

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Jardín Botánico Lankester
(Universidad de Costa Rica)

"Micropropagación de *Cattleya skinneri* y
Cattleya skinneri x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices"

Informe de Proyecto de Graduación para optar por el grado de
Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

Carlos Alvarado Ulloa

Cartago, 2000

INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD

MICROPROPAGACIÓN DE *Cattleya skinneri* y
Cattleya skinneri x *Cattleya maxima* POR CULTIVO DE ÁPICES

Carlos Alvarado Ulloa

Cartago
2000

MICROPROPAGACIÓN DE *Cattleya skinneri* y
Cattleya skinneri x *Cattleya maxima* POR CULTIVO DE ÁPICES

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica
por Carlos Alvarado Ulloa como requisito parcial para optar al título de Bachiller en
Ingeniería en Biotecnología

Miembros del Tribunal

M.Sc Silvana Alvarenga Venutolo
Profesora Guía

M.Sc Jorge Warner Pineda
Lector

Lic. Anabelle Muñoz Bustos
Lectora

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por
permitirme llegar hasta esta
etapa de mi vida

A mi madre con todo mi amor
por su apoyo incondicional

A mi padre por darme el
ejemplo del trabajo y por su
apoyo

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su más sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al todo el Departamento de Biología del ITCR por su por su esfuerzo y dedicación en mi formación como profesional, especialmente a mi profesora guía M.Sc Silvana Alvarenga Venutolo por transmitirme sus conocimientos.

A la Lic. Anabelle Muñoz por toda la información solicitada

Al Jardín Botánico Lankester y en especial al M.Sc Jorge Warner por permitirme realizar la práctica de especialidad en el laboratorio de dicha institución y por la información brindada

A Donald Granados por su sincera amistad y ayuda en la preparación de las fotografías, trabajo escrito y exposición.

Muy especialmente a Marjorie, Grace y Thaís por ser mi grupo de estudio y además, por brindarme su amistad y confianza durante todos estos años de estudio

A Douglas, Andrea, Kelly, Jose y demás amigos por formar parte importante de mi vida

A mis abuelos y familia en general por creer siempre en mi.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|------|
| DEDICATORIA..... | i |
| AGRADECIMIENTOS | i |
| ÍNDICE GENERAL..... | iii |
| ÍNDICE DE TABLAS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| RESUMEN | vii |
| ABSTRACT | viii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 11 |
| 2.1 Generalidades de las orquídeas | 11 |
| 2.1.1 <i>Perspectiva histórica de las orquídeas</i> | 11 |
| 2.1.2 <i>Diversidad y Distribución</i> | 12 |
| 2.1.3 <i>Ecología</i> | 14 |
| 2.2 Descripción botánica y anatómica de la Familia Orchidaceae | 16 |
| 2.2.1 <i>Tipo de crecimiento</i> | 16 |
| 2.2.2 <i>Estructuras vegetativas</i> | 16 |
| 2.2.3 <i>La flor de las orquídeas</i> | 18 |
| 2.2.4 <i>Frutos y semillas</i> | 20 |
| 2.3 El género <i>Cattleya</i> | 20 |
| 2.3.1 <i>Generalidades y ubicación del género</i> | 20 |
| 2.3.2 <i>Ecología y descripción</i> | 21 |
| 2.3.3 <i>Cattleya skinneri</i> | 22 |
| 2.3.4 <i>Cattleya maxima</i> | 24 |
| 2.3.5 <i>Cattleya skinneri x Cattleya maxima</i> | 25 |
| 2.4 Micropropagación..... | 27 |
| 2.4.1 <i>Micropropagación de orquídeas</i> | 30 |
| 2.4.2 <i>Cultivo de ápices y meristemos en orquídeas</i> | 31 |
| 2.4.3 <i>Micropropagación de <u>Cattleya</u> por cultivo de ápices y meristemos</i> | 33 |
| 2.5 Jardín Botánico Lankester..... | 38 |
| 3. OBJETIVOS | 40 |
| 4. METODOLOGÍA | 41 |
| 4.1 Selección de explantes y desinfección..... | 41 |
| 4.2 Etapa de introducción | 44 |
| 4.3 Etapa de multiplicación | 46 |
| 4.4 Etapa de enraizamiento | 48 |
| 5. RESULTADOS..... | 49 |
| 5.1 Selección de explantes y desinfección..... | 49 |
| 5.2 Etapa de introducción | 53 |
| 5.3 Etapa de multiplicación | 56 |
| 5.4 Etapa de enraizamiento | 58 |
| 6. DISCUSIÓN | 60 |
| 6.1 Selección de explantes y desinfección..... | 60 |
| 6.2 Oxidación de los explantes | 65 |

