

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Las orquídeas u orquidáceas (Orchidaceae) son una familia de plantas monocotiledóneas que se distinguen por la complejidad de sus flores y por sus interacciones ecológicas con los agentes polinizadores y con los hongos con los que forman micorrizas. La familia comprende aproximadamente 25,000 especies (algunas fuentes informan de 30 000), por lo que resulta ser una de las familias con mayor riqueza específica entre las angiospermas. A esta diversidad natural se le suman 60,000 híbridos y variedades producidas por los floricultores. Las orquídeas pueden ser reconocidas por sus flores de simetría fuertemente bilateral, en las que la pieza media del verticilo interno de tépalos llamada labelo está profundamente modificada, y el o los estambres están fusionados al estilo, al menos en la base (Stevens, 2008).

Las orquídeas son plantas herbáceas perennes de la familia clase (Monocotiledóneas). Se calcula que en el mundo existen más de treinta mil especies. Son más abundantes en los trópicos, aunque también hay especies en las zonas templadas, con rangos altitudinales que varían desde el nivel del mar hasta los sub páramos. Algunas viven sobre las ramas de los árboles (epífitas), otras en el suelo, sobre rocas e incluso en ambientes subterráneos o semiacuáticos. Las orquídeas tienen dos tipos básicos de crecimiento: simpodial, en las que el nuevo crecimiento se produce a partir de una yema axilar en sentido horizontal, y monopodial, en las que el nuevo crecimiento se produce a partir de una yema apical en sentido vertical, como es el caso de *Phalaenopsis*. (Escobar y Múnera, 1990); citado por (Naranjo, Tirado, & Atehortua, 2005).

Las plantas epífitas (orquídeas) son un producto evolutivo de la gran lucha para sobrevivir en los bosques y selvas tropicales húmedos, que son los ecosistemas terrestres más diversos y complejos del planeta. De esta diversidad, 30-50% de las especies son epífitas, es decir, que habitan en la copa de los árboles. Aportan el 5% de la biomasa total del ecosistema y han dejado atrás la asociación con la tierra, usando como soporte las copas de los árboles. Son parásitas mecánicas y evitan la necesidad de producir troncos, tallos y ramas, así como células, órganos y estructuras reforzadas que tiene la mayoría de las plantas.

Por la carencia de estudios y datos innegables del grado de amenaza que sufren las especies epífitas en la reserva de Sama (orquídeas silvestres), la prioridad de conservación, el grado de degradación o amenaza de las mismas y la frecuencia creciente con que se observan ejemplares de origen silvestre en el comercio, nos muestran un panorama alarmante por lo que es necesario elaborar un protocolo de reproducción in vitro para la conservación y en un futuro una reforestación puesto que otra opción sería la creación de un banco de germoplasma. Las orquídeas se asocian con hongos endomycorrhizas que forman colonias en sus raíces y se benefician mediante la digestión de partes del cuerpo del hongo o sus desechos y secreciones. Luego guardan la humedad y nutrientes adquiridos en sus hojas y bulbos. (Benzing, 1990).

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a las semillas, células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. También se lo conoce como “cultivo in vitro de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio (hoy también de otros materiales). Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero recién en 1922 se logró el primer experimento exitoso: la germinación in vitro de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias).

## **1.2 Justificación**

La multiplicación de plantas de orquídeas de manera sexual y natural es un proceso que en un medio natural tiene índices muy pocos de germinación, pero gracias a la técnicas de multiplicación in vitro es una alternativa que suministrando los nutrientes suficientes en un medio artificial con un adecuado manejo y el establecimiento de un protocolo para estas plantas se pueden obtener números elevados de plantas por capsula para que estas se desarrollen.

## **1.3 Problema**

Las orquídeas producen miles de semillas, poseen bajos porcentajes de germinación en condiciones naturales, el endospermo que rodea al embrión es muy reducido o no existe; por lo tanto, las orquídeas han desarrollado relaciones simbióticas con hongos que digieren la materia orgánica y transfieren los carbohidratos al embrión.

El desconocimiento de sistemas de reproducción de especies exóticas, como las orquídeas u **orquidáceas** (*Phalaenopsis* sp), impiden que se generen capacidades de reproducción in situ de

esta especie, y se garantice el proceso de adaptación a las condiciones ambientales de Tarija, lo que provoca la introducción de esta especie con costos de venta son elevados.

Es importante contar con un protocolo de propagación, que permita la multiplicación de las orquídeas; de esa manera se incrementaría la expansión del comercio de estas flores, sin riesgo para el ecosistema.

Debido a estos problemas es que se pretende trabajar en el laboratorio para poder obtener mayor número de plantas por semilla utilizada con mayores índices de germinación ya que se conoce que las semillas de orquídeas son muy pequeñas, 1-2mm de largo y 0.5-1mm de ancho se producen en cantidades elevadas por cápsula: 1300 – 4000 representando el cultivo in vitro la mejor alternativa para la germinación de estas

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar la producción de plantas de orquídeas a través de semillas bajo la técnica de micro propagación, en el laboratorio de Cultivo in vitro de la facultad de ciencias agrícolas y Forestales.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Determinar el medio adecuado para las germinación de las semillas de orquídeas in vitro probando diferentes concentraciones de medio de Murashige & Skoog (MS).
- Identificar la Fito hormona que presente mejor respuesta en la fase de desarrollo de las vitro plántulas.
- Determinar el mejor sustrato para la aclimatación de las vitroplantas de orquídeas.

## **1.5. Hipótesis**

La multiplicación in vitro es una alternativa viable para la micro propagación de plantas de orquídeas a partir de semillas, en sustratos adecuados.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Historia**

Los primeros datos de la pre historia de las orquídeas son escasos y parciales. Se sabe que en el año 500 a.C., los emperadores chinos apreciaban las especies autóctonas de *Cymbidium* como *C. ensifolium* y *C. virescens* por su dulce aroma. Confucio se refiere a todas las orquídeas como “Lam”, que tenían reservado un rincón especial en los jardines de cultivo de China y Japón. Otras orquídeas como la fragante *Dendrobium moniliforme* eran las preferidas por sus coloridas y brillantes flores. Los japoneses sentían una atracción especial por la especie *Neofinetia falcata*. La fascinación que despiertan sus seductoras especies de flores blancas ha perdurado a lo largo de los siglos y hoy sigue siendo popular. En Europa el interés por las orquídeas se remonta has la época de los griegos y romanos. En aquellos tiempos sólo se conocían las orquídeas terrestres muy diferentes a las epifitas tropicales. Los griegos explotaban los recursos del mundo natural, los tubérculos y raíces de la mayoría de las orquídeas terrestres europeas eran valiosas por sus propiedades medicinales y curativas. Creían que las formas de las diferentes formas de las orquídeas revelaban el efecto beneficioso de la planta. Por ejemplo se pensaba que la orquídea hombre (*Aceras anthoropophorum*) era afrodisiaca por la forma de su labelo se asemejaba a la figura de un varón. De hecho la palabra orquídea deriva del griego “orchis” que significa testículos, en referencia a los tubérculos que aparecen por pares en algunas especies (Rittershausen & Brian, 2014).

#### **2.2. Origen**

Las orquídeas no tienen un lugar de origen específico, están distribuidas en todo el planeta por lo que se pueden considerar plantas cosmopolita excepto en las regiones de clima desértico o polar, si bien son especialmente abundantes en la zona intertropical, donde crecen la mayoría de las especies de flores más vistosas también encontramos especies endófitas a nivel departamental y nacional.

#### **2.3 Clasificación Taxonómica**

Reino: Vegetal.

Phylum: Telemophytae.

División: Tracheophytae.

Subdivisión: Anthophyta.

Clase: Angiospermae.

Subclase: Monocotyledoneae

Orden: Microspermales - Asparagales

Familia: Orchidaceae

Nombre científico: *Phalaenopsis* sp

Nombre común: Orquídea

**Fuente:** (Herbario universitario 2018)

## **2.4. Morfología de la orquídea *Phalaenopsis***

### **2.4.1. Raíz**

Las raíces de las orquídeas son únicas dentro del reino vegetal son gruesas y en su mayoría blancas pero no se producen con la misma abundancia que en otras plantas, consisten en un núcleo interior delgado con una cubierta exterior absorbente que se compone de capas de células muertas esta capa que empapa el agua a través de su superficie se denomina velamen y progresa por detrás de una punta de crecimiento verde, las puntas de las raíces de las orquídeas son enormemente vulnerables a los daños y pueden romperse con facilidad cuando se extraen de la maceta la mayoría de las raíces de las orquídeas se mantiene en el recipiente pero al ser aéreas de manera natural es frecuente que sobresalgan por el borde y siguen creciendo suspendidas en el aire o aferradas a cualquier superficie que se encuentre las raíces.

No son estructuras permanentes sino que se crean anualmente al brotar desde una base poco después de que se inicia el nuevo crecimiento de la misma forma que las hojas se desprenden de la planta al cabo de uno o varios años y perecen de manera natural para ser reemplazadas por las nuevas, en las orquídeas monopódicas las raíces se crean a intervalos juntos con el rizoma y rara vez tiene necesidad de adentrarse en la tierra. Muchas orquídeas pueden realizar fotosíntesis a través de las raíces y los casos extremos diversas especies epífitas han llegado a estar desprovistas totalmente de hojas y dependen de un puñado de raíces gruesas para mantener la clorofila que necesita las raíces de algunas orquídeas; son además enormemente atractivas por ejemplo en la *Phalaenopsis* presenta un tono blanco plateado cuando se extraen de la maceta las raíces resultan enormemente importantes para las orquídeas y se riegan demasiado pero no pueden ser sustituidas hasta que la planta produzca un retoño

lo que significa que el ejemplar tendrá que sobrevivir durante varios meses sin raíces y absorber la humedad por lo que sucede los pseudobulbos se marchita y el follaje pierde vigor hasta que las nuevas raíces permitan recuperar las reservas de agua pérdidas hasta que llegue este momento un rociado regular ayuda a evitar la deshidratación (Rittershausen & Brian, 2014).

Está constituida por un tejido de células especializadas capaces de alimentarse y obtener agua de la atmósfera. Estas raíces tienen la capacidad de adherirse fuertemente sobre la superficie de la corteza de los árboles y macetas; independientemente del material. Lo anterior lo logran gracias a su tejido esponjoso llamado velamen por lo cual también atrapan agua y nutrientes.

Si las condiciones son adversas el tejido esponjoso que tiene la forma de los alvéolos de una colmena, se sellan para evitar la pérdida de agua.

La punta de la raíz o cofia es puntiaguda y de color verde, la cual va cambiando de color conforme crece tornándose de un color blanquecino, formando así el tejido esponjoso o velamen. La raíz emerge de la base del tallo rompiendo la envoltura de la vaina de la hoja (Cortez Azenon, s.f.).



**Figuras 1raíz de una orquídea Phalaenopsis**

#### **2.4.2. Tallo**

La orquídea Phalaenopsis tiene un crecimiento monopoidal, o sea, aumenta su tamaño a partir de una sola yema apical. Entonces podemos describir que posee un tallo de crecimiento monopoidal incapaz de generar yemas axilares. Es de color verde y está recubierto por las vainas de las hojas, es de entrenudos cortos y puede llegar a medir hasta unos 60 cm., de altura. Con el correr del tiempo este tallo puede llegar a lignificarse. (Cortez Azenon, s.f.)



