfección utilizando los reactivos disponibles en el Laboratorio. Con el material disponible, apenas se logró un 20% de desinfección, por lo que se hizo necesario adquirir nuevos productos para dar paso a los pre-ensayos.

En la ejecución de los pre-ensayos se plantearon varios protocolos de desinfección probando varias sustancias desinfectantes y diferentes tiempos, en 40 tubos de ensayo. De éstos, se eligieron los más relevantes (Cuadro 1) y que, por retroalimentación, fue posible ir mejorando progresivamente el protocolo siguiente.

Dadas las características del método de indagación aplicado, en esta etapa no se utilizó, obviamente, ningún modelo matemático de análisis; los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje, relacionado simplemente, el número de tubos contaminados y la eficiencia de desinfección de cada uno de los protocolos. El resultado de este trabajo permitió contar con el protocolo más apropiado para la ejecución de la segunda parte, es decir del trabajo experimental propiamente dicho.

Luego del período de pruebas realizado entre diciembre 2008 y julio 2009, se llegó al feliz término de esta primera parte del trabajo experimental.

En el cuadro siguiente, se condensan los procesos con las respectivas sustancias químicas utilizadas en la desinfección del material vegetal de *Epidendrum* sp.

Cuadro 1. Protocolos de Desinfección utilizados para segmentos nodales de *Epidendrum* sp., en la Etapa Preparatoria.

SUBSTANCIAS QUÍMICAS	PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN			
	I	II	III	IV
Jabón Líquido (fuera de cámara) Inmersión	50ml/l por 30 minutos			
Tween[®] 20 (fuera de cámara) Inmersión	5ml/l por 10 minutos	10ml/l por 15 minutos	10ml/l por 15 minutos	15ml/l por 20 minutos
NaOCl (fuera de cámara) Inmersión	5ml/l por 10 minutos	10ml/l por 5 minutos	5ml/l por 5 minutos	-----
Captan[®] 80%DF (fuera de cámara) Inmersión	-----	1g/l por 5 minutos	1g/l por 5 minutos	1g/l por 5 minutos
Alcohol 70° (dentro de cámara) Inmersión	1 minuto	1 minuto	1 minuto	1 minuto
Peróxido de hidrógeno (dentro de cámara) Inmersión	-----	-----	-----	1 minuto
Lavados con agua destilada estéril (dentro de cámara) Enjuague	2 lavados de 2 minutos cada uno	2 lavados de 2 minutos cada uno	2 lavados de 2 minutos cada uno	3 lavados de 2 minutos cada uno

Luego de haber probado los diferentes protocolos de desinfección, se determinó que el Protocolo de Desinfección IV alcanzó una eficiencia de desinfección del 85%, apropiada para aplicarlo en la segunda parte de la investigación (Cuadro 6).

SEGUNDA PARTE

3.3.1 APLICACIÓN DE AUXINA Y CITOQUININA EN LA FASE DE INTRODUCCIÓN

3.3.1.1 Factor en estudio

Dosis de Ácido Naftalénacético (ANA) y 6-Benzilaminopurina BAP en segmentos nodales de la orquídea *Epidendrum* sp.

3.3.1.2 Medios de Cultivo.

Para el desarrollo de esta fase se utilizó seis medios de cultivo, los cuales fueron considerados como tratamientos, que contenían Murashige Skoog más Ácido Naftalénacético (ANA) y 6- Benzilaminopurina (BAP) en dosis diferentes excepto el testigo (T1).

Cuadro 2. Tratamientos en la fase de Introducción

Numero del Tratamientos	Código
1(testigo)	T1
2	T2
3	T3
4	T4
5	T5
6	T6

Cuadro 3. Formulación de medios

TRATAMIENTO	BAP x ANA (mg/l)
T1	0 (Testigo)
T2	0.5 x 1.0
T3	1.0 x 1.5
T4	1.5 x 2.0
T5	2.0 x 2.5
T6	2.5 x 3.0

3.3.1.3. Diseño Experimental

a) Tipo del diseño

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), con seis tratamientos y 10 repeticiones, a excepción de la variable contaminación en la que se utilizó un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), tomándose como bloques a los días en que fue medida esta variable.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = una observación individual.

μ = media común

τ_i = efecto del tratamiento

E_{ij} = error experimental

b) Características del experimento

Número de tratamientos:	6
Número de repeticiones:	10
Unidad experimental:	4 tubos de ensayo
Unidades experimentales:	60

c) Análisis Estadístico

El esquema del análisis de varianza fue el siguiente:

Cuadro 4. Esquema del Análisis de Varianza.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Tratamientos	5
Error	54
TOTAL	59

CV (%)

Cuadro 5. Esquema del Análisis de Varianza para la Variable número de tubos contaminados.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Tratamientos	5
Días	2
Error	10
TOTAL	59

CV (%)

d) Variables en estudio

- Número de tubos contaminados
- Longitud de las yemas.
- Supervivencia

Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó la prueba de Tukey al 5% cuando se empleó el DCA; y, DMS al 5% con DBCA.

3.4 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

La primera parte del trabajo consistió en encontrar un protocolo de desinfección apropiado para los segmentos nodales de *Epidendrium* sp. El trabajo demandó un período de siete meses comprendido entre diciembre 2008 y julio 2009, en el que se probaron diferentes compuestos químicos con propiedades desinfectantes, que cumplieron con la condición de ser fácilmente disponibles y económicamente accesibles.

La segunda parte del trabajo se realizó en agosto 2009. Consistió en probar las diferentes dosis de fitohormonas, tomando un tiempo de treinta días. Transcurrido ese tiempo, los segmentos nodales fueron transferidos a un medio fresco, para evitar su deterioro por el desgaste de nutrientes.

PRIMERA PARTE

3.4.1 Protocolo de Desinfección IV

FUERA DE CÁMARA

a) Preparación del material vegetal

Las plantas utilizadas para el desarrollo de la investigación, fueron obtenidas del invernadero que mantiene el Fondo de Salvamiento de la Ciudad de Ibarra (FONSALCI) ubicado en la Loma de Guayabillas. Se eligieron las plantas que demostraron las características fenológicas tipo. Se ejecutó el protocolo que resultó ser el más apropiado para este trabajo de conformidad con los resultados obtenidos en los pre-ensayos.

El proceso seguido fue el siguiente:

- Se prepararon segmentos de tallo entre 10-15 cm, provenientes de las plantas madre.
- Se procedió a eliminar las hojas expandidas.
- Los segmentos de tallo fueron lavados y sumergidos con agua corriente y jabón líquido en una solución de 50ml/litro, durante 30 minutos.
- Se colocaron los segmentos de tallo en Tween[®]20, en la dosis de 15ml/litro, durante 20 minutos y se agitó ocasionalmente.
- Se sumergieron los segmentos de tallo en solución Captan[®] 80%DF a una concentración de 1 g/litro, durante 5 minutos.
- Los segmentos de tallo fueron lavados tres veces, por dos minutos, con agua estéril.

DENTRO DE LA CÁMARA

El proceso de obtención de los segmentos nodales se realizó dentro de la cámara de flujo de laminar la cual se desinfectó de la siguiente forma:

- Se realizaron pruebas de contaminación en la cámara, para asegurar que no se contaminen los medios de cultivo. Durante las pruebas se dejó un medio de cultivo destapado, en diferentes etapas de tiempo, para determinar cuánto tiempo se puede trabajar dentro de la cámara. Los resultados fueron apreciados por presencia – ausencia de contaminación. Quedó establecido que dentro de la cámara se puede trabajar hasta por un lapso de 60 minutos, al haber comprobado que en periodos más prolongados se produce contaminación de los medios.
- Con la ayuda de un rociador y algodón empapado en alcohol al 70% de concentración, se limpiaron todas las superficies de la cámara (paredes y techo incluidos). La desinfección tanto antes como después de utilizar la cámara.

b) Desinfección de los segmentos de tallo de *Epidendrum* sp. y preparación de los segmentos nodales.