CONTINUA

| | |
|-----------------------------------|----|
| 6.3 Etapa de introducción | 67 |
| 6.4 Etapa de multiplicación | 72 |
| 6.5 Etapa de enraizamiento | 76 |
| 7. CONCLUSIONES | 79 |
| 8 RECOMENDACIONES | 82 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 84 |
| ANEXO 1 | 88 |
| ANEXO 2 | 89 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 4.1 Tratamientos de desinfección realizados en brotes laterales de <i>C. skinneri</i> | 43 |
| Tabla 4.2 Tratamientos de desinfección realizados en brotes laterales de <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> | 44 |
| Tabla 4.3 Número de explantes de <i>C. skinneri</i> colocados en medio de introducción según el tipo de medio de cultivo y el tratamiento de desinfección..... | 45 |
| Tabla 4.4 Número de explantes de <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> colocados en medio de introducción según el tipo de medio de cultivo y el tratamiento de desinfección | 45 |
| Tabla 5.1 Porcentaje de contaminación de explantes de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> introducidos en cultivo aséptico | 50 |
| Tabla 5.2 Porcentaje de oxidación de explantes de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> luego de ser introducidos en cultivo aséptico | 50 |
| Tabla 5.3 Porcentaje de sobrevivencia de explantes de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> luego de ser sometidos a los diferentes tratamientos de desinfección..... | 52 |
| Tabla 5.4 Tiempo promedio de formación de cuerpos protocórmicos en ápices de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> | 55 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 Inflorescencia de <i>Cattleya skinneri</i> | 24 |
| Figura 2.2 Flor de <i>Cattleya maxima</i> | 25 |
| Figura 2.3 Planta de <i>Cattleya skinneri</i> x <i>Cattleya maxima</i> mantenida en condiciones de invernadero en el Jardín Botánico Lankester | 26 |
| Figura 2.4 Inflorescencia del híbrido <i>Cattleya skinneri</i> x <i>Cattleya maxima</i> | 27 |
| Figura 4.1 Invernadero del Jardín Botánico Lankester de donde se extrajeron las plantas de <i>Cattleya skinneri</i> y <i>Cattleya skinneri</i> x <i>Cattleya maxima</i> donadoras de explantes..... | 41 |
| Figura 4.2 Brote lateral de <i>Cattleya skinneri</i> x <i>Cattleya maxima</i> utilizado como explante inicial para el cultivo <i>in vitro</i> de ápices..... | 42 |
| Figura 5.1 Porcentaje de contaminación de ápices de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> sometidos a diferentes tratamientos de desinfección | 51 |
| Figura 5.2 Porcentaje de oxidación presentado en ápices de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> , de acuerdo con el estado físico del medio de cultivo. | 52 |
| Figura 5.3 Porcentaje de explantes de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> . <i>maxima</i> con formación de cuerpos protocórmicos de acuerdo con el tipo de medio de cultivo | 53 |
| Figura 5.4 Porcentaje de explantes de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> con formación de cuerpos protocórmicos de acuerdo con el estado físico del medio de cultivo..... | 54 |
| Figura 5.5 Ápice de <i>C. skinneri</i> con formación de cuerpos protocórmicos..... | 55 |
| Figura 5.6 Brotes adventicios desarrollados a partir de cuerpos protocórmicos de <i>C. skinneri</i> x <i>C maxima</i> cultivados <i>in vitro</i> | 56 |
| Figura 5.7 Brotes adventicios de <i>C. skinneri</i> con desarrollo foliar en etapa de multiplicación..... | 57 |
| Figura 5.8 Índice de brotación de <i>C. skinneri</i> y <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> , en dos diferentes medios de cultivo líquidos de multiplicación | 58 |
| Figura 5.9 Vitroplantas de <i>C. skinneri</i> en fase de enraizamiento cultivadas en medio líquido | 58 |

RESUMEN

Se inocularon ápices con 3 a 4 primordios foliares provenientes de brotes laterales de plantas de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima*. Previamente fueron sometidos a 4 tratamientos de desinfección, siendo el más efectivo el que consistió de una doble desinfección con NaOCl (al 3% y 1%, por 10 y 20 minutos, respectivamente) con una previa inmersión en alcohol 95% por 5 minutos. Las soluciones de NaOCl se utilizaron con 0,5% de Physan 20®; antes de la inoculación en medio aséptico se sumergieron en Ácido Cítrico (100 mg/l) sin resultados efectivos, produciéndose una gran mortalidad de explantes. El medio líquido resultó ser el más efectivo en las etapas de introducción y multiplicación, mientras que el medio semisólido en la etapa de enraizamiento. *C. skinneri* respondió mejor en medio MS (1962) complementado con 0,1 mg/l ANA, 0,2 mg/l KIN y 15% v/v Agua de Coco en la formación de cuerpos protocórmicos, comportamiento contrario a *C. skinneri* x *C. maxima* que mostró una mejor en medio Knudson C (1946) modificado. La separación de brotes adventicios fue la forma más efectiva de propagación en medio de multiplicación suplementado con 0,18 mg/l ANA, 0,22 mg/l KIN y 15% v/v Agua de Coco). El mayor índice de brotación lo presentó *C. skinneri*. Tanto esta especie como el híbrido respondieron mejor en medio Knudson C (1946) modificado de acuerdo al índice de brotación. La etapa de enraizamiento sólo se realizó en vitroplantas de *C. skinneri*, las cuales se cultivaron en medio Knudson C (1946) con el 50% de la concentración de sales y sin reguladores de crecimiento. Aunque el enraizamiento se dio tanto en medio líquido como semisólido, fue este último el que indujo mayor crecimiento vegetal y número de raíces.