**Figuras 2 Crecimiento monopoidal**

### **2.4.3. Hojas**

Son carnosas y de un color verde oscuro cambiando a una tonalidad verde rojizo según el ambiente en donde se cultiven. Son paralelinervadas, es decir, tienen sus nervaduras en forma paralela y vertical. Generalmente las Phalaenopsis tienen su nervadura central bien visible.

Recién formadas las hojas son de un color verde púrpura y conforme crece se van tornando de un color verde, pero pueden mantener el margen de un color púrpura como cuando se inician. El pecíolo tiene forma de vaina y es el que envuelve el tallo de la planta. La hoja puede llegar a medir de 20 a 30 cm. de largo y de 10 a 15 cm. de ancho que funcionan como reserva de agua. (Cortez Azenon, s.f.).

Las orquídeas monopodicas tienen un único rizoma vertical desde el cual crecen pares de hoja en ángulo recto, phalaenopsis si bien las bandas pueden alcanzar una altura considerable y en cierta etapa de su vida uno si se autorregulan y Nunca llegan a medir demasiado ya que las hojas más antiguas se caen al ritmo que brotan las nuevas las hojas.

Las hojas de éstas son anchas y planas en el entorno Silvestre estas últimas no están sujetas a temperaturas extremas una luz solar brillante su amplia superficie está diseñada para obtener un máximo posible de luz filtradas

Algunas bandas en cambio presenta un follaje redondeado y corto que reduce el área superficial de la planta para sobrevivir a pleno sol las hojas que perduran sólo dura 1 o 2 temporadas son anchas blandas y como de papel como es el caso de éstas mientras que las hojas que son duras y correosas duran más.

Las hojas contienen clorofila lo que permite a la planta realizar la fotosíntesis para convertir la luz solar en energía. (Rittershausen & Brian, 2014).



**Figuras 3 Hojas de una orquídea Phalaenopsis**

#### **2.4.4. Flor**

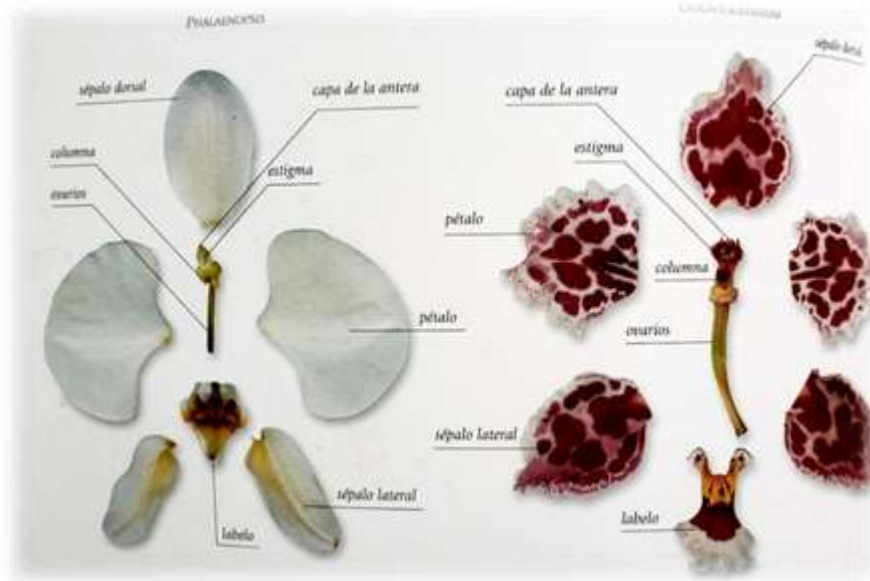
La flor de las Phalaenopsis como toda orquídea tiene una simetría bilateral, es decir se le pueden observar dos envolturas: una interna y otra externa, la primera consta de tres pétalos y la segunda de tres sépalos.

En la envoltura interna, la parte central muestra una estructura de forma y color distinto la cual es un pétalo modificado llamado labelo.

En el interior de los sépalos y pétalos está la columna que contiene los órganos femeninos (Estigma) y masculinos (Polínea). Sus pétalos son de colores variados y las podemos encontrar desde moradas, blancas, amarillas y en diferentes combinaciones.

Son flores solitarias y alternas que se encuentran sostenidas por un eje floral llamado pedúnculo, es ramificado y emerge del tallo. Para ello rompe la vaina de la hoja y puede llegar a medir hasta unos 60 cm., de largo. El eje floral está formado por nudos y entrenudos capaces de generar yemas florales las cuales se pueden inducir podando los pedúnculos al pasar la floración principal. Un eje floral puede llegar a producir de 25 a 40 flores según la edad y manejo, cada planta puede llegar a producir 1 a 3 ejes florales por año. (Cortez Azenon, s.f.)





**Figuras 4 Partes de la flor de orquídea**

## **2.5. Reproducción de las Orquídeas**

### **2.5.1 Reproducción sexual de las orquídeas**

Las flores de las orquídeas producen frutos en forma de cápsulas en su mayoría conteniendo grandes cantidades de semillas como polvo fino. Las semillas de las orquídeas, carecen de endospermo (sustancia de reserva alimenticia). Bajo condiciones naturales, las semillas de orquídeas son liberadas de sus cápsulas cuando éstas maduran y son llevadas por el viento pudiendo germinar y crecer si eventualmente caen en un medio adecuado para la germinación. Sin embargo dichas semillas tienen pocas posibilidades de sobrevivir, debido a que muchas de las especies de orquídeas sólo son capaces de crecer en presencia de un hongo simbiótico como *Rhizoctonia* spp (Angel, 1999).

Cada semilla posee una cubierta seminal que encierra un embrión rudimentario indiferenciado y simple, constituido por unas 100 a 200 células sin endospermo. Debido a la falta de reservas alimenticias, el proceso germinativo y el subsiguiente desarrollo de las orquídeas, se encuentran supeditados a la existencia de una simbiosis con un hongo que proporcione los elementos nutritivos necesarios para su realización. Cuando el fruto abre en forma natural y las semillas son liberadas como Cápsulas (frutos) con semillas. Planta en su hospedero principal en condiciones naturales germinación dependerá de que al caer entren en contacto con el hongo, el cual penetrará al embrión a través de una gran célula suspensora; el hongo crece en el interior de las células del embrión, éste es digerido por la orquídea que comienza a crecer rápidamente para formar un protocormo. La primera hoja se desarrolla algún tiempo después de la germinación (McKendrick, 2000).

Las semillas de orquídea contienen un pequeño embrión de solamente cerca de 0.1 mm de diámetro, sin ningún tejido de reserva asociado y que un método de germinación ha sido plantar semillas en suelo previamente mezclado con suelo obtenido de los alrededores de la planta madre. Sin embargo, un método más eficiente de germinación y rápido desarrollo es por cultivo in vitro de las semillas. (McKendrick, 2000)

## **2.5.2. Reproducción asexual de orquídeas**

Al igual que la mayoría de las plantas, las orquídeas se reproducen de forma sexual y asexual; la sexual se lleva a cabo con un intercambio genético y la descendencia obtiene genes de ambas plantas, lo que garantiza mayor diversidad en las características de la descendencia; y la forma asexual se obtiene a partir de fracciones de la planta madre. A continuación se presentan las diferentes formas de reproducir asexualmente una orquídea:

- Al dividir una planta por los pseudobulbos a través de un corte, se hace posible la generación de dos o más plantas.
- Con una cuidadosa separación de las raíces, siguiendo la técnica adecuada, se pueden crear varias plantas a partir de una.
- Con la técnica llamada pulso hormonal, que básicamente consiste en promover a través de las yemas, el crecimiento de nuevas plantas o brotes.
- A través del cultivo de tejidos que sólo se menciona aquí, pues su realización es muy especializada y requiere condiciones de trabajo muy particulares.

### **2.5.2.1 Ventajas de la reproducción asexual**

- Obtener plantas de calidad en mayor cantidad y en menor tiempo.
- Reproducir las en cualquier época del año, lo que permite mayor eficiencia en el ciclo del cultivo y puede favorecer que la floración se produzca más de una vez por año.

### **2.5.3 Cultivo In Vitro**

El cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta (ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerará una o muchas plantas.

Durante las últimas décadas, la técnica del cultivo “in vitro” ha ganado especial interés para el establecimiento de diversas plantas para la producción de compuestos o la obtención de cultivos más sanos y con características genéticas específicas.

El cultivo in vitro de vegetales se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de estos explantes (Höxtermann, 2018).

El cultivo de células y tejidos in vitro (CCTV) involucra diferentes técnicas a partir de diferente material vegetal tales como cloroplastos, células, tejidos, órganos e incluso plantas completas.

La totipotencia es la capacidad de una célula de generar un individuo completamente idéntico a la célula madre, la cual tiene la misma información genética y la misma función es decir, indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Fert & Paul, 2000).

El CCTV es una forma de reproducción asexual, la cual se puede realizar gracias al mecanismo de división mitótico de las células vegetales. La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que poseen un genotipo idéntico al de la célula madre. La potencialidad de una célula diferenciada para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta. De este modo y desde la óptica de la conservación de especies vegetales la aparición de la variación espontánea no controlada y al azar durante el proceso del cultivo in vitro se convierte en un fenómeno inesperado y no deseado en la mayoría de los casos. Contrariamente a estos efectos, su utilidad en la mejora de los cultivos mediante la creación de nuevas variantes también ha sido bien documentada (Bouharmont, 1994)

El cultivo se incuba bajo condiciones de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. (Fowler 1987, Carpita y McCann, 2000).

La expresión cultivo *in vitro de* plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las

plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería recién en la década del '50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad. (Castillo, 2004)

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano o tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo. En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene, por tanto, conocer cuáles son los principales factores que conforman dicho y que deberán ser controlados. (Castillo, 2004)

La micropropagación o propagación clonar, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento azúcar, agua y agar. (Castillo, 2004)

La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micro propagación.