- Los segmentos de tallo fueron sumergidos por un minuto en alcohol de 70° se agitó ocasionalmente y se enjuagó por tres veces con agua estéril.
- Los segmentos de tallo se colocaron en agua oxigenada al 3% durante 1 minuto se agitó ocasionalmente y se enjuagó tres veces con agua estéril durante dos minutos.
- Se realizó un corte transversal utilizando la parte media del segmento de tallo, para obtener un segmento nodal con su respectiva yema en estado latente, en una longitud 2cm a partir del entrenudo a cada lado, para evitar su deterioro como fue evidenciado en los pre-ensayos al utilizar segmentos pequeños nodales pequeños.

SEGUNDA PARTE

3.4.2 Preparación de los medios de cultivo para la Investigación.

- Se preparó los Stocks I, II, III, IV, y vitaminas (anexo 17).
- Se preparó el medio Murashige Skoog (MS), 200ml para cada tratamiento utilizando los siete stocks, sucrosa y agar.
- Se adicionaron las fitohormonas; ácido naftalénacético (ANA) y 6-Bencilaminopurina (BAP) en dosis diferentes excepto el testigo (Cuadro 2).
- Se reguló el pH a 5.5 con ácido sulfúrico (H_2SO_4) en una concentración de 0,0001ppm, e hidróxido de sodio (NaOH) en la misma concentración.
- El medio de cultivo fue calentado para luego adicionar el agar a una concentración de 7.5g/l.
- El medio de cultivo se repartió en 40 tubos de ensayo 5ml/tubo.
- Los tubos de ensayo se sellaron con papel aluminio y se colocaron en una funda plástica, para su esterilización en el autoclave a 15 libras de presión durante quince minutos.

- Los tubos de ensayo fueron llevados al refrigerador y permanecieron en él durante quince minutos previo a su utilización.
- Los segmentos nodales se colocaron en el medio de cultivo.
- Los tubos de ensayo se sellaron con plástico osmótico, con el fin de evitar contaminación y deshidratación de los segmentos nodales.
- Los tubos así preparados fueron trasladados al cuarto de incubación con una humedad relativa del 60% y una temperatura de 24 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

3.5 VARIABLES EVALUADAS

3.5.1 Número de tubos Contaminados.

A los 10, 20, 30 días de iniciada la fase de introducción se contó los tubos contaminados, tomando como indicador el color del medio: color blanco para contaminación por patógenos y café para fenolización.

3.5.2 Longitud de la yema

A las cuatro semanas de iniciado el proceso, se midió la longitud de las yemas utilizando una regla graduada. La medición se realizó directamente a la vitroplanta durante el cambio de medio.

3.5.3 Porcentaje de Supervivencia

Al final de la fase se contabilizó el número de segmentos nodales vivos y se determinó el porcentaje de supervivencia.

3.5.4 Análisis de costos.

Se realizó un análisis de costos en base de todos los rubros que se invirtieron durante el desarrollo de la investigación.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tanto en los pre-ensayos (Primera Parte) como en los ensayos definitivos (Segunda Parte) fueron los siguientes:

PRIMERA PARTE

Los resultados se expresaron en número de tubos contaminados y revelan la eficiencia de desinfección durante los pre-ensayos realizados hasta encontrar el protocolo de desinfección más apropiado para los segmentos nodales de *Epidendrum* sp.

4.1 EFICIENCIA DE LOS PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN.

Los valores obtenidos en las distintas pruebas para cada uno de los protocolos de desinfección se detallan en Anexos Cuadro 18.

Cuadro 6. Número de tubos contaminados en la Etapa Preparatoria.

TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	TUBOS CONTAMINADOS	EFICIENCIA DE DESINFECCIÓN (%)
PROTOCOLO I	38	5
PROTOCOLO II	28	30
PROTOCOLO III	16	60
PROTOCOLO IV	6	85

En el Cuadro 6 se puede apreciar que el Protocolo IV alcanzó una eficiencia del 85%, con la presencia de seis tubos de ensayo contaminados de los 40 utilizados.

Esta observación concuerda con lo manifestado por Jiménez y Guevara (1996), quienes determinaron que las plantas que crecen en ambientes externos están contaminadas con microorganismos patógenos.

Debido a que se partió de explantes pequeños, que deben ser inoculados en un medio nutritivo favorable también para el crecimiento y multiplicación de microorganismos, es sumamente importante que el cultivo de tejidos se establezca y mantenga en condiciones asépticas, para lo cual se debe realizar un tratamiento de desinfección de las superficies expuestas.

El estado de contaminación inicial de las plantas madres fue el factor determinante para la prolongación del ensayo de desinfección. Todas las plantas fueron obtenidas del mismo invernadero, el cual no contaba, por un lado, con medidas sanitarias de acceso, tenía una estructura abierta en los flancos, lo que daba lugar al ingreso de agentes contaminantes, incluso de insectos; y, por otro lado, el riego por aspersión, provocaba salpicaduras y dispersión de potenciales agentes patógenos.

Al referirse a la absorción del hipoclorito de sodio (NaOCl), se debe considerar que las orquídeas presentan un tejido esponjoso que les ayuda a absorber agua en épocas de escasez (Walter, 1979), lo que ocasionó, probablemente, la excesiva absorción de este producto desinfectante, trayendo consigo la muerte de los segmentos nodales, por este motivo fue descartada su utilización.

Un aspecto que se debe considerar es que el Tween 20[®], por ser un bactericida eficaz y por lograr la mejor adherencia de los productos químicos de desinfección (Gutiérrez y Chen-Han, 1994), fue utilizado en todos los tratamientos de esta fase. Su dosis y tiempo de aplicación fueron incrementados gradualmente y sus resultados fueron más promisorios. La desinfección se complementó con el fungicida protectante Captan[®] 80 DF.

Se encontró que el Protocolo IV cumplió con las condiciones apropiadas de desinfección en este trabajo experimental, por lo tanto fue el utilizado en el ensayo definitivo.

SEGUNDA PARTE

4.2 EFECTO DE LA CITOQUININA 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) Y LA AUXINA ÁCIDO NAFTALÉNACÉTICO (ANA) EN LA FASE DE INTRODUCCIÓN

4.2.1 Número de Tubos contaminados.

Los valores correspondientes al número de tubos contaminados y los porcentajes calculados a los 10, 20 y 30 días durante la fase de Introducción, se detallan los (Anexos Cuadros 19, 20, 21).

Cuadro 7. Porcentaje de contaminación en segmentos nodales de *Epidendrum* sp.

TRATAMIENTOS	10 DÍAS	20 DÍAS	30 DÍAS
T1	5	10	20
T2	2.5	10	22.5
T3	10	12.5	20
T4	2.5	17.5	32.5
T5	2.5	17.5	32.5
T6	2.5	10	17.5

Cuadro 8. Número de tubos contaminados por tratamiento.

TRATAMIENTOS	10 DÍAS	20 DÍAS	30 DÍAS
T1	2	4	8
T2	1	4	9
T3	4	5	8
T4	1	7	13
T5	1	7	13
T6	1	4	7

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable Número de tubos contaminados a los 10, 20 y 30 días.

F de V	SC	gl	CM	F cal	F tab	
					0.05	0.01
Total	246.5	17				
Días	193.0	2	96.5	33.28**	3.33	5.64
Tratamientos	24.5	5	4.9	1.69 ^{ns}	4.10	7.56
Error	29.0	10	2.9			

** Significativo
 ns no significativo
 CV : 30.96%
 Promedio: 5.5

El análisis de varianza (Cuadro 9), determinó que existe una diferencia significativa al 1% para días. No se detectaron diferencias significativas para tratamientos, por lo que se asume que los componentes de cada formulación no influyeron en la contaminación de los segmentos nodales. El coeficiente de variación calculado fue del 30.96%.

Cuadro 10. Prueba de significación de DMS al 5% para días.

DÍAS	MEDIAS	RANGOS
30	9.66	A
20	5.17	B
10	1.67	C

La prueba DMS al 5% para tratamientos (Cuadro 10), detectó la presencia de tres rangos. En el primer rango se ubicó el valor encontrado a los 30 días, en el segundo a los 20 días y en el tercero a los 10 días en que fueron evaluados el número de tubos contaminados.