Palabras clave: *Cattleya skinneri* / *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* / micropropagación / in vitro / ápice

ABSTRACT

Shoot apex explants with 3 to 4 leaf primordia from young vegetative shoots of *Cattleya skinneri* and *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* plants were inoculated in aseptic culture. Previously, 4 disinfecting treatments were tested on the explants; the most effective treatment consisted in a NaOCl double disinfection (3% and 1%, for 10 and 20 minutes, respectively) with a previous immersion in 95% ethanol for 5 minutes. The NaOCl solutions contained 0,5% Physan 20 ®. Before the inoculation in aseptic culture the apexes were immersed in Citric Acid solution (100 mg/l) without effective results, producing high mortality rates. Liquid culture media was the most effective in starting and multiplication stages, solid culture media was optimum in rooting stage. *C. skinneri* responded better on MS (1962) medium supplemented with 0,1 mg/l ANA, 0,2 mg/l KIN and 15% (v/v) Coconut water for the protocorm-like bodies formation; *C. skinneri* x *C. maxima* has a better response in modified Knudson C (1946) medium for the formation of these structures. Adventitious shoots separation was the most effective propagation method in multiplication medium supplemented with 0,18 mg/l ANA, 0,22 mg/l KIN and 15% (v/v) Coconut water. *C. skinneri* had the highest shooting rate compared with the hybrid, but both responded better in modified Knudson C (1946) medium. The rooting stage was performed only with *C. skinneri* plantlets cultured on 50% concentration salts and free-hormone Knudson (1946) medium. Although the rooting process was successful on liquid and solid media, the last one inducted the highest plant growth and root quantity.

Keywords: *Cattleya skinneri* / *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* / micropropagation / in vitro / apex

1. INTRODUCCIÓN

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

Costa Rica es reconocida por poseer una gran diversidad de orquídeas, sin embargo, muchas de las especies que existen en su territorio (al igual que sucede en otras partes del mundo) están en peligro de extinción. La deforestación ha provocado serios daños especialmente en las poblaciones de orquídeas epífitas, las cuales, al ser tan especializadas en su ecología, se ven seriamente afectadas por los cambios ambientales. Además de lo anterior, las orquídeas, aunque producen millones de semillas, poseen bajos porcentajes de germinación en condiciones naturales, ya que el endospermo que rodea el embrión es muy poco o no existe; para ello, las orquídeas han desarrollado relaciones simbióticas con hongos que digieren la materia orgánica y transfieren los carbohidratos al embrión.

El gran valor comercial que poseen ciertas especies de orquídeas ha provocado el saqueo indiscriminado de individuos silvestres, y la falta de conocimientos en el cultivo de estas plantas provoca grandes pérdidas de material valioso, con la consecuente erosión genética.

La capacidad genética de muchas orquídeas de formar híbridos interespecíficos e intergenéricos ha resultado en la creación de un sinnúmero de híbridos artificiales, muchos de los cuales adquieren precios elevados en el mercado. El género *Cattleya* es uno de los más utilizados en hibridación. La forma de mantener un híbrido, una vez que ha sido producido, es por vía vegetativa.

Cattleya skinneri, conocida comúnmente como Guaria Morada, es la Flor Nacional de Costa Rica, y es una de las especies en mayor peligro de extinción actualmente. La urbanización, la extracción de individuos silvestres de los bosques y el mal manejo que se le ha dado por parte de aquellos que poseen ejemplares, ha producido esta realidad.

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

El Jardín Botánico Lankester, de la Universidad de Costa Rica, en su labor de conservar y rescatar especies epífitas en peligro de extinción, dentro de las que se encuentra *C. skinneri*, ha utilizado técnicas de cultivo *in vitro*, específicamente la germinación asimbiótica *in vitro*. Además ha logrado, por esta misma vía, altos niveles de germinación de híbridos de valor, como es el caso del híbrido *C. skinneri* x *C. maxima*. Sin embargo, el cultivo de ápices no había sido realizado sino hasta con los dos tipos de orquídea utilizados en la presente investigación. La utilización de cultivo de ápices en *C. skinneri* permite la multiplicación clonal de una especie en peligro de extinción de una forma rápida (más que la reproducción por semilla) obteniendo una excelente sanidad vegetal. La micropropagación de *C. skinneri* x *C. maxima* permite mantener un híbrido producido por el mismo Jardín Botánico Lankester, de una forma rápida con plantas libres de enfermedades. Uno de los puntos de más importancia en la propagación de orquídeas utilizando cultivo de tejidos es el establecimiento de métodos de multiplicación que abastezcan el mercado sin necesidad de extraer individuos silvestres, y de mantener híbridos de valor de una forma simplificada.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de las orquídeas

2.1.1 *Perspectiva histórica de las orquídeas*

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

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

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

Por más de 3000 años las orquídeas han sido apreciadas en el Lejano Oriente, y su popularización como objeto de cultivo tiene ya mucho tiempo: en la fecha temprana de 1233 d. C., Chao Shih-Keng publicó su *Ching-Chang Lan-Pu*, libro dedicado enteramente a esas plantas (Walter, 1979).