### **2.5.3.1 Ventajas y desventajas de la técnica de cultivo in-vitro**

#### **2.5.3.1.1 Ventajas de la técnica in vitro**

- Producción de gran número de plantas.
- Obtención de plantas en cualquier época del año
- Almacenamiento de plantas en poco espacio
- Producción de plantas libres de contaminación, enfermedades y plagas
- Propagación de especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción Clonación de individuos "élite", son desempeño agronómico destacado
- Obtención de plantas libres de virus Producción de semillas sintéticas
- Conservación de germoplasma: material de un conjunto de individuos que representa la variabilidad genética de una población vegetal
- Obtención de metabolitos secundarios
- Producción de nuevos híbridos
- Mejora genética de plantas
- Germinación de semillas

**Fuente** (Azenon, 2013)

#### **2.5.3.1.2 Desventajas de la técnica in vitro**

- No todas las especies son viables de propagar in vitro; algunas son recalcitrantes
- Cada especie requiere de métodos específicos
- La estandarización de protocolos resulta costosa

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo *in vitro*:

#### **2.5.3.1.3 Ambiente químico**

- Composición del medio de cultivo
- PH

#### **2.5.3.1.3 Ambiente físico**

- Temperatura
- Luz y fotoperiodo

- Humedad

**Fuente** (Azenon, 2013)

### **2.5.3.2 Medio de cultivo**

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el desarrollo del cultivo in vitro y en su mayoría están conformados por una serie de componentes generales y específicos, cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. El medio M&S (Murashige & Skoog, 1962) es considerado como el medio basal más Utilizado en la regeneración de plantas puesto que es apto para el desarrollo de varias especies, sin embargo, existen numerosas variaciones comerciales de este medio que son utilizados de acuerdo al requerimiento del cultivo (Evans et al., 1984) citado en (Aguirre , Vazquez, Ugarte, Villaroel, & Yamashiro, 2010)

#### **2.5.3.2.1 Murashigue skoog**

El Medio Murashige & Skoog (MS), o MS0, fue inventado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962 durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal y se ha convertido en el medio más comúnmente usado en el cultivo in vitro de tejidos vegetales. Como investigador doctoral de Skoog, Murashige originalmente estaba enfocado en encontrar la hormona del crecimiento presente en el jugo del tabaco, sin tener éxito. En su lugar, el análisis del jugo de tabaco reveló altas concentraciones de minerales específicos. Una serie de experimentos posteriores demostró que variando los niveles de éstos nutrientes promovía el crecimiento sustancialmente, en comparación con formulaciones existentes. Se determinó que el nitrógeno, en particular, promovía el crecimiento del tejido de tabaco en cultivo (Murashige & Skoog (MS) Medium, 2017).

**Tabla 1 Composición del medio de cultivo Murashige skoog 1962**

<b>MACRO ELEMENTOS</b>	<b>COMPUESTOS</b>	<b>Mg/L</b>
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650mg/l
Cloruro de sodio	CaCl <sub>2</sub> .aq	440mg/l
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370mg/l
Fosfato de potacio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170mg/l
Nitrato de potacio	KNO <sub>3</sub>	1,900mg/l
<b>MICRO ELEMENTOS</b>		<b>Mg/L</b>
Acido borico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2mg/l
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025mg/l
Sulfato cuprico	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025mg/l
Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8mg/l
sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3mg/l
Yoduro de potacio	KI	0.83mg/l
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25mg/l
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O		37.2mg/l
<b>VITAMINAS</b>		<b>Mg/L</b>
i-Inositol		100mg/l
Niacina		0.5mg/l
Piridoxina	HCL	0.5mg/l
Tiamina	HCL	0.1mg/l
Glicinas		2mg/l
Edamina(opcional)		mg/l

**Fuente** (Murashige & Folhe Skoog, 1962)

### **2.5.3.3 Compuestos nutricionales químicos de las plantas**

Los nutrientes inorgánicos o minerales usados en el cultivo in vitro son los mismos requeridos normalmente por las plantas que son macro-elementos y micro-elementos disponibles en el aire, en el agua y en el suelo y que asimilan gracias a varios procesos vegetales de alimentación de las plantas, como la fotosíntesis.

(Jardin, 2012)

Los principales nutrientes de las plantas son por orden de importancia:

#### **2.5.3.3.1 Compuestos orgánicos**

Oxígeno (O), Carbono (C) e Hidrógeno (H). Son obtenidos por la planta principalmente a través del aire y el agua.

#### **2.5.3.3.2 Macro elementos Primarios**

- Nitrógeno (N). Favorece la formación de las hojas. La planta los obtiene principalmente del suelo.
- Fósforo (P). Favorece la floración y fructificación. La planta los obtiene principalmente del suelo.
- Potasio (K). Favorece el crecimiento de las raíces y resulta esencial para las plantas jóvenes. La planta los obtiene principalmente del suelo.

#### **2.5.3.3.3 Macro elementos secundarios**

**Calcio (Ca), Azufre (S) y Magnesio (Mg).** Las existencias del suelo suelen ser asimilables para la planta en cantidades suficientes.

#### **2.5.3.3.4 Micro elementos u oligoelementos**

Se trata del **Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Boro (B), Molibdeno (Mo), Cobalto (Co) y Cloro (Cl)** y son esenciales para las plantas en pequeña cantidad.



## **2.5.4 Multiplicación in vitro de vegetales**

El multiplicación in vitro es una técnica para propagar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial, obteniendo plántulas idénticas a la planta madre.

Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento. Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. (Aguirre E. , 2010)

General mente las etapas de enraizamiento y aclimatación puede combinarse en condiciones ex vitro. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (fase 0) que es la etapa de obtención de la planta madre como así también la fase de multiplicación se puede o no usarla dependiendo de los objetivos requeridos en este caso no se la utiliza pero se la menciona para un mayor entendimiento.

Dentro del proceso de micro propagación se pueden diferenciar varias fases o etapas:

### **2.5.4.1 Fase 0: preparación de la planta madre**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener las capsulas con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estas se recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas o semillas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

- Seleccionar el material de partida: Debe ser una planta joven, vigorosa y sin enfermedades.
- Obtener las capsulas y no esperar que pase más de dos semanas después de la obtención de esta.

### **2.5.4.2 Fase I: establecimiento**

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los ex plantes. Los ex plantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. (Castillo, 2004)

#### **2.5.4.2.1 Desinfección de las semillas**

Antes de introducir el material vegetal se debe desinfectar el mismo, que es la capsula de orquídea para extraer los ex plantas se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia luego de realizar la desinfección del material vegetal con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluido durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada. (Castillo, 2004)

#### **2.5.4.2.2 Desinfección por medio de auto clave**

Una autoclave es un recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o una esterilización con vapor de agua. Su construcción debe ser tal que resista la presión y temperatura desarrollada en su interior. La presión elevada permite que el agua alcance temperaturas superiores a los 100 °C. La acción conjunta de la temperatura y el vapor produce la coagulación de las proteínas de los microorganismos, entre ellas las esenciales para la vida y la reproducción de éstos, hecho que lleva a su destrucción.

En el ámbito industrial, equipos que funcionan por el mismo principio tienen otros usos, aunque varios se relacionan con la destrucción de los microorganismos con fines de conservación de alimentos, medicamentos, y cultivo in vitro. (Autoclave, 2017)

Las autoclaves funcionan permitiendo la entrada o generación de vapor de agua pero restringiendo su salida, hasta obtener una presión interna de 103 kPa, lo cual provoca que el vapor alcance una temperatura de 121 grados centígrados. Un tiempo típico de esterilización a esta temperatura y presión es de 15-20 minutos (Autoclave, 2017)

#### **2.5.4.2.3 Trabajo en cámara de flujo laminar**

A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar la cual también es desinfectada con alcohol al 99% para eliminar cualquier impureza que pueda ser un futuro patógeno, para extraer el material vegetal que son las semillas de orquídeas. Estos ex plantas se introducirán en un frasco de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad (Castillo, 2004).

Lograr el establecimiento de las semillas de forma vigorosa para iniciar la multiplicación a gran escala.

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro.

- Preparar el medio de cultivo para el establecimiento: Se utiliza un medio sólido (confeccionado con agar-nutriente) enriquecido con vitaminas, minerales y hormonas. Las sustancias decisivas son las fitohormonas que promueven la división y alargamiento celular.
- Extraer e implantar (sembrar) las semillas obtenidas de las cápsulas: Lo que en realidad se entierra (siembra) en el medio de cultivo es un conjunto de semillas que están distribuidas alrededor de todo el frasco tratando de tener una distribución homogénea.
- Al cabo de la segunda semana ya se puede observar las semillas germinando.

(Castillo, 2004)

#### **2.5.4.3. Fase II: multiplicación**

Durante esta fase se espera que los ex plantes que sobrevivieron la FASE anterior originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben sub cultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micro propagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados. (Castillo, 2004)

- Lograr el mayor número de plantas posibles, en el menor tiempo, a partir de las plantas establecidas.
- Evidentemente la multiplicación es en progresión geométrica hasta obtener miles en pocos meses. En este caso la composición del medio de cultivo (semisólido)

#### **2.5.4.3 Fase III: desarrollo o enraizamiento**

Para enraizar los ex plantas se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Castillo, 2004)

- Lograr que las plántulas multiplicadas logren un óptimo sistema de raíces.
- En este caso el medio utilizado es líquido y lo que aumenta considerablemente es el contenido de auxinas (AIA) que estimulan la diferenciación de las raíces.

#### **2.5.4.4 Fase IV: aclimatación**

Los ex plantas recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los ex plantas o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (Castillo, 2004).

La aclimatación es un proceso que permite que las plantas que han crecido “in vitro”, en condiciones heterótrofas y que sólo han estado expuestas a un microambiente escogido en condiciones totalmente controladas de temperatura, humedad y luz se adapten y sobrevivan en condiciones “ex vitro” adquiriendo condiciones autótrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, translocación y transpiración de agua. (Aguirre E. , 2010)

#### **2.5.4.4.1 Cuidados de las plantas in vitro**

Los plantines enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plantines se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando.

Luego de retirar cuidadosamente el agar de las raíces para evitar dañarlas, los plantines se enjuagan y se colocan en almacigueras con la mezcla de sustratos seleccionada y cubiertos con nylon. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad en las almacigueras. Si es necesario, se aplica un riego con una pulverizadora manual, para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato.

A los 15 días del trasplante, se puede comenzar a levantar la cobertura de nylon en las horas de menor calor (temprano en la mañana o en la última hora de la tarde). Al comienzo las plantas se dejan media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejan destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas.

Las condiciones del cultivo *in vitro*, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia. (Castillo, 2004)

#### **2.5.5 Fito hormonas**

Las sustancias consideradas como fitohormonas son: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno, Existen algunas diferencias entre las hormonas vegetales y animales. Por ejemplo, en el caso de las hormonas animales, éstas se sintetizan en diversos lugares y se mueven por el organismo, actuando en zonas distintas a las que son producidas. Esto no necesariamente ocurre con las fitohormonas, ya que algunas ejercen su acción en la zona en la que son sintetizadas. Aunque estas fitohormonas tienen efecto por sí solas, la combinación con otras provoca una variada respuesta en las plantas.

Desde el punto de vista hormonal, el crecimiento, desarrollo y reproducción de la planta, o de tejidos vegetales específicos está controlado por un delicado balance y distribución de sustancias

promotoras, que interactúan con sustancias del tipo inhibidoras del crecimiento. Estas sustancias "Reguladoras" tienen funciones variadas y especializadas, que ordenan, aceleran o regulan la intervención de los procesos vitales en el tiempo y el espacio

El término hormona procede de una palabra griega (*hormaein*) que significa excitar. No obstante, hoy se sabe que muchas hormonas tienen efectos inhibitorios. De modo que en lugar de considerar las hormonas como estimuladores Quizá sea más útil considerarlas como reguladores químicos.

Las Hormonas o Fitohormonas son Reguladores sintetizados por las plantas, que originadas en un lugar, por lo general se desplazan a otro y en muy bajas concentraciones inducen efectos fisiológicos definidos.

En la actualidad se define a los reguladores como sustancias orgánicas transmisoras de signos (químicos, luz, etc.) que son percibidos por receptores químicos con función reguladora (homeostasis) modulando una respuesta determinada.

Se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales o fitohormonas:

Las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico. Todas ellas actúan coordinadamente para regular el crecimiento en las diferentes partes de una planta.