De los resultados obtenidos, se puede señalar que a medida que transcurre el tiempo, también se incrementa el número de tubos contaminados. Básicamente, hasta el momento se puede afirmar que la contaminación fue causada por hongos, pues se evidenció la presencia de micelio. Esta contaminación estaría atribuida a que el material vegetal empieza a necrosarse en la cicatriz de corte, sitio en el cual se observó la contaminación.

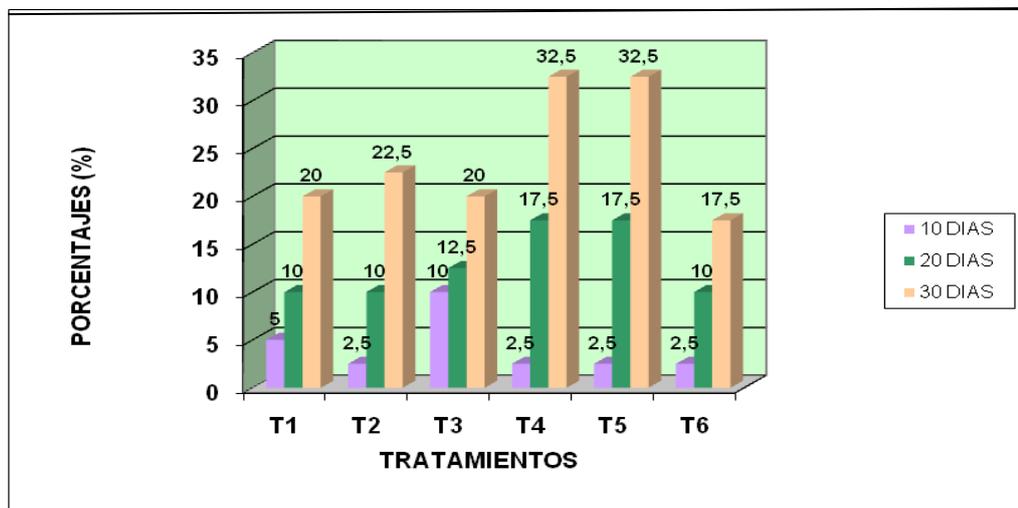


Fig. 1. Porcentaje de contaminación a los 10, 20 y 30 días en segmentos nodales de *Epidendrum* sp.

El tratamiento con menor contaminación corresponde al T6 con un valor de 2,5% a los diez días, 10% a los 20 días y 17,5% a los 30 días. Los valores registrados, pueden atribuirse a que el material vegetal utilizado provino de distintas plantas madre en diferente estado fisiológico y posiblemente en este tratamiento se incluyó material vegetal proveniente de una planta madre joven, donde la respuesta *in vitro* es adecuada y las posibilidades de contaminación por deterioro del explante disminuyen, debido a que los tejidos están en plena división celular y crecimiento, a diferencia de las plantas viejas, como reportó Krikorian (1991b), quien indica que entre los factores que afectan la micropropagación se encuentra el estado fisiológico de las plantas, en especial el factor juvenilidad.

4.2.2 Longitud de yemas

Los valores promedio para longitud de yemas a los treinta días de finalizada la fase de introducción se indican en Anexo (Cuadro 22).

Cuadro 11. Valores medios correspondientes a longitud de yemas en cm.

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T1	1.17
T2	1.22
T3	1.27
T4	1.33
T5	1.29
T6	1.19

Cuadro 12. Análisis de varianza para longitud de yemas.

F de V	SC	gl	CM	F Cal	F tab	
					0.05	0.01
Total	0.573	59				
Tratamientos	0.182	5	0.036	3.417**	2.29	3.17
Error	0.757	54	0.011			

** Significativo
CV: 8.30%
Promedio: 1.24cm

En el análisis de varianza (Cuadro 12) se observa que existen diferencias significativas al 1% entre tratamientos. El coeficiente de variación fue del 8.30%,. El promedio de longitud del brote desarrollado a partir de la yema fue de 1.24cm.

Cuadro 13. Prueba de Tukey al 5% para longitud de yemas

TRATAMIENTOS	MEDIAS	RANGOS
T4	1.33	A
T5	1.28	AB
T3	1.27	AB
T2	1.22	AB
T6	1.19	AB
T1	1.17	B

La prueba de Tukey al 5% para tratamientos (Cuadro 13), detectó la presencia de dos rangos. Siendo los tratamientos que ocupan el primer rango T4, T5, T3, T2 y T6, los que desarrollaron una mayor longitud de yema en relación al T1 que ocupa el segundo rango.

El desarrollo de las yemas en los segmentos nodales fue evidente a los 15 días de haber sido tratados con reguladores de crecimiento. Se observó un mayor desarrollo de yemas en los segmentos nodales sometidos al tratamiento T4 en concentraciones de 1.5 mg/litro de BAP y 2.0 mg/litro de ANA, que alcanzaron un promedio de 1.33 cm de longitud. Esto concuerda con lo encontrado por Jiménez y Guevara (1996), quienes reportaron un mayor crecimiento de yemas a concentraciones combinadas de 1.5 mg/litro de BAP y 2.0 mg/litro de ANA en segmentos nodales como explantes de *Phalaenopsis* sp.

Parece ser que existe una interacción de las fitohormonas utilizadas con la capacidad de absorción de los tejidos por difusión, observación señalada por Chico *et al.* (2002) quienes, trabajando con segmentos nodales de *Vitis vinifera* var. Borgoña expuestos a diferentes concentraciones de BAP y ANA, observaron un desarrollo de yemas distinto para cada formulación.

El establecimiento de esta técnica podría resultar efectiva para la propagación directa de yemas, evitando la formación de callo que demanda mayor cantidad de tiempo, como fue reportado por Lindemann *et al* (1970), en el cultivo de *Catleya* sp., el cual duró tres meses hasta formar el cuerpo protocórmico.

Con seguridad, se podría iniciar la producción a escala comercial y también iniciar la conservación *ex situ*, en un corto período de tiempo, creando bancos de germoplasma de especies amenazadas, en especial de orquídeas.

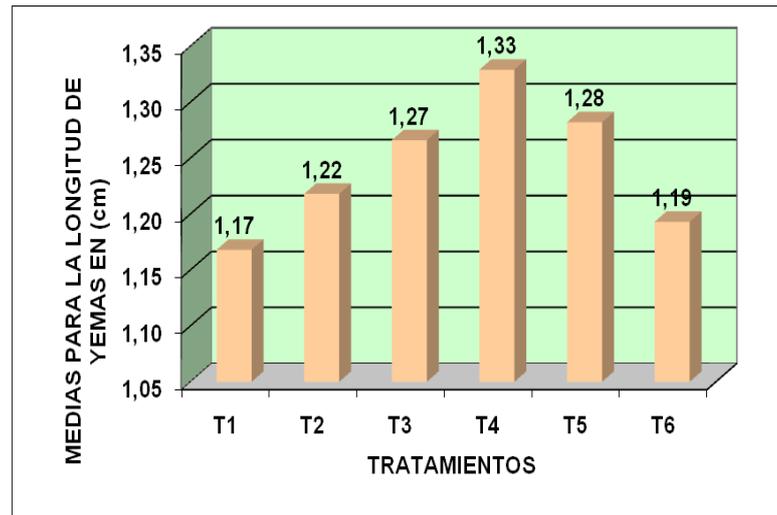


Fig. 2. Medias para la longitud de yemas de *Epidendrum* sp.

En la Fig. 2 se observa una marcada tendencia de respuesta. Desde el T1 (Testigo) al T4 (1.5mg/l BAP x 2.0mg/l ANA) la longitud de las yemas aumenta. A partir del T5 (2mg/l BAP x 2.5mg/l ANA) la longitud de las yemas decrece hasta T6 (2.5mg/l BAP x 3.0mg/l ANA). Esta última situación concuerda con los trabajos realizados por Morel (1970) quien, al usar concentraciones más altas en explantes de *Cymbidium* sp., observó que el crecimiento de los explantes fue menor en relación a las otras formulaciones con dosis inferiores a 2.5mg/l de BAP y ANA.