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

2.1.2 Diversidad y Distribución

Las orquídeas constituyen la familia más grande de las Angiospermas y por lo tanto la más diversa (Abdelnour y Muñoz, 1997). El número de especies fluctúa entre 17 000 y 35 000 especies conocidas, las cuales se agrupan en 650 a 900 géneros (Kuan y González, 1993). Esta familia está excelentemente representada en Costa Rica, con más de 1400 especies distribuidas en 179 géneros (Mora-Retana y García, 1992)

Son plantas herbáceas, perennes, cuyo tamaño oscila entre los 3 a 4 mm hasta varios metros de longitud. Se encuentran en los cinco continentes y únicamente las regiones polares y los grandes desiertos no presentan condiciones para su sobrevivencia. Crecen en las ciénagas, en los desiertos de poca extensión, en las selvas y en las sabanas. Sin embargo, el mayor número de orquídeas se encuentra en las zonas tropicales, mencionándose la existencia de unas 20 000 especies distribuidas en 600 a 900 géneros (González, 1995). Unas especies viven formando parte de la vegetación emergente de los cuerpos de agua aunque ninguna orquídea es estrictamente acuática (Walter, 1979).

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

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

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

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

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

2.1.3 Ecología

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

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

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

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

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

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

En sus ecosistemas naturales, las orquídeas viven en un delicado balance con los otros organismos del ambiente, por lo que pequeños cambios ambientales tiene efectos adversos sobre ellas y pueden resultar en disminuciones en las poblaciones o en último caso pueden llevar a su extinción. En la mayoría de los casos el hábitat de las orquídeas son los bosques, y aquellas que son epífitas viven en estrecha dependencia con los árboles. La deforestación implica la muerte de las orquídeas que viven en los árboles: el sol directo las quema, con la muerte del árbol se desprende la corteza en donde se hallan aferradas las orquídeas y con la lluvia, el crecimiento de las malezas y otros, se produce su destrucción (Abdelnour y Muñoz, 1997).

2.2 Descripción botánica y anatómica de la Familia Orchidaceae

2.2.1 Tipo de crecimiento

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

2.2.2 Estructuras vegetativas

El sistema radical de las orquídeas, tiene notables modificaciones del tipo normal de raíz. Sin embargo, al igual que en el resto de las plantas es un órgano vital para el anclaje de la planta y la absorción de nutrientes. En las orquídeas terrestres, las raíces son estructuras alargadas y ramificadas, cubiertas de pelillos absorbentes. Están cubiertas por hifas que las penetran y forman dentro de las raíces nódulos. La combinación raíz/hongo recibe el nombre de micorriza (Kuan y González, 1993). Poseen un corto o elongado rizoma, un cormo o tubérculo. Las raíces pueden ser subterráneas o aéreas, fibrosas, carnosas o tuberosas, fasciculadas o adventicias, distribuidas sobre el rizoma o el tallo (Rodríguez *et al*, 1986).

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

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

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

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

Las hojas de las orquídeas siempre son simples, sus márgenes son enteros (no tienen espinas, ni son aserrados), y por lo general son angostas y alargadas (Kuan y González, 1993). Las hojas pueden ser basales o caulinares, persistentes o deciduas, varían de una vaina foliácea a una lámina ancha o angosta con o sin peciolo. Lámina filiforme u orbicular, de membranácea a carnosa o caríacea, plegada, convoluta, conduplicada o equitante (Rodríguez *et al*, 1986).

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

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

2.2.3 La flor de las orquídeas

Como en la mayoría de las monocotiledóneas, la flor de las orquídeas está construida en verticilos o series de tres partes cada uno: tres sépalos, tres pétalos (de los que uno se modifica para formar el labelo), seis estambres (3, 4 ó 5 de ellos eliminados durante la evolución) y 3 carpelos unidos (Walter, 1979). Cuando se trata de inflorescencias, éstas pueden ser terminales o laterales, subtendidas por un pedúnculo largo o abreviado, de una o más flores, comúnmente una espiga, un racimo simple o una panícula (Rodríguez *et al*, 1986).

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

Los pétalos laterales usualmente son estructuras vistosas aunque de menor tamaño que el tercer pétalo (central), modificado para formar el labelo, labio o corneta de la flor (Walter, 1979). Como los sépalos, los pétalos sirven para atraer polinizadores a la planta, especialmente el labelo, que funciona como plataforma para el aterrizaje de los insectos, por lo cual difiere en forma, tamaño, color y fragancia de los otros pétalos. El labelo da al estereotipo de la flor de orquídea su forma y simetría bilateral (Kuan y González, 1993). El labelo siempre se sitúa

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

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

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

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

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

2.2.4 Frutos y semillas

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

2.3 El género *Cattleya*

2.3.1 Generalidades y ubicación del género

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

El nombre del género *Cattleya* se dio en honor al botánico y horticultor inglés William Cattley, el cual en 1818 recibió unos musgos y líquenes provenientes de Brasil que venían envueltos en unas hojas de lo que hoy se conoce como *Cattleya labiata*. El señor Cattley cultivó las hojas hasta obtener floración, siendo la primera *cattleya* en descubrirse (Horich, 1980).