### **2.5.5.1 Auxinas**

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es básicamente el ácido indol acético AIA, la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas.

El principal efecto de las auxinas es la elongación de las células, debido principalmente a que la pared celular se hace más plástica. Son sintetizadas en los ápices meristemáticos y en menor cantidad en las raíces.

La auxina principal sintetizada de forma natural por las plantas es el ácido indol acético (AIA), aunque se han encontrado otras como el ácido fenilacético, los cloroindoles y más recientemente, el ácido indolbutírico (AIB). El movimiento de estas fitohormonas por la planta es desde los ápices hasta las raíces (translocación basipétala) y viceversa.

Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleoptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical

Dado que los niveles endógenos de auxina son mucho mayores en tejidos jóvenes, es razonable sospechar que éste es su sitio de síntesis; sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser probada, debido a que las vías de biosíntesis aún no están completamente entendidas, pues se conocen múltiples y complejas vías de síntesis

- **Auxinas sintéticas y sus usos comerciales**

En un principio se analizaron otros compuestos con anillo indólico, como el ácido indol butírico (IBA) y derivados del naftaleno como el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido naftoxi-2-acético (NOA), que también resultaron activos. IBA fue clasificado inicialmente como una auxina sintética, pero es un compuesto endógeno de la planta, más eficiente que IAA en promover formación de raíces laterales y es usado comercialmente con este propósito.

Posteriormente se descubre el 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D). A partir de éste se desarrollaron varios compuestos con actividad auxínica, como el ácido 2-metoxi, 3,6-dicloro benzoico (dicamba), el ácido 2,4 diclorofenoxibutírico (2,4-DB), el ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético (2,4,5-T), todos con propiedades herbicidas cuando se emplean a concentraciones elevadas. En un principio se analizaron otros compuestos con anillo indólico, como el ácido indol butírico (IBA) y derivados del naftaleno como el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido naftoxi-2-acético (NOA), que también resultaron activos. IBA fue clasificado inicialmente como una auxina sintética, pero es un compuesto endógeno de la planta, más eficiente que IAA en promover formación de raíces laterales y es usado comercialmente con este propósito. (Bieto, 2017)

### **2.5.5.2 Giberelinas**

Estas fitohormonas son, en parte, responsables de la división celular y la elongación del tallo y de otros tejidos. Su descubrimiento se debe a los estudios que investigadores japoneses hicieron sobre una enfermedad del arroz. Dicha enfermedad consistía en que las plántulas recién germinadas adquirían una tonalidad amarilla y se producía una gran elongación del tallo, lo que conllevaba a la caída y muerte de la planta. Los investigadores descubrieron que estos síntomas eran causados por un hongo denominado *Gibberella fujikuroi*. Dicho hongo produce gran cantidad de estas fitohormonas que son introducidas en el vegetal que parasita. Desde entonces, se han aislado y descubierto varios tipos de giberelinas. Cada una de ellas se identifica con un número conforme se van descubriendo, de forma que tenemos la GA1, GA2, GA3 y así sucesivamente. La GA3 corresponde al ácido giberélico. Las giberelinas son sintetizadas principalmente en órganos meristemáticos y tejidos en desarrollo.

### 2.5.5.3 Citocininas

El descubrimiento de estas fitohormonas se debe, principalmente, a los estudios que se realizaron en cultivos in vitro. Al principio, se vio como la “leche de coco” (endospermo del fruto) promovía el crecimiento de varios tejidos cultivados in vitro. La primera citocinina natural que se aisló e identificó fue la zeatina, nombre que se le puso debido a que se aisló de semillas de maíz (*Zea mays*). La principal función de las citocininas es provocar la división celular y el retraso de la senescencia. Como ya hemos mencionado, las citocininas, en combinación con las auxinas, provocan la formación de masas celulares indiferenciadas denominadas callo. También estimulan el desarrollo de las yemas laterales cuando se aplica exógenamente, rompiendo la dominancia apical. (Bieto, 2017)

Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufren una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles.

- **Provocan la iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis.**

Las citocininas causan una dominancia apical reducida o anulada, con brotación y crecimiento de yemas axilares. Pueden iniciar brotes adventicios en porciones de las hojas, venas y pecíolos intactos. Son las hormonas claves para inducir la formación de nuevos brotes en diversos ex plantas in vitro (hojas, raíces, medula, cotiledones).

Junto a auxinas, promueven la producción de tejidos no organizados denominados callos, de los cuales es también posible inducir la formación de brotes y/o raíces, como también de embriones somáticos conducentes a plantas. Gran parte de las respuestas de **totipotencia** celular, de morfogénesis in vitro y de regeneración de plantas, ocurre en presencia de niveles apropiados de citocininas vs. Auxinas. Otra expresión de la acción de citocininas in vitro es la obtención de individuos haploides derivados de microsporas (polen) los cuales en presencia de niveles adecuados de citocininas y auxinas, cambian su programa fijado filogenéticamente, de manera que de una célula, inicialmente con función de reproductiva (microspora), se organiza alternativamente en un embrión gametofítico conducentes a la formación de un individuos con la mitad de la dotación cromosomal. Este fenómeno se denomina androgénesis y deriva en la formación de plantas genéticamente idénticas al genotipo del polen del cual proceden (plantas hijas del polen); las cuales son de invaluable utilidad en programas de mejoramiento genético.



## **2.5.6 Sustrato**

Un sustrato es todo material sólido distinto del suelo, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta. El mejor medio de cultivo depende de numerosos factores como son el tipo de material vegetal con el que se trabaja (semillas, plantas, estacas, etc.), especie vegetal, condiciones climáticas, sistemas y programas de riego y fertilización, aspectos económicos, etc (Fernandez, 1993).

### **2.5.6.1 Los Primeros Compost Orgánicos**

Tras varios experimentos desastrosos y falsas tentativas en los primeros tiempos del cultivo de las orquídeas uno de los primeros compost (medios de cultivo) que se utilizó consistía en terrones duros y compactados de turba mezclada con hojas descompuestas y tierra la mezcla, era demasiado densa y cómo las raíces no podrían penetrar suficientemente en ella no siempre se conseguía buenos sistemas de raíces hasta principios siglo 20 no se encontró un compost mejor consistía en fibra de osmunda y sphagnum, entonces las raíces del helecho real se empleaban como lastre para los barcos que regresaban a Europa y Gran Bretaña desde Estados Unidos

No tenía ningún otro empleo hasta que los cultivadores descubrieron su validez para las orquídeas una vez conocido este uso la planta se empezó a importar en cantidades ingentes para satisfacer la demanda junto con otras especies de Europa y Japón

Llegaba en enormes paquetes que había que limpiar y depurar en fibras pequeñas para cortarlas la fibra preparada se mezcla después con musgo no fresco se requería bastante habilidad para elaborar el compost y asegurar que el material y las horquillas tuvieran firmemente sujetas en la maceta pero no hasta el punto de impedir el paso del agua.

En aquel tiempo la forma en que se plantaban los ejemplares tenía gran importancia en su modo de crecer pesa su coste y el tiempo de elaboración esta mezcla se ha convertido en el compost ideal desde hace más de 50 años. Según se creó una de las razones por las que las orquídeas arraigan con tal facilidad en él es la presencia del musgo vivo que forma un manto de crecimiento verde sobre la superficie no obstante cuando empezó a recurrir al abono para orquídeas los musgos se deterioraba y el compost se descomponía actualmente se está estudiando mejores soluciones. (Rittershausen & Brian, 2014)

### **2.5.6.2 Sustrato de corteza**

Se descubrió que todos los requisitos necesarios para un sustrato nuevo se daban en la corteza del Cedro rojo americano si bien en Reino Unido donde se estaba talando plantaciones de pino Corzo y escocés se observa con la corteza de estos árboles contribuyen a un buen sustituto. El compost de corteza era mucho más barato de producir y más fácil de manejar que la anterior mezcla de musgo y fibra y hoy en día constituye la mezcla que se vende específicamente para orquídeas en todo el mundo se consigue de los árboles talados localmente y se distribuye a través de los Viveros especializados y los grandes centros de jardinería. Se proporciona en distintos tamaños adecuados para plántulas y plantas maduras no debe confundirse con la corteza que se comercializa en los centros de jardinería para acolchado de los lechos de flores (Rittershausen & Brian, 2014).

La corteza para orquídeas tarda en descomponerse y no se estropea la añadir fertilizantes permanece en buen estado durante varios años en los que libera lentamente sus nutrientes. Se tiene la cantidad justa de humedad para las raíces sin llegar a encharcar se puede usarse en solitario o mezcla con otros materiales según se requiera.

Si se observa que las orquídeas sufren cierta deshidratación y no se puede mantener el compost de corteza suficientemente húmedo es posible añadir mezcla de una tercera parte del musgo u otra turba fibrosa. Si bien puede ser necesario un cribado para eliminar las partículas más finas de esta manera se conseguirá una mezcla algo más húmeda se puede resultar ventajosa si no se pueden atender a las orquídeas con frecuencia que sería deseable, a esta mezcla básica cabe añadir un pequeño porcentaje de carbón para garantizar el campo siga siendo dulce y no se acidule. Ha de utilizarse solamente el carbón hortícola granulado que suministran los viveros especializados y los centros de jardinería, son distinto al carbón para barbacoas tratado para que se queme lentamente y que no conviene a las orquídeas. (Rittershausen & Brian, 2014)

### **2.5.6.3 Compost inorgánico**

Además de los campos orgánicos existen diversos materiales artificiales que proporcionan alternativas sintéticas, son económicos y fáciles de utilizar y ofrecen la ventaja de que no se descomponen y por tanto no provocan la pudrición de las raíces.

Entre estos materiales se incluye la lana mineral producida para la industria hortícola a partir de piedra pómez volcánica tejida. La lana mineral tiene el aspecto de una lana de algodón descolorida con la superficie tinta a veces de verde con un alga que crece como respuesta a los nutrientes. Proporciona una base hidropónica para cultivos vegetales como las berenjenas los pepinos y los tomates también

para claveles para Ramos. La lana mineral es de larga duración y permite que la planta pueda crecer según programa de alimentación completo y preciso. Se puede adquirir en 2 formas:

Absorbente y no absorbente la primera retiene mucho más agua en torno a las raíces algo conveniente para algunas orquídeas y la segunda tipo no absorben proporciona un compost más seco. Muchos cultivadores prefieren mezclar los dos tipos para conseguir un medio ideal que retenga suficiente agua durante un tiempo prolongado pero que posee a la vez la capacidad de admitir bolsas de aire la lana mineral se viene ligeramente sobre la maceta y no hay que pensarla cuando se utiliza habrá que ponerse guantes y una mascarilla ya que las fibras de vidrio que contiene son irritantes para la piel.

Otro material cuyo uso es muy extensivo y que funciona de forma muy parecida a la lana mineral es la espuma hortícola se emplea con lana mineral con mezcla de corteza orgánica y turba.

La perla y La Perlita Son productos hortícolas porosos hechos de roca volcánica triturada se usan independientemente para ciertas orquídeas como las playas o como agregados para abrir la lana mineral o las mezclas de corteza y turba en Hawái la piedra pómez volcánica es muy a mano y se utiliza profusamente en orquídeas.