Es interesante notar que el tratamiento T4 con dosis de 1.5 mg/l de BAP y 2.0 mg/l de ANA, promueve la mayor longitud de las yemas en los segmentos nodales de *Epidendrum* sp. y comparte el primer rango con otros tratamientos.

4.2.3 Supervivencia

En esta variable se hizo una evaluación porcentual de los segmentos nodales al término de la Fase de Introducción. Los datos se obtuvieron a los 30 días de terminada fase de introducción.

Las medias para la variable correspondiente a supervivencia se detallan en (Anexos Cuadro 23).

Cuadro 13. Porcentaje de supervivencia en la Fase de Introducción.

TRATAMIENTOS	MEDIAS (%)
T1	92.5
T2	97.5
T3	95.0
T4	100
T5	97.5
T6	90

Cuadro 14. Análisis de varianza para Número de segmentos nodales vivos en la Fase de Introducción.

F de V	SC	gl	CM	F Cal	F tab	
					0.05	0.01
Total	9.90	59				
Tratamientos	1.083	5	0.217	1.182 ^{ns}	2.29	3.17
Error	10.983	54	0.183			

ns= no significativo

CV: 11.22%

Promedio: 3.82

En el análisis de varianza del (Cuadro 14) se determina que no existen diferencias significativas entre tratamientos por lo que se considera que no hay influencia de los componentes de los tratamientos en el número de segmentos nodales vivos. El coeficiente de variación fue del 11.22%.

Es importante notar que a pesar de que T4 fue el tratamiento con mayor porcentaje de contaminación, alcanzó el 100% de supervivencia. Se puede

afirmar que la contaminación, al estar presente en tejido necrosado de la cicatriz de corte, ubicada fuera del medio basal, no afectó a la yema en crecimiento ubicada en la parte central del segmento nodal, la cual se desarrolló normalmente.

Por el contrario, en trabajos realizados por Pierick (1960), la contaminación del medio y la mala desinfección, provocó la muerte de los explantes de *Cymbidium* sp., debido a su deficiente capacidad de absorción de nutrientes.

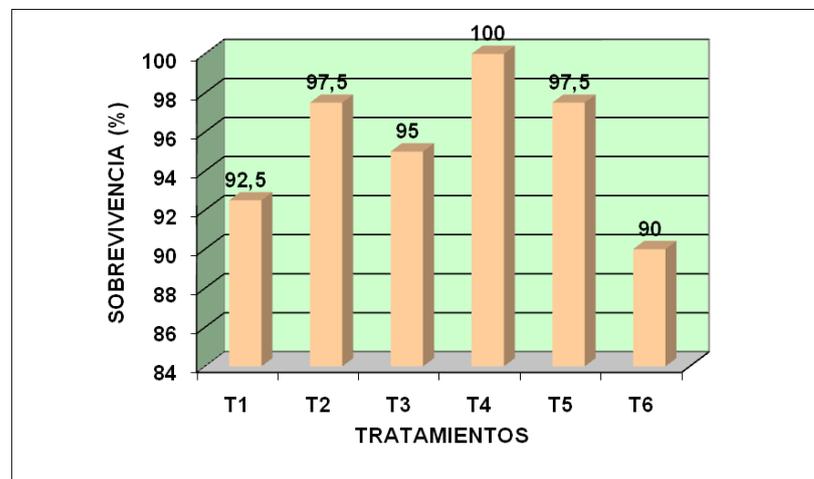


Fig. 3. Porcentajes de sobrevivencia de los segmentos nodales de *Epidendrum* sp., a los 30 días de duración de la Fase de Introducción.

En la Fig. 3 se aprecia que el tratamiento T4 presenta el mayor porcentaje de sobrevivencia (100%) al final de la Fase y el menor porcentaje de sobrevivencia se encontró en el tratamiento T6 con 90%.

4.2.4 Análisis De Costos

Cuadro 15. Costos totales para la Fase de Introducción de *Epidendrum sp.*, en (USD)

CONCEPTO	PRE-ENSAYOS	F. INTRODUCCIÓN	TOTAL (USD)	(%)
Componentes Del Medio	33.04	35.52	68.56	9.95
Reactivos	13.19	7.39	20.58	2.99
Materiales y Equipo	9.13	13.93	23.06	3.35
Otros Insumos	71.45	71.45	142.9	20.74
Personal	325	109	434	62.98
TOTAL	451.81	237.29	689.1	100.00

Producción: 229 vitroplantas.
Costo/planta: 3.00 USD.

Tomando en cuenta todos los rubros que se invirtieron desde los pre-ensayos, el costo calculado para cada vitroplanta producida fue de tres dólares. Una vez obtenido el protocolo de desinfección, cada vitroplanta de *Epidendrum sp.*, tendría un costo de: **1.04 USD.**

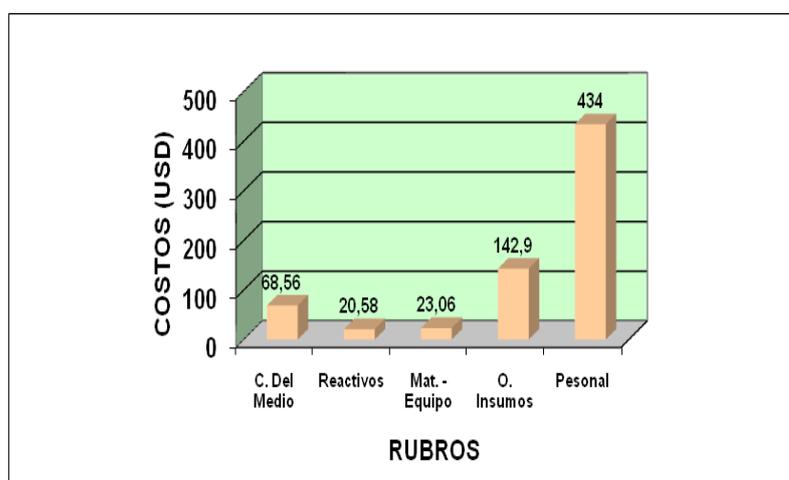


Fig. 4. Costos totales para la Fase de Introducción de *Epidendrum sp.*

En la fig. 4 el rubro más alto es el de personal con 434 USD debido a que la investigación comprendió 11 meses, el investigador debe estar en forma constante observando los cambios que experimentan los segmentos nodales diariamente.

Cuadro 16. Costos por tratamientos al final de la Fase de Introducción de *Epidendrum* sp.

Concepto	T1	T2	T3	T4	T5	T6
BAP	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
ANA	0	0.02	0.03	0.04	0.05	0.07
C. Del Medio	11.43	11.43	11.43	11.43	11.43	11.43
Reactivos	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43
Materiales y Equipos	3.84	3.84	3.84	3.84	3.84	3.84
Otros Insumos	23.82	23.82	23.82	23.82	23.82	23.82
Personal	72.33	72.33	72.33	72.33	72.33	72.33
Total (USD)	114.85	114.88	114.9	114.92	114.94	114.97
Vitroplantas vivas	37	39	38	40	39	36
Costo/vitroplanta	3.10	2.95	3.02	2.873	2.95	3.19

En el Cuadro 16, se observa que la diferencia en costos por tratamiento está determinado por las dosis de fitohormonas utilizadas y el número de plantas vivas al finalizar la fase de Introducción.

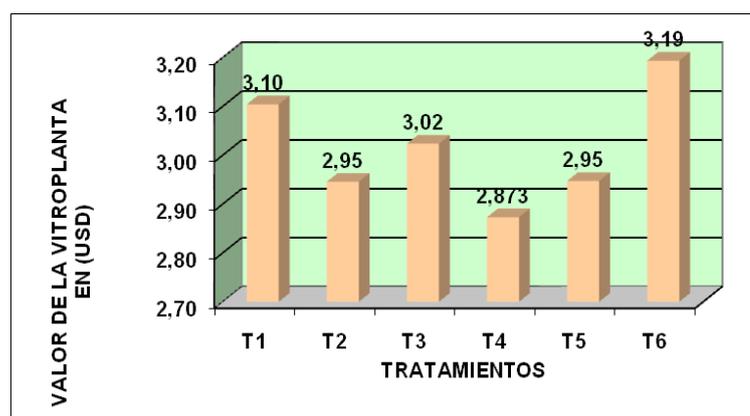


Fig. 5. Costos de vitroplantas de *Epidendrum* sp., por tratamientos al finalizar la fase de Introducción (USD)

En la Fig. 5 se muestra que el costo más alto correspondió al tratamiento T6, debido a que en éste las dosis de fitohormonas fueron más altas y el porcentaje de sobrevivencia fue menor. Mientras que el costo más bajo se encontró en el tratamiento T4, ya que alcanzó el 100% de sobrevivencia.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

De los resultados del trabajo experimental se pueden extraer las siguientes conclusiones.