Las cattleyas son originarias de las alturas medias de América Central y Sur América. En el mundo se encuentran cerca de 65 especies diferentes (Kuan y González, 1993)

Las especies de este género se han dividido en dos grupos: las cattleyas labiadas o unifoliadas (generalmente de Sur América), que tienen una sola hoja que sale del ápice del pseudobulbo, sus flores son grandes y de pétalos anchos y vistosos. Normalmente producen dos o tres flores, que se mantienen por 1 a 4 semanas, ocurriendo un máximo de dos floraciones al año. El requerimiento de luz de éstas cattleyas es mayor que el de la bifoliadas (Kuan y González, 1993). Las especies más representativas de este tipo son *C. mossiae*, *C. trianaei*, *C. dowiana*, *C. gaskelliana*, *C. lawranceana*, *C. lueddmanniana*, *C. mendellii*, *C. percivaliana*, *C. schroederae*, *C. warnerii*, *C. warscewiczii*, *C. luteola*, *C. maxima* (Horich, 1980).

El otro grupo es el de las bifoliadas, porque tienen dos y algunas veces tres hojas, muy diferentes al tipo labiada (Horich, 1980). Las cattleyas bifoliadas (Centroamérica), tiene flores pequeñas (en racimos de veinte o más flores) pero frecuentemente de más intenso y variado color que las unifoliadas, además de tener mejor textura. Dentro de este grupo se puede encontrar entre otros a *C. bicolor* y *C. skinneri*. Los híbridos entre estos dos grupos han producido flores donde se combinan las mejores características de ambas (Kuan y González, 1993).

2.3.2 Ecología y descripción

La mayoría de este grupo crecen como epífitas en el lindero de los bosques o en la copa de los árboles, donde reciben luz fuerte pero indirecta (Kuan y González, 1993). Son plantas perennes con rizoma corto cubierto por brácteas apérgaminadas y caducas. Las raíces son cilíndricas, verdes al inicio formando un velamen de varias capas, grisáceo o blanco verdoso en la madurez. Los pseudobulbos son redondeados, cilíndricos o fusiformes, cubiertos por brácteas papiráceas basales caducas, los

cuales constituyen una defensa contra la sequía periódica. Las hojas pueden ser lanceoladas o elípticas, obtusas, coriáceas o carnosas, lisas, sésiles y con venación conduplicada.(Rodríguez *et al*, 1986).

En el caso de cattleyas con inflorescencia, esta es terminal, racemosa, subtendida por una bráctea espatácea, generalmente con pocas flores, grandes y llamativas, resupinadas. Las flores poseen un ovario pedicelado y cilíndrico. Los sépalos son iguales, libres, patentes o ligeramente reflexos. Los pétalos son semejantes a los sépalos aunque generalmente más anchos. El labelo es sésil, simple o trilobulado, libre o ligeramente adnato a la base de la columna. Los lóbulos laterales envuelven la columna. En algunas especies los lóbulos laterales y el medio son totalmente diferentes, en otras son continuos. La columna es fuerte, cilíndrica o subclaviforme, ligeramente arqueada, terminada en tres dientes. La antera es terminal, incumbente, operculada de dos celdas, cada una de ellas divididas por un septo longitudinal. Los polinios son 4, céreos, elíptico-ovados, paralelos y ligeramente comprimidos, con caudículas prominentes. El estigma es entero (Rodríguez *et al*, 1986).

Para florecer bien, las cattleyas necesitan luz abundante pero no directa entre 2000 y 3000 pies bujía. La luz acelera el proceso de crecimiento de la planta para que esta luego florezca bien (Horich, 1980).

Las cattleyas toleran climas calientes si se les mantiene la adecuada ventilación y humedad. La temperatura perfecta es entre 65° F y 75° F (Horich, 1980) y la humedad relativa 50% y 80% es ideal (American Orchid Society, 1995).

2.3.3 *Cattleya skinneri*

Cattleya skinneri es una especie del grupo bifoliado, que se encuentra desde Guatemala a Costa Rica y florece principalmente en febrero, marzo y abril. Tiene el

labelo enrollado en forma de corneta, con el borde delantero de color lila muy intenso, seguido de una garganta blanca con un tinte amarillento y de una mancha morada en el fondo (Rodríguez, 1995).

Mediante el acuerdo ejecutivo #24 del 15 de junio de 1939, fue declarada la Guaria Morada (*C. skinneri*) como Flor Nacional de Costa Rica (González, 1995), corresponde a la forma normal y más abundante de la especie, con tallo con dos hojas y racimos de flores lila (“morada”) (Rodríguez, 1995).

La *C. skinneri* es una de la orquídea más cultivadas en Costa Rica. Habita en la zona Pacífica de este país, y en las zonas pre-montañas de 500 hasta 1000 metros. Existe gran variedad en la coloración de las flores, desde las moradas, hasta las albas, las albas oculatas (blancas con una mancha morada en la garganta del labio) y las rosadas. Cada escapo floral puede tener hasta 14 flores. Las plantas rápidamente forman macollas robustas. Híbridos hechos con la *C. skinneri* resultan bifoliadas y con muchas flores moradas en sus escapos (Tritch, 1995).

Durante el “verano”, la mayoría de los árboles de los hábitats de *C. skinneri* pierden el follaje, dando a la luz solar más acceso a las ramas. Y aquí, las “guarias” comienzan a florecer, comenzando primero aquellas de la zona más baja y cálida de su distribución natural. Aun así, se debería considerar *C. Skinneri* como una orquídea de la tierra templada más bien que tórrida, no le gustan las tierras bajas a nivel del mar (Mora y Warner, 1995).