Las ventajas de estos materiales inorgánicos son su ligereza su facilidad de uso y la cualidad es de que cuando las plantas se cambian de maceta se puede dejar la mezcla anterior perturbando menos a la raíz. No obstante es necesario suministrar a las orquídeas suficientes nutrientes por abono artificial ya que los materiales hechos por el hombre no tiene ningún valor como abono es posible transferir fácilmente una orquídea que crece un compuesto orgánico o una mezcla inorgánica o a la inversa pero no mezclar los dos compuestos en lo mismo Tiesto y ya que requieren diferentes técnicas de riego. (Rittershausen & Brian, 2014)

Algunos cultivadores de orquídeas prefieren mezclar su propia marca especial de compost para orquídeas con materiales que tenga a mano estos materiales incluyen hojas de Roble secas y ramas de Arce mezclados con sphagnum muy logradas cuando están confeccionadas por un cultivador con experiencia no son los mejores soluciones para los principiantes que deberán buscar consejos en el vivero. (Rittershausen & Brian, 2014)

#### **2.5.6.4 Cascarilla de arroz**

La cascarilla de arroz es un subproducto de la industria molinera, que resulta abundantemente en las zonas arroceras de muchos países y que ofrece buenas propiedades para ser usado como sustrato. Entre sus principales propiedades físico-químicas tenemos que es un sustrato orgánico de baja tasa de descomposición, es liviano, de buen drenaje, buena aireación y su principal costo es el transporte.

La cascarilla de arroz es el sustrato más empleado para los cultivos bien sea cruda o parcialmente carbonizada. El principal inconveniente que presenta la cascarilla de arroz es su baja capacidad de retención de humedad y lo difícil que es lograr el reparto homogéneo de la misma (humectabilidad) cuando se usa como sustrato único en camas o bancadas.

#### **2.5.6.5 Utilización del musgo como sustrato**

Los musgos son plantas que se hallan en la mayoría de sitios del planeta. Usualmente, viven en lugares húmedos o cerca del agua. Se encuentran entre los primeros organismos que colonizan las rocas, pues al crecer sobre ellas modifican su superficie, formando un sustrato en el que se pueden arraigar otras plantas.

Es frecuente encontrarlos a manera de alfombras en el piso de los bosques húmedos, aunque también crecen sobre las ramas y los troncos de árboles, en techos de edificaciones, en muros de concreto y hasta sobre las alcantarillas.

Entre las plantas, los musgos pertenecen a las briofitas, que históricamente se han utilizado, desde el punto de vista científico, como material de trabajo para realizar estudios científicos.

También en ellos se han realizado investigaciones de dispersión de la flora a grandes distancias. Conocer más a los musgos podría significar un mejor conocimiento de la biología de otras plantas. Desde hace algunos años se ha valorado el potencial de los musgos desde otros puntos de vista. Se les puede aprovechar como indicadores de contaminación del suelo, del aire y del agua. En la ciudad de México se han hecho evaluaciones preliminares de la calidad del aire, utilizando la presencia de musgos epifitos como indicadores, pues estas plantas son muy sensibles a ciertos contaminantes como el bióxido de azufre, ozono y fluoruros volátiles. Su respuesta a estas sustancias es útil para diagnosticar los niveles tóxicos en el ambiente. Las especies de amplia distribución mundial, así como las que crecen en varios hábitats pueden servir para evaluar la contaminación en ambientes variables.

Los musgos absorben de manera preferente determinados elementos minerales que se encuentran en el sustrato. El análisis químico para la detección de dichos elementos en ciertas especies de musgos es a veces más confiable que el análisis del propio sustrato. Se sabe que muchos musgos crecen donde hay abundancia de cobre o minerales radioactivos. Desde hace muchos años se ha venido utilizando el musgo en horticultura, donde se aprecia su belleza como adorno de jardines, terrarios y para simular césped en los nacimientos de los arreglos navideños. Este es, probablemente, el mayor aprovechamiento que se hace de los musgos.

No obstante, también se pueden mezclar con tierra para mejorar la retención de agua, aunque ciertos musgos podrían llegar a crear un ambiente de excesiva humedad que asfixie las semillas y retarde la regeneración de la vegetación. Podrían ser muy útiles en la regeneración del bosque a través de la germinación de semillas. (verde, 1996)

### **2.5.7. Orquídeas endémicas de Bolivia**

Actualmente se registran alrededor de 1.350 especies de orquídeas en Bolivia de las cuales 400 son especies endémicas, siendo la mayoría epífitas. Se encuentran en mayor proporción especies endémicas de *Zepanfhes*, *Pleurothaliis* y *Masdevallia* El porcentaje más alto de especies endémicas de orquídeas se registra entre 2.500 y 3.000 msnm (Vásquez & Ibisch, 2000). Parece lógico que el endemismo aumente con la altura porque los valles disectados promueven la fragmentación y separación geográfica de poblaciones Los Yungas de Bolivia es una región biogeográfica mente distinta que tiene su propia historia evolutiva mostrando patrones de diversidad y endemismo únicos a nivel mundial, entre las especies des de orquídeas endémicas de esta zona encontramos a *Góngora ilenia*. El género *Góngola* se encuentra actualmente constituido por más de 60 especies. Es uno de los géneros de orquídeas cuyos miembros no son fáciles de distinguir. Se trata de plantas epífitas con inflorescencias colgantes, con flores de tamaño medio espectacular o por lo menos extraño es el tamaño del labelo, y su estructura es muy compleja

Los mismos autores mencionan que en los países donde existen plantas del género

*Góndola*, la taxonomía carece de investigación profunda. En Bolivia existen por lo menos cuatro especies.

(Aguirre , Vazquez, Ugarte, Villaroel, & Yamashiro, 2010)

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del ensayo**

El presente trabajo de investigación se desarrollara en el departamento de Tarija, Provincia Cercado Zona el Tejar, ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15` de latitud sur y los meridianos 64° 21` y 65° 05` de longitud Oeste, con una altura promedio de 1850 m.s.n.m, específicamente en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo *In Vitro de* la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho”.

#### **3.2. Materiales**

##### **3.2.1. Material vegetal**

Para el presente trabajo se utilizará cápsulas (semillas) de la genero Phalaenopsis sp de la planta madre que se obtuvo en el mercado local que posterior mente fue polinizada manualmente.

##### **3.2.2. Equipos y Material del laboratorio**

###### **Área de preparación**

- Balanza de precisión
- Pipetas
- Matraces
- Erlenmeyers
- Frascos
- Agitador
- Microondas
- Horno

### **Área de esterilización**

- Autoclave
- Estufa de esterilización

### **Área de siembra**

- Cámara de flujo laminar
- Mechero
- Alcohol
- Agujas
- Bisturí
- Tijera
- Pinzas

### **Área de crecimiento**

- Cámara de crecimiento

### **3.2.3 Reactivos químicos**

- Medio de cultivo M&S (Murashige y Skoog)
- BAP (Bencil amino purina)
- AIA (Acido indol acético)
- Carbón activo
- Agar agar

## **3.3 Metodología**

### **3.3.1 Diseño experimental**

La micropropagación de orquídeas in vitro, fue ejecutado en tres fases: Fase I de establecimiento (siembra), Fase II desarrollo de las vitroplantas y la fase III aclimatación de las vitroplantas.

#### **3.3.1.1 Fase de Establecimiento (siembra)**

- Diseño experimental: Completamente al azar
- Tratamientos: 3 medios de cultivo

- MEDIO DE CULTIVO 1: M&S (Murashige y Skoog)
  - MEDIO 2: M&S (Murashige y Skoog) + 50% más agua de coco
  - MEDIO 3: M&S (Murashige y Skoog) + 50% más agua de coco y carbón activo.
- N° de repeticiones: 10
  - Unidades experimentales: 30
  - Composición de la Unidad experimental: 1 frasco por unidad experimental.
  - Variables a Evaluar
    - Porcentaje de germinación

### 3.3.1.2 Fase Crecimiento de las vitroplantas

- **Diseño:** Completamente al azar
- **Tratamientos:** 2 medios compuestos por M&S y fitohormonas. BAP (Bencil amino purina) y AIA (ácido indol acético )
  - MEDIO 1: M&S (BAP)
  - MEDIO 2: M&S (AIA)
- **N° de repeticiones:** 10
- **Unidades experimentales:** 20
- **Composición de la Unidad experimental:** Un frasco con cinco plantas o unidades de observación.
- **Variables evaluadas:**
  - Numero de hojas.
  - Numero de raíces.

### 3.3.1.3 Fase aclimatación de las vitroplantas

- **Diseño:** Completamente al azar
- **Tratamientos:** 3 sustratos
  - SUSTRATO 1: cascarilla de arroz.
  - SUSTRATO 2: corteza de árbol.
  - SUSTRATO 3: 50% cascarilla de arroz + 50% corteza de árbol.
- **N° de repeticiones:** 10



- **Unidades experimentales:** 30
- **Composición de la Unidad experimental:** 1 maceta con 4 plantas.
- **VARIABLES EVALUADAS:**
  - Porcentaje de sobrevivencia

### **3.4 Análisis estadístico**

**Fase de Establecimiento:** En esta fase, los datos recabados sobre el porcentaje de germinación fueron sometidos a un Análisis de varianza, aplicada al 5% y 1% de probabilidad de error, para posteriormente ser comparados mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad de error.

**Fase de Desarrollo:** Los datos de las variables evaluadas (Número de hojas y raíces) en los tratamientos, fueron comparados mediante la T de Student al 5% de probabilidad de error.

**Fase de Aclimatación:** Los resultados de la sobrevivencia de las plantas en los tratamientos, fueron analizados mediante el Análisis de varianza al 5% y 1% de probabilidad de error, para luego ser comparados mediante la prueba de Tukey al 5%.

### **3.5 Variables de Respuesta**

Las variables de respuesta determinadas para el presente trabajo de investigación fueron:

#### **Porcentaje de germinación**

Para esta fase después que la capsula sea desinfectada con concentración del 1% de hipoclorito de sodio se la partirá para extraer las semillas que se introducirán directamente en los frascos con el medio de cultivo todo esto en la cabina de flujo laminar tratando de mantener la mayor asepsia posible ya que las esporas microscópicas de los hongos que se encuentran en el medio ambiente podrían infectar un frasco por completo en un par de días en estos frascos, en los cuales se podrá observar el proceso de germinación y procesar la información.

#### **Número de hojas y raíces**

En el desarrollo se puede notar que en un frasco que almacenaba la misma cantidad de plantas el número de raíces y hojas variaba en comparación a otros factores como por ejemplo la altura. Se tomó las mediciones una al sacar para sus trasplanta al momento de pasarlas a

los sustratos para su perspectiva aclimatación (fase 3) meses de su trasplante de su perspectiva desarrollo en este nuevo medio de cultivo ya que al ser monocotiledóneas todas tenían una sola raíz y hoja.

### **Porcentaje de sobrevivencia**

En esta fase se deseaba medir el número de hojas y raíces como se realizó en la anterior fase pero se notó que el porcentaje de supervivencia es variable así que se optó por tomar en cuenta este parámetro ya que no se cuenta con los sustratos idóneos para que estas un ejemplo es que no se encontró fibra de coco ni en el mercado nacional y la única alternativa es la fabricación de ésta.