1. Las dos fitohormonas utilizadas en la fase de introducción de la orquídea *Epidendrum* sp., bajo condiciones *in vitro* promovieron el crecimiento de las yemas en estado latente trayendo consigo la formación de una vitro-planta completa con la formación de raíces.
2. El protocolo de desinfección que dio el mejor resultado en los pre-ensayos correspondió a la cuarta desinfección, en la que se utilizó: jabón líquido por 30 minutos para el lavado de segmentos de tallo, Tween 20[®] 15 ml/l durante 20 minutos, fungicida Captan[®] 80% DF en dosis de 1g/l durante 5 minutos. Este protocolo se utilizó en el desarrollo de la investigación y comprendió, además, dentro de la cámara flujo laminar el uso de alcohol al 70% de concentración por un minuto, agua oxigenada al 3% por un minuto y enjuague con agua estéril por tres ocasiones, durante dos minutos, para eliminar cualquier residuo químico remanente.
3. El hipoclorito de sodio (NaOCl) provocó serios daños y muerte de los tejidos en los segmentos nodales por lo que se descartó su utilización en el protocolo definitivo, y se aumento la dosis de Tween[®] 20 mejorando la eficiencia de desinfección al 85%.

4. En cuanto al número de tubos contaminados el T6 obtuvo el menor porcentaje de contaminación en relación de los demás tratamientos, debido a que no existió necrosamiento en la cicatriz de corte, sitio donde se presentó la contaminación por hongos saprofitos propios del material vegetal muerto en los demás tratamientos.
5. Se logró la mayor longitud de yema con 1.5mg/l de 6-Benzilaminopurina (BAP) y 2.0mg/l de Ácido naftalénacético (ANA), correspondientes a T4 a pesar que fue el tratamiento que presentó mayor contaminación con esto se concluye que la contaminación de los segmentos nodales no influye en su desarrollo, cuando esta no sea proveniente del medio o por una mala desinfección de los segmentos nodales, además se alcanzó un desarrollo de raíces consiguiendo la formación de una vitroplanta completa.
6. En lo que respecta a la variable porcentaje de sobrevivencia, no se detectaron diferencias significativas, pero cabe recalcar que el tratamiento T4 alcanzó el 100% de sobrevivencia al final de la Fase de Introducción.
7. El costo unitario de cada vitroplanta en la fase Introducción, incluidos los pre-ensayos considerados todos los tratamientos fue de 3.00 USD. Con el tratamiento T4 se logró el costo más bajo, con un costo de 2.87 USD, debido a que todas las vitroplantas sobrevivieron, resultando un costo relativamente bajo. A esto se suman los beneficios que ofrece una planta reproducida en estas condiciones: un período más corto para la floración, características genotípicas idénticas a las de la planta madre. Valor comercial más atractivo frente a las plantas propagadas en condiciones de vivero, cuyo costo asciende a 25 USD y no presentan garantía de identidad genética.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos y para futuras investigaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* de orquídeas y para aumentar las probabilidades de éxito en la Fase de Introducción, se recomienda:

1. Realizar la preparación de las plantas madre por lo menos con tres meses de anticipación, en un ambiente adecuado, para que no se presenten problemas al momento de introducir el material vegetal al cultivo *in-vitro*. Si fuera el caso, restringir el acceso al invernadero, procurar un riego localizado para cada planta y realizar aplicaciones apropiadas de protectantes.
2. Se recomienda utilizar dosis de 1,5mg/l de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2,0mg/l de Àcido naftalenacético (ANA) para la reproducción de otras especies de orquídeas.
3. Transferir los segmentos nodales antes de los treinta días para evitar la contaminación en la cicatriz de corte.
4. Difundir información acerca de esta técnica de modo que las entidades gubernamentales y no gubernamentales puedan hacer uso de la misma para mantener bancos de germoplasma de material vegetal valioso para la región Norte del país.
5. Realizar la continuación del estudio con las fases de micropropagación y acondicionamiento *ex - vitro* de la orquídea *Epidendrum* sp.

CAPÍTULO VII

RESUMEN

EFFECTO DE DOS FITOHORMONAS EN LA FASE DE INTRODUCCIÓN DE LA ORQUÍDEA *Epidendrum* sp. BAJO CONDICIONES *In Vitro*.

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo para el cultivo inicial de la orquídea *Epidendrum* sp., mismo que consiste en obtener la desinfección adecuada, para los segmentos nodales y observar la respuesta de estos sometidos a diferentes dosis de fitohormonas.

La investigación se desarrolló durante el año 2009, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en la Provincia de Imbabura, Cantón Ibarra, Parroquia Caranqui, a una altitud de 2 254 msnm.

El trabajo comprendió dos partes. En la primera se determinó el Protocolo de desinfección para segmentos de tallo. El 85% de eficiencia correspondió a la combinación de 50 ml/l de jabón líquido durante por 30 minutos; inmediata inmersión por 20 minutos en solución de 15ml/l de Tween[®] 20; y, lavado con una solución de 1000 mg/l de Captan[®] 80, durante 5 minutos. Dentro de la cámara de flujo laminar se utilizó alcohol al 70% y agua oxigenada al 3% por un minuto; y, enjague con agua estéril por dos minutos, en tres ocasiones. En la segunda parte, se probaron seis tratamientos en dosis combinadas de la auxina ácido naftalenacético (ANA) y la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones incluyendo el testigo sin fitohormonas. Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) para evaluar las variables:

longitud de la yema y porcentaje de sobrevivencia y el Diseño Bloques Completos al Azar (DBCA) para la variable número de tubos contaminados. Se realizaron diez repeticiones y cuatro tubos de ensayo por unidad experimental. Cuando se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey al 5%.

Los segmentos nodales preparados dentro de la cámara de flujo laminar, se insertaron en medio de cultivo; los tubos de ensayo se sellaron con plástico osmótico y se trasladaron al cuarto de incubación alternando 16 horas luz con ocho de oscuridad a una temperatura de 25° C.

El ADEVA detectó diferencias significativas al 1% en la variable Número de tubos contaminados debidas a bloques (días). Al no encontrar diferencias entre tratamientos, se concluyó que los componentes del medio no influyen en la contaminación. En la variable Longitud de yemas se detectaron diferencias significativas atribuidas a tratamientos. T4 (1.5mg/l BAP x 2.0mg/l ANA) alcanzó la media más alta con 1,33cm de longitud y la presencia de raíces, obteniéndose de esta forma una vitro-planta completa. En cuanto a la Sobrevivencia de los segmentos nodales, no se detectaron diferencias significativas. T4 obtuvo el 100% de sobrevivencia.

Se recomienda utilizar el Protocolo de desinfección desarrollado, para estudios de multiplicación in vitro de *Epidendrum* sp. y otras orquídeas; probar la longitud de los segmentos nodales para el proceso de incubación; evaluar el comportamiento de la vitroplanta en las fases de micropropagación y acondicionamiento *ex-vitro*; y, asegurar la idoneidad del material a utilizar, mediante la ejecución de un programa de desinfección de plantas madre.

CAPÍTULO VIII

SUMMARY

DETERMINE THE EFFECT OF THE TWO PHYTOHORMONES IN THE PHASE OF INTRODUCTION OF THE ORCHID *Epidendrum* sp., IN THE CONDITIONS *In Vitro*.