El Jardín Botánico Lankester revisó cuáles de las especies de orquídeas presentes en Costa Rica ameritaban su inclusión en un proyecto de micropropagación, y una de ellas fue *C. skinneri*. En el apéndice II de CITES se menciona *C. skinneri* como especie en peligro de extinción (Mora y Warner, 1995).



Figura 2.1 Inflorescencia de *Cattleya skinneri*. © 1996 Greg Allikas

2.3.4 *Cattleya maxima*

Existen dos variedades de *C. maxima*, una es de Ecuador y la otra de Perú. Las plantas de Ecuador son mucho más robustas y producen muchas más flores que aquellas que se desarrollan en Perú. Aunque la forma peruana (que se extiende en Ecuador, Colombia y Venezuela) tiene menos flores, es superior en forma y color. Ambas formas poseen un atractivo labelo encrespado con una vena color rojo cereza, lo cual es distintivo de *C. maxima*. y adaptable en la mayoría de las condiciones de crecimiento siempre que posea un buen drenaje y no se salga del rango de temperatura de 50° F a 85° F. Necesita bastante luz en la época cercana a la floración (American Orchid Society, 1996).



Figura 2.2 Flor de *Cattleya maxima*. © 1996 Greg Allikas

2.3.5 *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima*

Esta planta es un híbrido entre *Cattleya skinneri* y *Cattleya maxima*, por lo tanto se define como un híbrido interespecífico (Warner, 2000). La planta de *C maxima* x *C. skinneri* es epífita, perenne, con un rizoma cubierto por brácteas. Los pseudobulbos alcanzan tamaños de hasta 30 cm de largo, los cuales están cubiertos por brácteas papiráceas basales. El híbrido es bifoliado y las hojas se sitúan en el ápice del pseudobulbo, son lanceoladas, coriáceas y sésiles (Warner, 2000)

La inflorescencia es terminal, racemosa, subtendida por una bráctea espatácea, generalmente con pocas flores, grandes, llamativas, de color rosa. Los sépalos son iguales entre sí, libres, con una longitud de 5 a 7 cm cada uno. Los pétalos son semejantes a los sépalos, pero más anchos. El labelo es libre y simple;

los lóbulos laterales envuelven la columna (ligeramente arqueada) y el borde del labelo presenta márgenes ondulados; el callo presenta remación amarilla. La antera es terminal, incumbente, operculada con dos celdas, cada una dividida por un septo. Los polinios son 4, céreos, elíptico-ovados, con caudículas.. El estigma es entero (Warner, 2000).

El hábito de crecimiento de *C. skinneri* y *C. maxima* es muy similar, sin embargo el híbrido alcanza un tamaño mayor que su pariente *C. skinneri*. El color y la forma de las flores de ambas especies es muy similar, pero el híbrido se distingue por la forma y color del labelo (Warner, 2000).



Figura 2.3 Planta de *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* mantenida en condiciones de invernadero en el Jardín Botánico Lankester



Figura 2.4 Inflorescencia del híbrido *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima*

2.4 Micropropagación

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

La micropropagación presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas se puede citar:

- a.** Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo
- b.** Reducción del tiempo de multiplicación
- c.** Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable.
- d.** Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga
- e.** Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras
- f.** Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos (Villalobos y Thorpe, 1991).

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

La obtención de una planta entera puede ocurrir a través de 3 vías diferentes:

- a.** a partir de brotes, primordio, meristemo y embriones pre-existentes en el “explante” utilizado
- b.** a partir de un brote o meristemo iniciado dentro de un callo o directamente sobre el explante inicial. En este caso los brotes o meristemas se forman *in vitro* (brotes adventicios o *de novo*)
- c.** a partir de un embrión somático formado a partir de tejido somático (embriogénesis somática) (Abdelnour y Vincent, 1994).

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

- Etapa I. Iniciación o establecimiento (se establece el cultivo inicial o primario)
- Etapa II. multiplicación de brotes o multiplicación de plantas.

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

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

Etapa IV: Transferencia final a la etapa de medio ambiente

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

Los factores que afectan la micropropagación son:

- a.** Planta donadora de explante: el estado fisiológico y la edad de la planta fuente de explantes influyen en la morfogénesis. Mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (los meristemos apicales y axilares han sido muy exitosos). La posición de la yemas es un factor importante.
- b.** El explante: si las plantas que se van a micropropagar tienen reproducción por semilla, las partes embrionales o de la plántula son las fuentes más comunes de explantes. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de explantes. Sólo en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemos (sin primordios foliares) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas.
- c.** Factores físicos: La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28° C. La luz es un factor fundamental en la morfogénesis, involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad.

d. Medio de cultivo: el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y forma física (Villalobos y Thorpe, 1991). Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo in vitro de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación; existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante (en caso de medios semisólidos), sustancias reguladoras del crecimiento, y otros compuestos (Mroginski y Roca, 1991).