### **3.6 Micro propagación**

No es fácil sembrar las semillas de orquídeas en contaminación ya que las esporas microscópicas de los hongos son muy abundantes uno es para que entre en el frasco crece rápidamente en la superficie del Agar.

En esta fase las propias semillas contendrán microscópicas esporas de hongos y deben esterilizarse o acceso de Este relación destruir a las semillas Así que debe procederse con precaución se sumergieron la capsula de una solución de líquido esterilizado en una forma muy diluida de hipoclorito de sodio, si se esteriliza las capsula sin dañar las semillas que contiene. Se destapara cada frasco y se extraerán las semillas con cuidado de la capsula las cuales se introducirán sobre la superficie de la gelatina con una pinza sacudiendo la cápsula, después se cerrará la frasco inmediatamente, Incluso en las condiciones más higiénicas se producirá algún tipo de contaminación en esta fase por suerte las orquídeas de generosa en la cantidad de semillas que produce con lo que puede una permitirse una pérdida de un 10% si no está listo para realizar la siembra de inmediato pueden guardarse las semillas en frigorífico pero las semillas son tan finas que no se almacenan fácilmente cuando más tiempo se guarden menor será su fertilidad. Sin embargo existe un movimiento tendente a la conservación con experimentos de muestras congeladas de larga duración de las semillas secas y mantenidas a temperaturas extremadamente bajas su viabilidad se verifica sembrando una pequeña cantidad semillas cada pocos años es difícil predecir el resultado final pero resulta interesante comprobar si las semillas siguen siendo fértiles después de un su almacenamiento prolongado siempre que las semillas utilizadas sean fértiles en un tiempo de tres semanas sobre la superficie de Agar se voltean verdes conforme la diminuta semilla se transforman en protocolos de los vasos llenos de clorofila se producen hojas y raíces en una semana habrá que desechar los frascos que hayan quedado contaminados con infección fúngica frascos deben hervirse para destruir la

infección antes de abrirlos esporas rodearán la superficie del frasco en un día y pueden transmitirse los frascos siguiente si no está suficientemente bien cerrado.

Micro propagación de plantas. Es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.

Se utiliza para propagar plantas nuevas, en este caso es para obtener grandes cantidades germinación de la planta que no germina eficientemente.

Esta fase se realizó en el presente año, en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, siguiendo los protocolos de laboratorio internacionales.

Se comenzó con la preparación del medio de cultivo, el cual es guiado con el protocolo utilizado para la reproducción plantas de orquídeas.

El tercer paso fue la multiplicación de las plantas realizada en la cabina de flujo laminar siguiendo el protocolo de laboratorio para evitar cualquier tipo de contaminación. Aquí se efectuó la siembra en los respectivos frascos.

### **3.7 Manejo experimental**

#### **3.7.1. Establecimiento**

El objetivo de esta fase es obtener un cultivo aséptico de la especie que se quiere multiplican El establecimiento, incluye la selección previa del explante más adecuado, su desinfección y la siembra en condiciones asépticas en medio de cultivo. Esta Fase termina con la obtención de un cultivo libre de contaminaciones visibles y suficientemente adaptada a las condiciones in vitro, de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de fitorreguladores en la fase siguiente (multiplicación).

#### **3.7.2. Multiplicación**

La fase II se refiere a la multiplicación del propágulo a través de cultivos sucesivos en un medio adecuado para la multiplicación. Se inicia la fase de multiplicación con la obtención de un cultivo de partes como ser las semillas libres de contaminación y que están suficientemente establecidas y receptivas a la aplicación de fitorreguladores. El principal objetivo de esta fase es de producir el mayor número de plantas posible, en el menor espacio de tiempo. No basta conseguir altas tasas de multiplicación en algunos explantes, lo importante es la reproducibilidad del sistema, es decir, conseguir una tasa media satisfactoria con el mínimo de variación de explante a explante. Otro aspecto

esencial es la calidad y homogeneidad de las partes aéreas producidas, lo que va a determinar en gran parte el éxito de una fase siguiente de enraizamiento.

### **3.7.2.1 Conceptos básicos para la preparación de soluciones**

El cultivo de tejidos vegetales in vitro es una técnica basada en la capacidad que tiene una célula vegetal de regenerarse en una planta completa, idéntica a la planta madre, bajo un medio artificial que posee la mayor parte de los componentes que normalmente esta planta extrae del suelo y del medio ambiente, ello para poder regenerarse y desarrollarse.

Siguiendo el mismo concepto, el éxito del cultivo de tejidos in vitro radicara básicamente en la cantidad balanceada de nutrientes que se le brindará a la Planta,

Por lo que una adecuada preparación de los medios artificiales en los cuales crecerá el explante, es una condición determinante para lograr objetivos que plantea esta técnica. Por otra parte si bien el trabajo de laboratorio tiene mucho de agradable resulta ser peligroso si no se toman las precauciones necesarias. Una primera regla para un adecuado trabajo en laboratorio es conocer los reactivos químicos.

### **3.7.2.2 Preparación del medio de cultivo**

Medir el volumen deseado de las soluciones stock (macro, micronutrientes, quelatos, vitaminas y otros componentes) .Para la preparación de medio: 1) una de macronutrientes, 2) una de micronutrientes, 3) una de hierro con un agente quelante, 4) otra de vitaminas y mioinositol; así como con soluciones específicas para los demás componentes del medio (reguladores de crecimiento, etc.). Estas pueden mantenerse durante un cierto tiempo en refrigeración o congeladas (Aguirre , Vazquez, Ugarte, Villaroel, & Yamashiro, 2010).

### **3.7.2.3 Ajuste de pH**

Una vez obtenido el volumen del medio deseado, completado a volumen con agua destilada se procede a ajustar su pH al valor prefijada, f do mediante la adición de OHNa y/o HCl O,1 l N, para subir o bajar el pH respectivamente hasta obtener el deseado.

La adición del gelificante dependerá si el medio a preparar será un medio sólido o un medio líquido. Se añadirá en el primer caso el agente solidificante y se fundirá por calentamiento breve, utilizando horno a microondas o en estufa con agitador. (Aguirre , Vazquez, Ugarte, Villaroel, & Yamashiro, 2010)

#### **3.7.2.4 Adición de la fuente de energía**

Se añade junto con el agar diluyéndolo por calentamiento.

#### **3.7.2.5 Cantidad y distribución del medio**

En el caso de medios sólidos, una vez fundidos por calentamiento, éstos deben ser dosificados en los recipientes escogidos. En el caso de medios líquidos se procederá a dosificar directamente en los frascos escogidos. Tanto si es un medio sólido como líquido, se procederá inmediatamente a realizar el autoclave de los contenedores con el medio. Para evitar inconvenientes durante el proceso de esterilización, se recomienda no cerrar con fuerza los frascos con tapa a rosca (Aguirre , Vazquez, Ugarte, Villaroel, & Yamashiro, 2010).

#### **3.7.2.6. Esterilización del medio**

La esterilización se realiza en un autoclave a una temperatura de 110 a 120°C, por 20 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> de presión. Se debe tener cuidado de que la presión del autoclave, nunca rebase las 20 lb/in<sup>2</sup>, ni esté por debajo de las 15 lb/in<sup>2</sup>. Transcurridos los 20 minutos, se desconecta el autoclave. Se abre muy lentamente la válvula para liberar el vapor para que la presión comience a bajar El autoclave puede abrirse únicamente cuando el manómetro marque. Conviene tener en cuenta que algunos de los componentes del medio de cultivo pueden ser termolábiles (algunas vitaminas, reguladores de crecimiento y diversos componentes orgánicos). En este caso, la esterilización de la solución que contiene la sustancia termolábil debe hacerse por filtración y añadirse una vez esterilizada al medio de cultivo previamente esterilizado y parcialmente (en medios sólidos) o totalmente (en medios líquidos) enfriarlo (Aguirre , Vazquez, Ugarte, Villaroel, & Yamashiro, 2010).

#### **3.7.3. Enraizamiento**

Se llevó a cabo en la sala de crecimiento del laboratorio de biotecnología que consta del control de temperatura y la luz necesarios para el óptimo desarrollo de plántulas en desarrollo.

El periodo que permaneció de acuerdo a cómo respondan las plantas al tratamiento dado. Para esto se observa el número de hojas y fundamentalmente el desarrollo radicular que presenta en estos periodos la fase de enraizamiento, es la preparación de las plántulas para el establecimiento en el suelo, es decir, las partes aéreas producidas in vitro son transferidas a medio de enraizamiento para el subsecuente trasplante al suelo las plantas obtenidas. El enraizamiento es una etapa que puede ser realizada in vitro. En el primer sistema, las raíces son regeneradas en condiciones asépticas y una planta completa es trasplantada en sustrato. En el segundo sistema, las partes aéreas son manipuladas

como micro estacas y todo el proceso de enraizamiento se da en sustrato estéril (aún en condiciones de laboratorio). La opción por uno de los dos sistemas depende fundamentalmente de la calidad de las partes aéreas obtenidas en la multiplicación, de la especie y del genotipo en cuestión. Otra alternativa es inducir el enraizamiento in vitro de las partes y trasplantarlas en sustrato estéril (en laboratorio). La rizogénesis puede ser dividida en inducción, iniciación, y alongamiento de raíces, que normalmente lleva una a tres semanas. Las dos primeras a veces consideradas como una sola responden o dependen de la adición de auxina en el medio de cultivo, donde el crecimiento y alongamiento de las raíces es estimulado por la presencia de auxina. La dificultad de un sistema de micro propagación está en determinar una condición in vitro, en la cual todas estas fases puedan ocurrir normalmente y, de preferencia, sin demandar manipulación adicional de una fase a la otra.

#### **3.7.4. Preparación de sustratos**

Materiales como la cascarilla de arroz fue adquirido en una tienda local, el resto de los materiales fueron recolectados de diferentes lugares. La cascarilla de arroz fue única que se sometió a calor en un tanque hasta dejarla tostada. La corteza de árbol se la dejó bajo remojo durante 24hrs para que esta adquiriera humedad.

Una vez obtenido los materiales fueron sometidos a dos tipos de desinfección por medio de calor, sometiéndola a calor seco durante 45min a 120°C. Esto se realizó para no tener problemas con hongos ni patógenos que atacan a plantas reproducidas in-vitro debido a su vulnerabilidad

#### **3.8 Aclimatación**

Ya la planta desarrollo un poco más tanto hojas como raíces se procedió al trasplante de las envases con sus respectivas tapas de acuerdo al orden establecido.

Se trató de controlar en lo posible las condiciones óptimas para el desarrollo de las plantas, esto se logra desinfectando los sustratos, realizando un tratamiento preventivo contra los hongos, controlando la intensidad de los rayos solares con la ayuda de una cubierta de media sombra y un invernadero que controla la pérdida de humedad y el ingreso de patógenos así como de sus vectores

El proceso de aclimatación consiste en el paso de condiciones in vitro como ser: la humedad adecuada, temperaturas ideales y no variables, luz de acuerdo a sus necesidades, inexistencia de patógenos y los nutrientes necesarios para vivir, a las condiciones del medio exterior, en esta situación la planta debe adaptarse para poder sobrevivir desarrollando sus raíces y su capacidad fotosintética para elaborar su propio alimento.