The objective of the present study was to determine the effect of the following investigation was developed in the Laboratory of Biotechnology Vegetal of the Technical University of Loja, which is located in the Province of Loja, City Loja, and Parish Loja with an altitude of 2254 msnm.

The investigation consisted of two parts: In the first part, a disinfecting treatment was applied to stem segments of *Epidendrum* sp. during the year 2009. In the second part, a statistical analysis was used, but a perceptual analysis was also performed. The effective disinfecting treatment consisted of 50 ml/l liquid soap (30 minutes respectively), immediately immersion in Captan 80% @ 1 gr/l (5 minutes). Within the laboratory, the explants were immersed in 70% alcohol and hydrogen peroxide for (one minute) and washed with sterile water for two minutes. In the second part, experimental work was developed with six treatments containing Murashige Skoog (MS) medium with different doses of phytohormones: auxin naphthaleneacetic acid (ANA) and cytokinin 6-Benzilaminopurine (BAP) excepting a control. The evaluation factors were the number of contamination tubes, leaf length and perceptual survival. Used (DCA) and (DBCA) for variable number of contamination tubes, for the evaluation of variables in which it was determined significant differences used the Tukey test at 5%.

The nodal segments was inoculate in aseptic medium, and collocated en the room incubation with temperature 25 °C and 16 hours lux, eight hours of obscure.

In the variable number of contamination tubes detected significant differences at 1% for days, in evaluate variable not detected significances for treatments, but not influence the components of the medium. There were significant differences found in the variable length leaf, considered of T4 obtain the 1,33cm the length, the vegetative buds produced leaves and roots. In the perceptual survive not detected differences but T4 obtained 100% of survive.

For future investigations recommend continue with other phases micropropagation and conditioned *ex-vitro* the orchid *Epidendrum* sp., besides make treatment the plants with systemic poison before introduction *in vitro* and used the treatment disinfecting developed for *Epidendrum* sp.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. ABDELNOUR, A. Y MUÑOZ, A. 1997. Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión. pp 4-10. Disponible: [www.cultivo in vitro de orquídeas, org.htm](http://www.cultivo.in vitro de orquídeas.org.htm).(consulta 10-07-09)
2. ABDELNOUR, A. Y VINCENT, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Cartago, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 38 p.
3. AMERICAN ORCHID SOCIETY. 1995. El cultivo de las cattleyas y sus híbridos. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. Por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 48-49.
4. AMERICAN ORCHID SOCIETY. *Cattleya maxima* comment. (<http://www.orchidworks.com/orchids/cattleya/maxima-c.htm>). 1996. (Consulta 07-07-09)
5. ARENA, M., y MARTINEZ, G., (1992). El cultivo in Vitro en la propagación de plantas. PROVEG (Programa de recursos vegetales y desarrollo fruti hortícola) del CADIC. Disponible en: [www.cadicush, org. ar/proveg.htm](http://www.cadicush.org.ar/proveg.htm).(Consulta 03-03-08).
6. ARDITTIT, J Y ERNETS, R. 1993. Micropropagation of orchids. New York, United States of America. John Waley & Sons, Inc. pp 25-86,199-240.Disponible:www.cultivo de orquídeas/htm.(Consulta 05-06-09)
7. BARRAGAN, R., (1997) Principios de Diseño Experimental. 12-25pp.
8. CANERA, (1984) Generalidades de las orquídeas.
9. DRESSLER, R.L. 1993. Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama. New York, Estados Unidos de América. Cornell University Press. 374 p.

10. DYCHDALA, G.R. 1977. Disinfection, Sterilisation and Preservation. In: Block ss (ed). Philadelphia, United States of America. Lea and Sebiger. pp 167-195. Disponible: www.protocolos de desinfección orquídeas.
11. ECHEVERRÍA, M., (1997) Propagación in Vitro de Nogal (Junglas neotropica diles) Tesis de Ingeniería Forestal. UTN. Ibarra- Ecuador. 64pp.
12. FAST, 1980. Orchideen Kulture. Verlag E. Ulmer, Stuttgart: 1-460. Flores, E. 1998. La Planta: estructura y función. 2 ed. Cartago, Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 501 p. Disponible: www.plantas estructura htm.. (Consulta 18-08-09).
13. FÉRRAES, L., (2000), Las Orquídeas en los Tuxtla. Edición libre. Documento circulación limitada, 65pp.
14. FOLDATS, (1969), Orchidaceae, flora of Venezuela. Volumen 5.
15. GARCÍA, J. 1995. La Subtribu Laeliinae: las *Epidendrum* y sus parientes. En: Orquídeas de y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. Disponible en www.orquideoteca.com (Consulta 05-05-09).
16. GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture Part 1: The Technology. 2ed. England. Exegetics Ltda. 574 p. Disponible en: [www. Tecnología del cultivo de orquídeas.ã.2003](http://www.Tecnología del cultivo de orquídeas.ã.2003). (Consulta 07-07-09)
17. GONZÁLEZ, F. 1995. Presentación. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 4-5.
18. GUTIÉRREZ, C. y CHEN-HAN, J. 1994. Propagación clonal *in vitro* de *Cattleya* por medio de meristemos. Instituto Nacional de Aprendizaje. 13 p.
19. HOMES *et al.* 1972. Bull. Soc. Roy. Belg. 106: 123-128
20. HORICH, C. 1980. Las Cattleyas en Costa Rica. En: Orquídeas: su cultivo en Costa Rica. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Impresora Delta, S.A. pp 9-11. Disponible en: www.orquideas.com (consulta 05-05-09).

21. HUANG, L. C. 1984. Alternative media and method for *Cattleya* propagation by tissue culture. American Orchid Society Bulletin. 53:167-170. Disponible: [www.propagación orquídeas](http://www.propagación_orquídeas) (Consulta 14-12-08).
22. HUDSON, T., Hartmann y DALE, E. Kester, (1987) Propagación de plantas, principios y prácticas. Primera edición. Compañía Editorial Continental. S.A. México 575, 576, 576 pp.
23. INTUWONG, O.; KUNISAKI, J.T.; Y 1972. Vegetative propagation of Phalaenopsis by flower stalk cuttings. Na Okika of Hawaii 1:13-18. Disponible: www.orquideas.com/invitro (consulta 12-11-08).
24. JIMENEZ y GUEVARA: Propagación in vitro de Phalaenopsis mediante cultivo in vitro.
25. KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin. 15: 214-217.
26. KRIKORIAN, A.D. 1991a. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 41-78.
27. KRIKORIAN, A.D. 1991b. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 95-125.
28. KUAN, C. y GONZÁLEZ, L. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. pp 1-16, 47-53, 75-76.
29. LEFFRING. 1968. Meded. Dir. Tuinbouw. 31: 392-395.
30. LINDEMANN, E. G. P.; GUNKENL, J. E. y DAVISON, O. W. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. American Orchid Society Bulletin. 39: 1002-1004.
31. LITZ, R.E y JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura.
32. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 143-172.

33. MORA, D y WARNER, J. 1995. La conservación de las orquídeas en el Jardín Botánico
34. LANKESTER. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. Litografía e Imprenta LIL. pp 54-55.
35. MORA-RETANA, D. y García, J. 1992. Lista actualizada de las orquídeas (Orchidaceae). En: Brenesia. (37). Ed. Por Departamento de Historia Nacional. pp 79-124.
36. MOREL, G. M. 1960. American Orchid Society Bulletin. 29: 495-497.
37. MOREL, G. M. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymb. Soc.
38. MOREL, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. En: The Orchids: Scientific studies. Ed. por Withner C.L. New York, United States of America. John Wiley and Sons. pp 169-222.
39. MROGINSKI, L. A. y Roca, W. M. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 19-40.
40. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiology. 25:135-166.
41. MURASHIGE, T. 1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. Botanical Bulletin of the Academia Sinica. 18:1-24.
42. MURASHIGE, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15:473-497.
43. PIERIK, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. Dordrecht, The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers. 343 p.
44. QUESADA, A. 1997. Interpretación de los sectores y senderos del Jardín Botánico
45. LANKESTER. Tesis para optar el grado de licenciatura con énfasis en interpretación ambiental. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 137 p.