2.4.1 Micropropagación de orquídeas

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

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

La micropropagación sexual consiste básicamente en la propagación por medio de semilla, con lo cual se asegura la variabilidad del material genético. Su aplicación se justifica cuando se producen híbridos de gran valor cuya semilla de otra

forma no germinaría, además de que en condiciones naturales la germinación de orquídeas es muy baja (alrededor del 5% del total producido en una cápsula). La germinación de semillas *in vitro* fortifica los esfuerzos de conservación de orquídeas al ofrecer una mayor cantidad de plantas a un menor precio, evitándose así el saqueo de individuos silvestres (Kuan y González, 1993)

Las semillas pueden extraerse de cápsulas verdes (antes de su apertura), las cuales deben tener un 60% de maduración. La cápsula debe esterilizarse y las semillas se inoculan en la cámara de flujo laminar. En caso de semillas expuestas (fuera de la cápsula), éstas deben ser removidas y ser tratadas con un desinfectante antes de inocularlas *in vitro* (Kuan y González, 1993).

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

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

2.4.2 Cultivo de ápices y meristemos en orquídeas

En los años 60, el desarrollo de procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos recibió un impulso dramático; ello se debió al

descubrimiento de la capacidad que tienen las puntas de los brotes y los meristemas de *Cymbidium* sp., cortados apropiadamente y sembrados en cultivo aséptico, para producir protuberancias que asemejan protocormos normales capaces de crecer y desarrollarse en plántulas (Krikorian, 1991b).

Desde entonces se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemas de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de una punta de brote cultivado o de un explante, en algunos casos, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Krikorian, 1991b).

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

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

Los protocormos que se desarrollan después de la germinación de una semilla de orquídea, tienen un estado morfológico entre un embrión indiferenciado y un vástago. La formación de cuerpos protocórmicos formados con el cultivo de meristemos, significa que el ápice del vástago de una planta adulta se rejuvenece. Debido a que los protocormos obtenidos por germinación de semillas tienen muchas semejanzas (formación de rizoides, formación espontánea o inducida de protocormos a partir de fragmentos de protocormo, polaridad débil) con los producidos a partir de ápices de vástagos, se introdujo el término *cuerpo protocórmico*, cuando se clonan orquídeas por cultivo de meristemos (Pierik, 1987)

La propagación de orquídeas por cultivo de meristemos se puede dividir en tres fases: a) transformación del meristemo en un cuerpo protocórmico o tipo protocormo, b) la propagación de los protocormos dividiéndolos en fragmentos y, c) la conversión de los protocormos en vástagos con raíces (Pierik, 1987).

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

2.4.3 Micropropagación de Cattleya por cultivo de ápices y meristemos

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

Kuan y González (1993) mencionan una desinfección cuádruple de brotes de *Cattleya* en hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial: una inicial con una solución al 10% (v/v) por 15-10 minutos, luego se eliminó 2 o 3 hojas del brote y se sumergió en NaOCl al 5% (v/v) por 8-10 minutos; posteriormente, y luego de eliminar los primordios de hoja, se colocó en una solución al 3% (v/v) por 3-5 minutos; seguidamente se eliminaron los primordios de hoja y se sumergió un cubo apical de 2 mm² en NaOCl al 1% (v/v) colocándolo finalmente en un medio Murashige y Skoog (1962).

Gutiérrez y Chen- Han (1994) utilizaron tres tipos de híbridos de *Cattleya*: Lc. Dismore Perfection, Lc. Puppy love y Lc. Shellie Compton. Los brotes (de 5-8 cm) fueron sometidos a una desinfección doble con NaOCl. Antes de la primera desinfección se eliminaron de 1-2 hojas del brote dejando expuestas las yemas laterales. La desinfección superficial se realizó con NaOCl al 1% más tres gotas de Tween 20 por 5 minutos en un lavador ultrasónico y 10 minutos fuera de éste. Después de realizar tres lavados en la cámara de flujo laminar y de extraer 2-3 hojas más del brote se introdujo en NaOCl al 0,5% más tres gotas de Tween 20 durante 15 minutos. Finalmente se efectuaron tres lavados con agua y un lavado en Ácido Cítrico (100 mg/l) antes de extraer las yemas laterales y el meristemo e introducirlos en medio de iniciación líquido (120 rpm), que consistió en un MS (1962) con 1/3 de la concentración de sales, 10 mg/l de Adenina, 1,75 mg/l de Bencil Adenina (BA), 1,75 mg/l de Ácido Naftalenacético (ANA), 2 mg/l de Glicina, 15% (v/v) de Agua de coco y 20 g/l de sacarosa; en este medio los explantes estuvieron por 16 semanas. Para la fase de multiplicación cada protocormo se dividió en 3-4 segmentos y se inocularon en dos tipos de medio de cultivo: uno idéntico al primero pero en estado semisólido y otros que sustituye las sales MS (1962) por Hyponex #1 (7-6-19) también en estado semisólido. La etapa final de enraizamiento se realizó en un medio semisólido con 2,5 g/l de Hyponex #1 (7-6-19), Vitaminas B5, 1cc de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 50g/l de banano, 30 g/l de sacarosa y 1,2 g/l de

Carbón Activado. El ciclo de propagación clonal *in vitro* fue calculado en 12 meses (para estos híbridos).