### **3.8.1 Riego**

En las primeras 2 semana se aplicó riego todos los días, 15 minutos en la mañana al medio día y en la tarde utilizando un pulverizador manual hasta llegar a humedecer completamente el sustrato.

En la tercera semana se aplicó riego todos los días, 15 minutos en la mañana y 15 en la tarde utilizando un pulverizador manual hasta llegar a humedecer completamente el sustrato.

El riego su principal causa de incertidumbre entre los cultivadores de orquídeas y al hecho de que una planta esté lista o no para el riego es siempre objeto de debate supone un problema para los cultivadores experimentados y también para los principiantes mientras están creciendo los orquídeas necesitan mantenerse uniformemente húmedo imitando a los extremos de ese quedado o inundación de las raíces

### **3.8.2 Control de plagas y enfermedades**

El método de control de plagas y enfermedades fue la desinfección de todo material con el que se trabajó y por último, un tratamiento preventivo de las raíces con un fungicida, antes y después de su trasplante.

Las precauciones tomadas fueron suficientes para impedir el ataque de patógenos y plagas que pudiesen haber afectado el proceso de aclimatación.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 ESTABLECIMIENTO IN VITRO

##### 4.1.1. Porcentaje de germinación

**Tabla 2 Datos del porcentaje de germinación en laboratorio**

Repetición	Tratamientos		
	M1	M2	M3
<b>F1</b>	100	100	100
<b>F2</b>	100	100	100
<b>F3</b>	100	100	100
<b>F4</b>	100	100	100
<b>F5</b>	100	100	100
<b>F6</b>	100	100	100
<b>F7</b>	100	100	100
<b>F8</b>	100	100	100
<b>F9</b>	100	100	100
<b>F10</b>	100	100	100
$\Sigma$	1000	1000	1000
$\square$	100	100	100

En el tabla N° 2 se exponen los promedios de los tratamientos, verificándose promedios similares en todos los tratamientos con una media general del 100% de semillas germinadas.

Los resultados hallados por Díaz (2015), concuerdan con los encontrados en la presente investigación, el mismo que evaluó la germinación in vitro de orquídeas mexicanas utilizando el medio completo MS, con o sin reguladores de crecimiento, en condiciones de luz; por otra parte Díaz (2015) sostiene que el tiempo para lograr el 100% de la germinación varía para cada orquídea, variando entre los 30 y 45 días, después de la siembra, señalando también que el medio óptimo de germinación es MS sin reguladores de crecimiento.



#### 4.1.1.1. Análisis de varianza del Porcentaje de germinación

El conjunto de datos no presenta una distribución normal, por lo que la aplicación del análisis de varianza no es viable; sin embargo se puede observar que no existen diferencias entre los promedios de los tratamientos. Debido a lo dilucidado, no se requiere la aplicación de la prueba de Tukey.

## 4.2 DESARROLLO DE LAS VITROPLANTAS

### 4.2.1 Número de hojas desarrolladas

**Tabla 3 Datos del Número de hojas**

REPETICIONES	TRATAMIENTOS	
	M1 (M&S con BAP)	M2 (M&S con AIA)
<b>F1</b>	5.00	5.50
<b>F2</b>	5.25	5.00
<b>F3</b>	4.50	5.00
<b>F4</b>	5.00	6.00
<b>F5</b>	3.25	4.75
<b>F6</b>	4.75	5.00
<b>F7</b>	4.50	6.25
<b>F8</b>	5.00	5.50
<b>F9</b>	4.00	5.00
<b>F10</b>	5.00	5.00
$\Sigma$	46.25	53.00
$\square$	4.63	5.30

El conjunto de datos presentados en el Tabla N° 3 muestra un promedio 4,63 hojas en el tratamiento M1 (M&S con BAP), con datos superiores a las 3,25 hojas e inferiores a 5,25; mientras que en el tratamiento M2 (M&S con AIA) el promedio se muestra superior al tratamiento M1 en 0,67 hojas, alcanzando un promedio de 5,30 hojas.

En la fase de organogénesis se observó que al agregar BAP al medio de cultivo en concentraciones de 1.0 a 3.0 mg l<sup>-1</sup> se logra el proceso de brotación. Se obtuvo un promedio de 6.75 brotes por explante en la concentración BAP 1.5/ ANA 0.15 mg l<sup>-1</sup>, la que resultó ser estadísticamente diferente a los

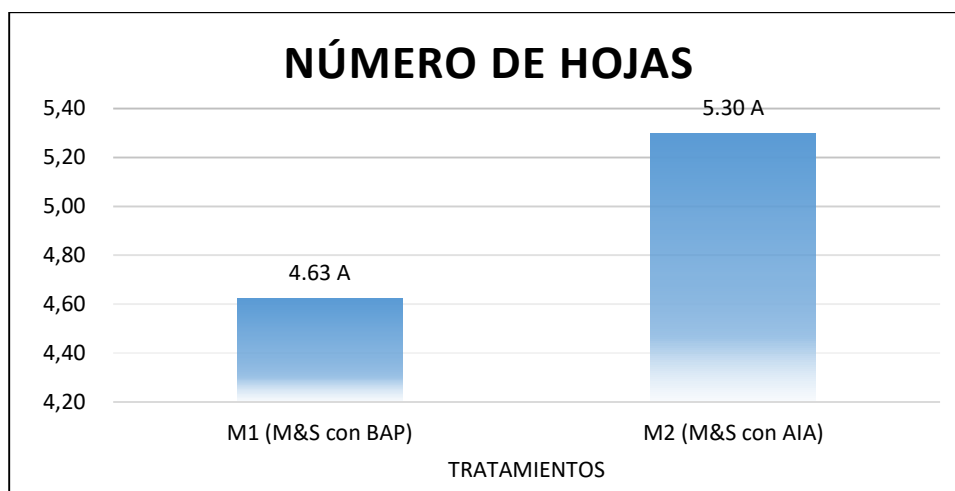
demás tratamientos. En lo que respecta a las variables número de hojas y raíces no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, se evaluaron las variables de forma individual en la combinación BAP/ANA (Cazarez, 2016)

#### 4.2.1.1. Comparación de los datos del Número de hojas por T de Student

**Figuras 5 Promedios del Número de hojas en los tratamientos comparados por T de Student. Medias seguidas de letras iguales no difieren al 5%.**

**T CALCULADA = 3.36**

**T DE STUDENT = 6.31**



Según la prueba de Hipotesis mediante la T de Student (Figura N° 5 ), los tratamientos M1 y M2 no poseen diferencias significativas al 5%, debido a que la T calculada es menor que la T de Student ( $3.36 < 6.31$ ), respecto al número de hojas en la fase de Desarrollo de las vitroplantas.

Las Fito hormonas son hormona vegetal que interrumpe el período de latencia de las semillas, haciendo que germinen. Además de esto, regulan el crecimiento longitudinal del tallo y la elongación celular, estimulando su desarrollo. Esta hormona es indispensable para la transición de la planta de su fase juvenil a su fase adulta. Esto lo hacen mediante una alteración de la distribución del calcio en el organismo vegetal.

Son fitohormonas muy activas y con una concentración muy baja produce una respuesta satisfactoria. También desarrollan una importante función en el crecimiento embrionario y la germinación de la semilla. En general, esta hormona vegetal contribuye a todos los procesos, incluida la formación del fruto (Azenon, 2013).

#### 4.2.2. Número de raíces desarrolladas

**Tabla 4 Datos del Número de raíces**

REPETICIONES	TRATAMIENTOS	
	M1 (M&S con BAP)	M2 (M&S con AIA)
<b>F1</b>	3.25	3.75
<b>F2</b>	3.00	3.75
<b>F3</b>	3.00	3.75
<b>F4</b>	3.75	3.75
<b>F5</b>	3.25	3.75
<b>F6</b>	3.75	3.75
<b>F7</b>	3.50	4.25
<b>F8</b>	3.50	3.50
<b>F9</b>	3.25	3.50
<b>F10</b>	3.00	3.25
$\Sigma$	33.25	37.00
$\square$	3.33	3.70

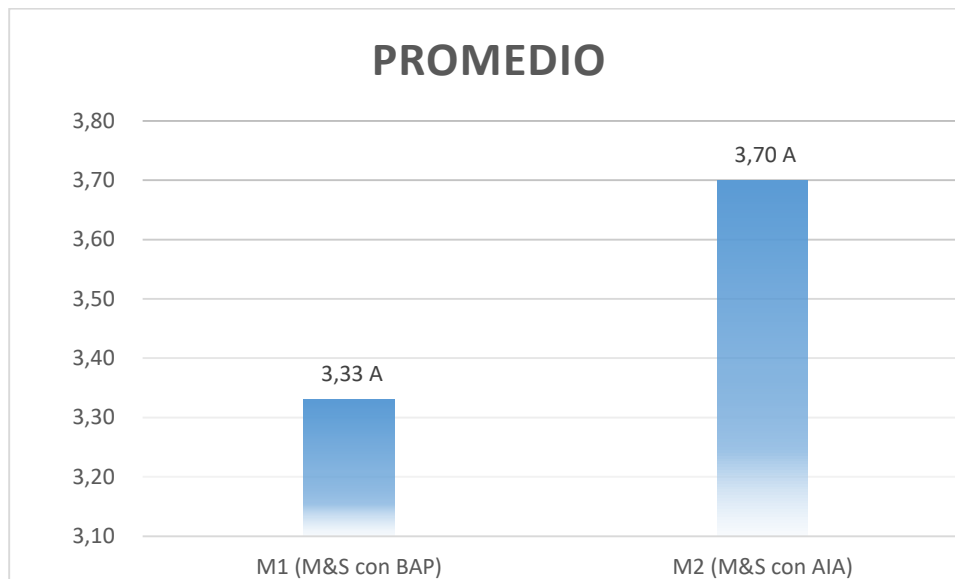
El conjunto de datos presentados en el tabla N° 4 muestra un promedio 3,33 raíces en el tratamiento M2 (M&S con AIA), con datos superiores a las 4,25 hojas e inferiores a 3,25; mientras que en el tratamiento M1 (M&S con BAP) el promedio se muestra superior al tratamiento M2 en 0,37 raíces, alcanzando un promedio de 3.70 raíces.