46. Reinert, R. A. y Mohr, H. C. 1967. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristem. *Pro. Am. Soc. Sci.* 91: 664-671.
47. RODRÍGUEZ, R. 1995. Orquídeas y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. Litografía e Imprenta LIL. Pp 31-35.
48. RODRÍGUEZ, R.; Mora, D; Barahona, M. y Williams, N. 1986. Orquídeas de Costa Rica. San José, Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 336 p. Disponible en: <http://www.orchidworks/maxima-c.htm>). (Consulta 06-03-09)
49. SCULLY, R.M. Jr. 1967. Aspects of meristem culture un *Cattleya* Alliance. *American Orchid Society Bulletin.* 36: 103-108.
50. SEQUEIRA, R. 1980. Algunos datos históricos sobre las orquídeas. En: Orquídeas: su cultivo. Ed. por la Asociación Peruana de Orquideología. Impresora Delta, S.A. pp 3-7.
51. SEVERIN et al, Efecto de fitorreguladores y estudio histológico de la regeneración in Vitro de *A. Saturoides* 2008 Caribe.
52. THORPE, T. A. 1980. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. En: Vasil, I. K (ed). *Perspectives in plant cell and tissue culture.* Academic Press, Nwe York, pp 71-111.
53. VACIN, E. F. y Went, F. W. 1949. Some pH changes in natural solutions. *But. Gaz.* 110: 605-613.
54. VILLALOBOS, V.M. y Thorpe, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 127-141.
55. WARNER, J. 2000. Descripción botánica del híbrido *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima*. Jardín Botánico Lankester. Cartago, Costa Rica.
56. WHITE, J., (1996) *Orchids.* Frances Tenenbaum, Series Editor. New York: Houghton-Mifflin.

CAPÍTULO X

ANEXOS

Cuadro 17. Composición Preparación del Medio de cultivo Murashige Skoog (MS).

STOCKS	GRAMOS	PREPARACIÓN
STOCK I		
NH ₄ NO ₃ KNO ₃ MgSO ₄ .7H ₂ O KH ₂ PO ₄	16,5g 19g 3,7g 1,7g	- Disolver en 200ml de agua destilada. - Conservar la solución en un frasco a 4 °C. - - Tomar 20ml de Stock para un litro de solución.
STOCK II		-
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	- Disolver en 100ml de agua destilada. - Conservar la solución en un frasco a 4 °C. - Tomar 10ml de Stock para un litro de solución.
STOCK III		
MnSO ₄ .H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O H ₃ BO ₃ KI Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O	0,676g 0,344g 0,248g 0,332g 0,01g 0,001g	- Disolver en 100ml de agua destilada. - Conservar la solución en un frasco a 4 °C. - - Tomar 10ml de Stock para un litro de solución.
STOCK IV		
FeSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,278g 0,373g	- Disolver en 100ml de agua destilada. - Conservar la solución en un frasco a 4 °C. - - Tomar 10ml de Stock para un litro de solución.
VITAMINAS		-
Inositol Nicotínico Piridoxina Glicina Tiamina	1g 0,001g 0,01g 0,02 0,002g	- Disolver en 100ml de agua destilada. - Conservar la solución en un frasco a 4 °C. - - Tomar 5ml de Stock para un litro de solución.
Sucrosa	30g	- En un litro de medio.
Agar	7,5g	- Calentar el medio y luego agregar en un el agar.

Fuente: WHITE, J., (1996)

Cuadro 18. Número De Tubos Libres De Contaminación En Los Pre-Ensayos

TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Σ	% DESINFECCIÓN
PROTOCOLO I	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	5
PROTOCOLO II	1	1	1	0	2	0	0	1	2	4	12	30
PROTOCOLO III	2	3	2	4	2	1	1	4	1	2	22	60
PROTOCOLO IV	4	4	4	2	3	4	4	4	4	3	36	85
Σ											72	

Cuadro 19. Tubos de ensayo libres de contaminación a los 10 días de la Fase de Introducción.

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Σ	X	% DESINFECCIÓN	% CONTAMINACIÓN	
T1	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	38	3.8	95	5	
T2	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	39	3.9	97.5	2.5	
T3	4	4	4	4	2	4	4	4	3	3	36	3.6	90	10	
T4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	39	3.9	97.5	2.5	
T5	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	39	3.9	97.5	2.5	
T6	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	39	3.9	97.5	2.5	
												230	3.83		

Cuadro 20. Tubos de ensayo libres de contaminación a los 20 días de la fase de Introducción.

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Σ	X	% DESINFECCIÓN	% CONTAMINACIÓN	
T1	4	3	4	4	3	4	4	3	3	4	36	3.6	90	10	
T2	4	4	3	4	3	4	3	3	4	4	36	3.6	90	10	
T3	4	4	3	4	2	4	4	4	3	3	35	3.5	87.5	12.5	
T4	4	4	2	4	4	4	3	3	3	2	33	3.3	82.5	17.5	
T5	4	4	3	3	3	4	2	3	4	3	33	3.3	82.5	17.5	
T6	4	4	3	4	4	4	3	2	4	4	36	3.6	90	10	
												209	3.48		

Cuadro 21. Segmentos nodales libres de contaminación a los 30 días de la fase de Introducción.

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Σ	X	% DESINFECCIÓN	% CONTAMINACIÓN
T1	3	4	3	2	3	3	3	3	4	4	32	3.2	80	20
T2	3	3	4	3	3	3	3	2	4	3	31	3.1	77.5	22.5
T3	4	3	3	2	3	3	4	3	4	3	32	3.2	80	20
T4	4	2	2	4	2	3	2	3	2	3	27	2.7	67.5	32.5
T5	2	3	3	2	2	3	2	3	3	4	27	2.7	67.5	32.5
T6	4	2	3	4	3	3	4	3	3	4	33	3.3	82.5	17.5
											182	3.03		

Cuadro 22. Longitud de yemas en cm.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES											Σ	x
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			
T1	1.07	1.07	1.07	1.25	1.1	1.1	1.25	1.2	1.25	1.32	11.68	1.17	
T2	1.07	1.09	1.15	1.15	1.4	1.3	1.15	1.25	1.3	1.32	12.18	1.22	
T3	1.32	1.07	1.4	1.1	1.25	1.2	1.3	1.32	1.32	1.38	12.66	1.27	
T4	1.4	1.36	1.4	1.15	1.25	1.3	1.35	1.38	1.38	1.32	13.29	1.33	
T5	1.21	1.3	1.25	1.36	1.25	1.32	1.35	1.36	1.1	1.32	12.82	1.28	
T6	1.15	1.2	1.15	1.15	1.16	1.25	1.36	1.25	1.36	0.9	11.93	1.19	
Σ												74.56	7.46
X													1.24

*Cada valor corresponde al promedio de cuatro tubos de ensayo.

Cuadro 23. Número de Segmentos Nodales vivos al finalizar la Fase de Introducción.

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Σ	X	% SOBREVIVENCIA
T1	3	4	3	4	3	4	4	4	4	4	37	3,7	92,5
T2	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	39	3,9	97,5
T3	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	38	3,8	95
T4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40	4	100
T5	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	39	3,9	97,5
T6	4	4	3	3	4	4	4	4	4	2	36	3,6	90
											229	3,82	

Cuadro 24. Costos para los Pre-ensayos.