#### 4.2.2.1. Comparación de los datos del Número de raíces por T de Student

**Figuras 6 Promedios del Número de raíces en los tratamientos comparados por T de Student. Medias seguidas de letras iguales no difieren al 5%.**

**T CALCULADA = 3.74**

**T DE STUDENT = 6.31**

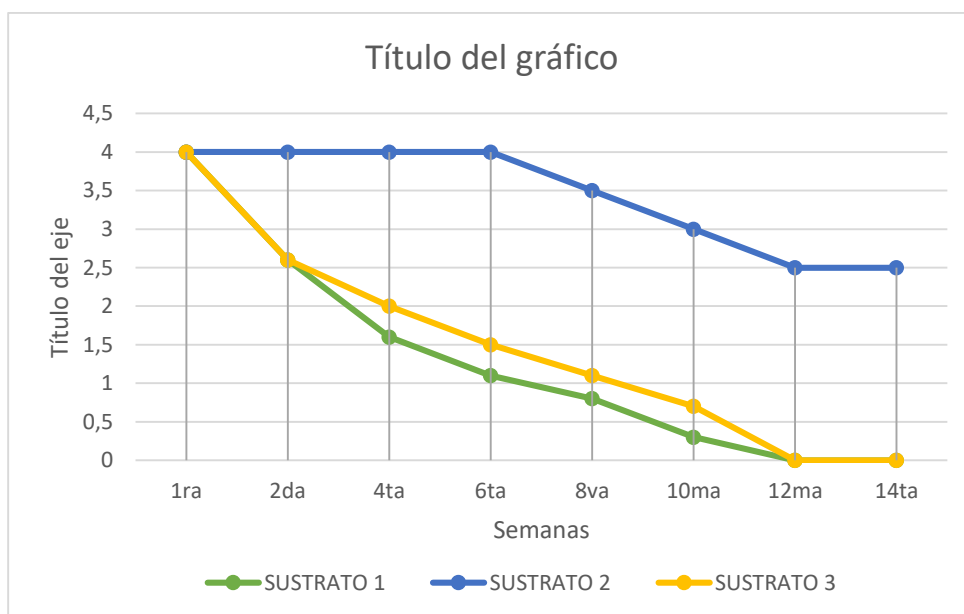


Según la prueba de Hipótesis mediante la T de Student (figura N° 6 ), los tratamientos M1 y M2 no poseen diferencias significativas al 5%, debido a que la T calculada es menor que la T de Student ( $3.74 < 6.31$ ), respecto al número de raíces en la fase de Desarrollo de las vitro plantas.

### 4.3. SOBREVIVENCIA DE VITROPLANTAS A LA ACLIMATACIÓN

La sobrevivencia de las exvitroplantas fue evaluada en siete ocasiones, con una frecuencia de dos semanas hasta la decimocuarta semana, en la misma que se observó mortandad en mayor y menor grado.

**Figuras 7 Sobrevivencia de las vitro plantas**



La figura N° 7 expone la sobrevivencia de las ex vitro plantas, observándose una mayor y más acelerada mortandad en la cascarilla de arroz (Sustrato 1), a partir de la segunda semana, hasta que en la decimosegunda semana el porcentaje de mortandad asciende al 100%.

El sustrato es parte importante para tener éxito en el cultivo de esta orquídea, por tal razón es de vital importancia seleccionar un sustrato que tenga la capacidad de retener la humedad adecuada para la planta y que tenga la suficiente porosidad lo cual permitirá drenar fácilmente el exceso de agua después de los riegos; ayudando de esta manera a evitar el encharcamiento que es la causa principal de la pudrición de las raíces. Los sustratos para cultivar Phalaenopsis tienen que ser de textura liviana y de densidad baja o intermedia, lo cual facilita un buen crecimiento de raíces. (Azenon, 2013)

**Tabla 5 Sobrevivencia de las exvitroplantas a la aclimatacion a las 12 semanas**

Repeticiones	sustrato		
	s1	s2	s3

<b>I</b>	0.00	2	0.00
<b>II</b>	0.00	1	0.00
<b>III</b>	0.00	2	0.00
<b>IV</b>	0.00	3	0.00
<b>V</b>	0.00	4	0.00
<b>VI</b>	0.00	0	0.00
<b>VII</b>	0.00	3	0.00
<b>VII</b>	0.00	2	0.00
<b>IX</b>	0.00	4	0.00
<b>X</b>	0.00	4	0.00
<b>PROMEDIO</b>	<b>0.00</b>	<b>2.50</b>	<b>0.00</b>

De acuerdo a la tabla N° 5, podemos observar que el tratamiento con el sustrato 2 con corteza de churqui, obtuvo una sobrevivencia del 62.5% de las vitroplantas aclimatadas. Seguido del tratamiento S1 y S3, (ambos contenían cascarilla de arroz), obteniendo un 0 % de sobrevivencia.

### 4.3.1. Análisis de Varianza de la Supervivencia de las exvitroplantas

**Tabla 6 ANOVA de la supervivencia de las exvitroplantas a las 12 semanas**

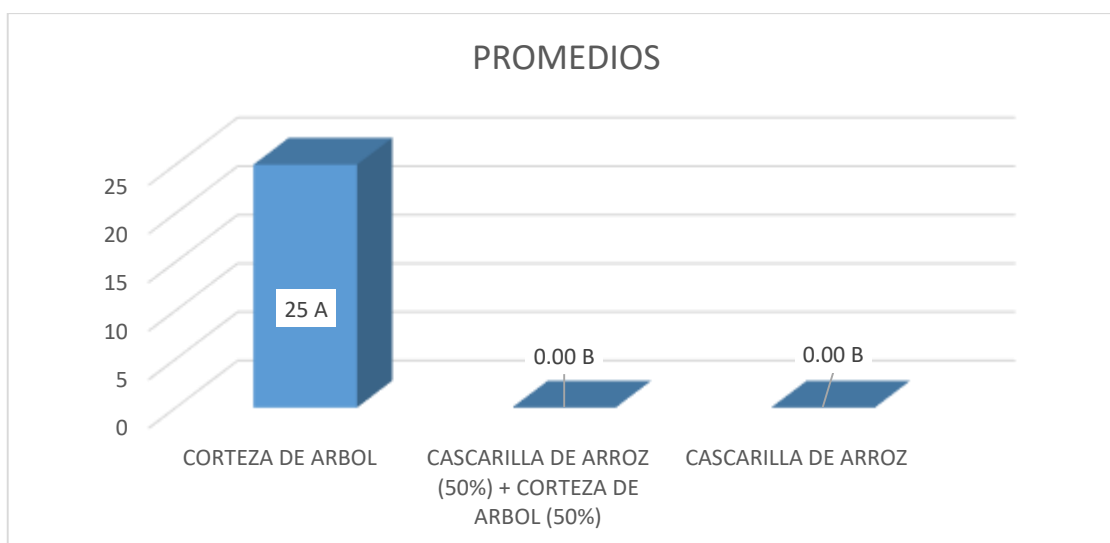
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. calculada	ft5%	ft1%
total	29	58.17				
tratamiento	2	41.67	20.83	<b>34.09**</b>	<b>3.35</b>	<b>5.49</b>
error	27	16.50	0.61			

Realizado el análisis de varianza de los tratamientos, podemos observar que se obtiene una diferencia altamente significativa en los tratamientos al 1% y al 5%, por lo que se procede a la elaboración de la prueba de Tukey.

### 4.3.2. Prueba de Tukey para la comparación de promedios de supervivencia

**Figuras 8 Prueba de Tukey: promedios de supervivencia seguidos de letras distintas difieren según Tukey (5%)**

**TUKEY 5% = 0.87**



Esto quiere decir que el tratamiento dos tiene diferencia significativa a comparación con los otros 2 tratamientos pero entre los otros 2 tratamientos (T1 Y T3) no se encuentran diferencias significativas.

De acuerdo a los resultados de la prueba de tukey, se puede observar, que el tratamiento S2, corteza de árbol, es estadísticamente diferente a los demás tratamientos, los 1 tratamientos S1 y S3, no son estadísticamente diferentes.

De acuerdo al cuadro N 8, podemos observar que el tratamiento con el sustrato 2 con corteza de churqui, obtuvo una sobrevivencia de 2.5 de 4 plantas de las vitroplantas aclimatadas. Seguido del tratamiento S3 (mezcla de cascarilla de arroz y corteza),

De acuerdo a los resultados de la prueba de tutkey, se puede observar, que el tratamiento 2, corteza de árbol, es estadísticamente diferente a los demás tratamientos, los 1 tratamientos S1 y S3, no son estadísticamente diferentes.

A los 12 semanas se obtuvo la aclimatación de las plántulas y se encontró que el mejor sustrato fue el S3 (1:1:1 corteza de encino, tezontle y carbón) con 85% de plántulas, las cuales mostraron nuevos brotes y raíces, en el caso del S1 y del S2 se observó que a los pocos días de su aclimatación las plantas empezaron a morir, ya que el S1 fue el menos apto para la especie y el S2 no tenía muy buen drenado (Cazarez, 2016)

Muchas orquídeas pueden crecer sobre corteza y en diversas mezclas de compost. Sea cual sea la tierra utiliza da los criterios principalmente son una buena aeración y un drenaje rápido. La mayoría de las orquídeas resisten ciertos apelmazamientos de las raíces en el recipiente siempre y cuando la tierra este suelta y permite la circulación de aire en torno a las raíces. (Rittershausen & Brian, 2014)

El compost de corteza era mucho más barato de producir y más fácil de manejar que la anterior mezcla de musgo y fibra, y hoy en día constituye la mezcla que se vende específicamente para orquídeas en todo el mundo. Se consigue en árboles talados localmente y se distribuye a través de los viveros especializados y los grandes centros de jardinería. (Rittershausen & Brian, 2014)

La utilización de musgo representa una buena alternativa pero al saber que representa de gran impacto ecológico se decidió la utilización de un replazante que sea más barato, no contamine el medio ambiente y que cumpla con estas funciones y se optó por el uso de cascarilla de arroz puesto que tiene mucha porosidad y una buena retención de humedad al aplicarle un tratamiento térmico.





# CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

- Con base a los resultados obtenidos se concluye:

En la etapa de germinación de semillas de orquídeas in vitro no existe una diferencia entre los tres tratamientos aplicados.

- En las Fito hormonas (AIA & BAP) se presentó una diferencia, pero al no ser significativa se puede utilizar cualquiera de éstas.

- El número de hojas como de las raíces es similar y en ambos casos se mostró que existe un mayor número de éstas en el medio 2 pero al no ser estadísticamente significativo se puede usar cualquier medio

- Se demostró que el mejor sustrato para la aclimatación de las orquídeas es el de corteza de árbol churqui (*Acacia caven (Mol)*), presentando un porcentaje de 62.5 mayor de sobrevivencia de las vitroplantas, a diferencia de los sustratos con cascarilla de arroz que resulto ser de cero por ciento de plantas adaptadas en los medios que contenían este sustrato.

### 5.2 Recomendaciones

-Se recomiendo probar con otros medios o mezclas como se hizo con el agua de coco y 50% de MS como por otra opción a probar sería por ejemplo plátano o piña procesada y mezclarlo con MS en diferentes concentraciones.

- Se recomienda probar otro tipo de Fito hormonas para la fase de desarrollo del cultivo.

- Se recomienda continuar con las investigación referente a la producción de orquídeas in vitro, al constituirse esta la primera en este tipo y al ser necesaria para la conservación y producción de orquídea nativas lo cual representaría una nueva alternativa de negocio para el departamento.

- Se recomienda probar con otros sustratos para la fase de aclimatación que es ten disponibles en la región ya que sustratos la como perlita o fibra de coco es caro o difícil de conseguir incluso en el mercado nacional.

-Por lo anterior mencionado, se recomienda desarrollar una herramienta para la conservación de las orquídeas y ésta sería la de cultivo in vitro. Con el fin de conocer un poco más sobre esta herramienta de conservación y propagación de orquídeas, en el presente trabajo se busca

recopilar información básica sobre el cultivo in vitro de las orquídeas y estructurar un protocolo en todas sus etapas para el departamento de Tarija.

- Se recomienda utilizar otros tipos de medidas como largo de raíces y hojas en la etapa desarrollo