CONCEPTO	Unidad	Cantidad	Costo U.	Total (USD)
COMPONENTES DEL MEDIO				
MS completo	g	104.1	0.3	31.23
Sucrosa	g	22.5	0.015	0.34
BAP	mg	5.25	0.02	0.105
ANA	mg	6.75	0.02	0.135
Glicina	mg	6	0.2	1.2
Tiamina	mg	0.15	0.2	0.03
Subtotal				33.04
REACTIVOS				
Tween 20	ml	90	0.04	3.6
Jabón Líquido	l	1	2.25	2.25
Alcohol Antiséptico	l	4	0.3	1.2
Alcohol Potable	l	0.5	0.29	0.145
Cloro	l	1	0.8	0.8
Savlon	ml	250	0.006	1.5
Povidine	ml	250	0.005	1.25
Sani	ml	250	0.009	2.25
Captan	gr	12	0.016	0.192
Subtotal				13.19
MATERIALES Y EQUIPOS				
Tubos de Ensayo	Tubo	240	0.02	4.8
Vasos de Precipitación 1000ml	Vaso	5	0.006	0.03
Vasos de precipitación 600ml	Vaso	3	0.004	0.012
Balón de Aforo 1000ml	Balón	1	0.025	0.025
Probeta 100ml	Probeta	4	0.0079	0.0316
Agitador de Vidrio	Agitador	2	0.0052	0.0104
Embudo	Embudo	1	0.0068	0.0068
Piceta	Piceta	1	0.002	0.002
Pipeta ml	Pipeta	1	0.0056	0.0056
Pipeta 25ml	Pipeta	1	0.009	0.009
Agitador Magnético	Agitador	1	0.0038	0.0038
Cocineta Eléctrica	Cocineta	1	0.01	0.01
Destilador de Agua	Destilador	1	0.9	0.9
Balanza Analítica	Balanza	1	0.3	0.3
Autoclave	Autoclave	1	2.28	2.28
Cámara de Flujo Laminar	Cámara	1	0.7	0.7
Subtotal				9.13
OTROS INSUMOS				
Plantas de Epidendrum sp.	Plantas	40	1.25	50
Bisturís	Bisturí	30	0.25	7.5
Papel Filtro	Pliego	1	0.95	0.95
Papel Toalla	Rollos	2	3.25	6.5
Papel Aluminio	Rollos	1	3.5	3.5
Plástico osmótico	Rollos	3	1	3

Subtotal				71.45
PERSONAL				
Investigadora	Investigadora	1	325	325
Subtotal				325
TOTAL				451.80

Cuadro 25. Costos para la fase de Introducción.

CONCEPTO	Unidad	Cantidad	Costo U.	Total (USD)
COMPONENTES DEL MEDIO				
MS completo	g	104.1	0.3	31.23
Sucrosa	g	90	0.015	1.35
BAP	mg	10.5	0.02	0.21
ANA	mg	13.5	0.02	0.27
Glicina	mg	12	0.2	2.4
Tiamina	mg	0.3	0.2	0.06
Subtotal				35.52
REACTIVOS				
Tween 20	ml	90	0.04	3.6
Jabón Líquido	l	1	2.25	2.25
Alcohol Antiséptico	l	4	0.3	1.2
Alcohol Potable	l	0.5	0.29	0.145
Captan	gr.	12	0.016	0.192
Subtotal				7.39
MATERIALES Y EQUIPOS				
Tubos de Ensayo	Tubo	480	0.02	9.6
Vasos de Precipitación 1000ml	Vaso	5	0.006	0.03
Vasos de precipitación 600ml	Vaso	3	0.004	0.012
Balón de Aforo 1000ml	Balón	1	0.025	0.025
Probeta 100ml	Probeta	4	0.0079	0.0316
Agitador de Vidrio	Agitador	2	0.0052	0.0104
Embudo	Embudo	1	0.0068	0.0068
Piceta	Piceta	1	0.002	0.002
Pipeta ml	Pipeta	1	0.0056	0.0056
Pipeta 25ml	Pipeta	1	0.009	0.009
Agitador Magnético	Agitador	1	0.0038	0.0038
Cocineta Eléctrica	Cocineta	1	0.01	0.01
Destilador de Agua	Destilador	1	0.9	0.9
Balanza Analítica	Balanza	1	0.3	0.3
Autoclave	Autoclave	1	2.28	2.28
Cámara de Flujo Laminar	Cámara	1	0.7	0.7
Subtotal				13.93
OTROS INSUMOS				
Plantas de <i>Epidendrum</i> sp.	Plantas	40	1.25	50
Bisturís	Bisturí	30	0.25	7.5
Papel Filtro	Pliego	1	0.95	0.95

Papel Toalla	Rollos	2	3.25	6.5
Papel Aluminio	Rollos	1	3.5	3.5
Plástico osmótico	Rollos	3	1	3
Subtotal				71.45
PERSONAL				
Investigadora	Investigadora	1	109	109
Subtotal				109
TOTAL				237.28
TOTAL INVESTIGACIÓN				689,08

FOTOGRAFÍAS PRIMERA PARTE

Fotografía 1. Protocolos de desinfección I y II.



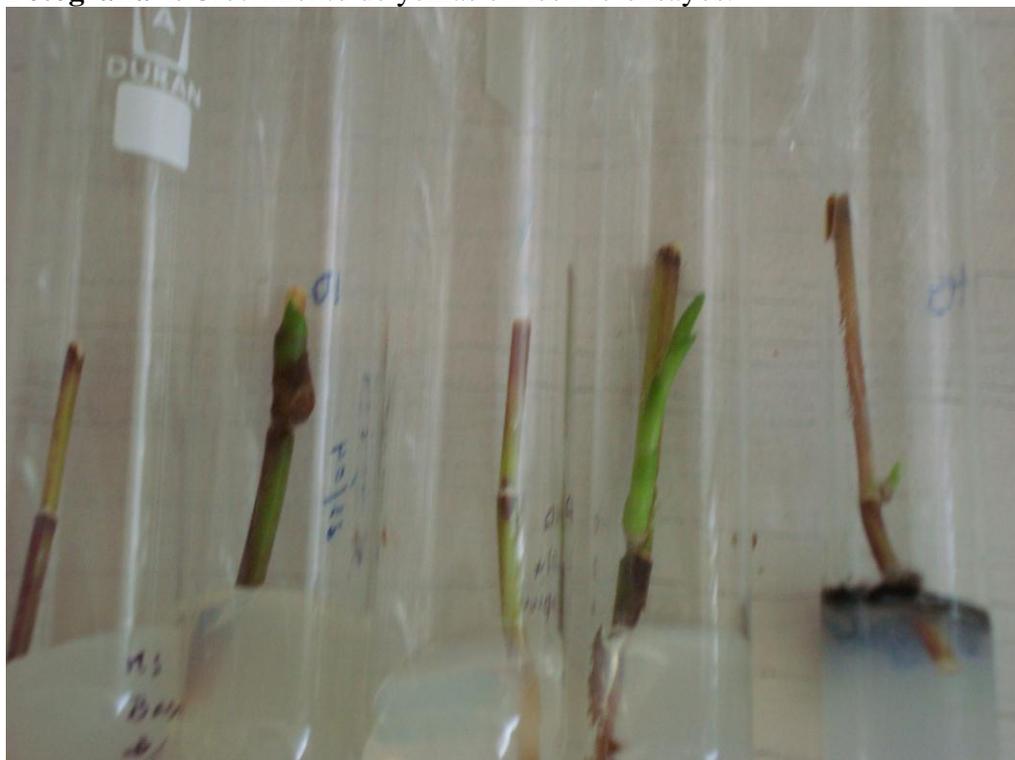
Fotografía 2. Protocolo de desinfección III.



Fotografía 3. Protocolo de desinfección IV



Fotografía 4. Crecimiento de yemas en los Pre-ensayos.



FOTOGRAFÍAS SEGUNDA PARTE

Fotografía 1. Planta Madre de *Epidendrum* sp.



Fotografía 2. Flor de *Epidendrum* sp.



Fotografía 3. Formulación de los Medios de Cultivo.



Fotografía 4. Esterilización de los medios de cultivo.



Fotografía 5. Preparación de la Cámara de Flujo Laminar.



Fotografía 6. Lavado del Material Vegetal.



Fotografía 7. Lavado del Material Vegetal con Captan[®] 80% DF.



Fotografía 8. Desinfección de los segmentos de tallo en la Cámara de Flujo Laminar.



Fotografía 9. Obtención Segmentos Nodales.



Fotografía 10. Inoculación de los Segmentos Nodales al medio de Cultivo.



Fotografía 11. Segmentos nodales dentro del Cuarto de Incubación.



Fotografía 12. Tratamientos en estudio a los 30 días de la Fase de Introducción.



Fotografía 13. Vitroplanta en T4 a los 30 días de la Fase de Introducción.