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

Reinert y Mohr (1967) cultivaron yemas laterales de brotes de *Cattleya* sp en un medio Reinert & Mohr (1967) enriquecido con 1,75 mg/l de ANA y 1,75 de Ácido Indolbutírico (AIB); luego de tres semanas de introducidas las yemas se utilizó un medio igual al primero pero con adición de 1 mg/l de Cinetina (KIN) y semisólido para obtener los cuerpos protocórmicos. Un medio igual a este último pero en estado líquido se utilizó para mantener en crecimiento los cuerpos protocórmicos y el callo producido (ocasional); así como la regeneración a plántulas (Arditti y Ernst, 1993).

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

Lindemann *et al.*(1970) utilizó brotes axilares los cuales fueron desinfectados superficialmente con alcohol etílico de 95°, y luego se sumergieron en Hipoclorito de Calcio (Ca(OCl)₂) al 0,4%-0,5% por 20-30 minutos; después de cada desinfección se realizó un lavado con agua estéril. Los explantes se cultivaron en un medio de

iniciación Lindemann *et al.* (1970) líquido enriquecido con 0,1 mg/l de ANA, 0,2 de KIN y 15% de Agua de coco. Luego de 2 meses, se formaron los cuerpos protocórmicos, los cuales fueron multiplicados en un medio líquido Lindemann *et al.* (1970) conteniendo 0,2 mg/l de ANA, 0,22 mg/l de KIN, 0,35 mg/l de Ácido Giberélico (GA₃), 15% de Agua de coco y 100 mg/l de Caseína Hidrolizada. Las subdivisiones de los cuerpos protocórmicos se realizaron en intervalos de un mes. El enraizamiento se realizó en un medio Knudson C (1946) donde las plantas tardaron 10 días en emitir raíces.

Morel (1970) utilizó tejido meristemático de yemas situadas en la base de brotes jóvenes. Como medio de iniciación se sugieren varios medios de cultivo, todos ellos líquidos:

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

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

Ápices de brotes de 2-5 cm de longitud sin las hojas desplegadas fueron utilizados por Huang (1984). Después de remover las hojas superficiales, los brotes fueron lavados y sumergidos en una solución antioxidante de 100 mg/l de Ácido Ascórbico y 150 mg/l de Ácido Cítrico; posteriormente se introdujeron en una dilución 1:10 de Purex (NaOCl al 5% -5,25%) por 20 minutos al vacío. Luego se realizó un lavado con agua estéril y los brotes se introdujeron nuevamente en Purex pero en una dilución 1:10 por 1 minuto para finalmente hacer un baño con una dilución 1:1000. Los explantes fueron noculados en un medio líquido de iniciación MS (1962) modificado conteniendo 0,1 mg/l de ANA, 1 mg/l de Bencil Adenina (BA), 10 mg/l de Sulfato de Adenina y 15% de Agua de coco. Para la multiplicación de los cuerpos protocórmicos se utilizó un medio semisólido MS (1962) modificado con 0,1 mg/l de ANA, 1 mg/l de BA, 10 mg/l de Sulfato de Adenina y 15% de Agua de coco. Finalmente, el enraizamiento se llevó a cabo en un medio semisólido MS (1962) modificado con 0,3 mg/l de ANA y 30 mg/l de Sulfato de Adenina.

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

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

El aislamiento de meristemos generalmente tiene lugar en medios sólidos con la excepción de *Cattleya*; la propagación de cuerpos protocórmicos generalmente tiene

lugar en medios líquidos, y el crecimiento de estas estructuras hasta plántulas, nuevamente en medio sólido (Leffring, 1968).

La propagación y el crecimiento son, en general, mejores en un medio en movimiento que en un medio sólido. En los medios líquidos existe un mejor suministro de oxígeno y el transporte de nutrientes es más eficaz (Pierik, 1987).

2.5 Jardín Botánico Lankester

El Jardín Botánico Lankester se localiza cerca de la ciudad de Paraíso en Cartago a 9° 50' 37" latitud norte y 83° 37' 43" longitud este, a una altitud de 1400 m.s.n.m. Fue fundado en la década de los 50 por el naturalista inglés Carlos H. Lankester. En 1973 fue adquirido por la Sociedad Norteamericana de Orquideología y la fundación Stanley Smith de Inglaterra para donarlo a la Universidad de Costa Rica (Quesada, 1997).

La precipitación pluvial en este lugar es de 1000-13000 mm por año y la temperatura promedio es de 18-24 °C durante el día y 15-18 °C durante la noche. Según la clasificación de zonas de vida Holdridge (1978), el área pertenece a la formación de bosque húmedo tropical transición a premontano (bh-p). Esta es la zona de vida más alterada en Costa Rica, pues aquí ya no quedan áreas representativas con bosque primario. Esta zona se considera un bosque semidecidual estacional de altura media y de dos estratos (Quesada, 1997)

El Jardín Botánico Lankester es internacionalmente conocido por su colección de epífitas, entre las que sobresalen las orquídeas. En sus 10,5 hectáreas de extensión crecen plantas de otras familias como bromelias, aráceas, heliconias, zingiberáceas, musáceas, cactus, helechos y numerosas especies arborescentes, todas creciendo en armonía con aves (más de 100 especies), insectos y otros animales (Quesada, 1997). Su misión es promover la conservación de la flora epífita de Costa Rica, en

particular orquídeas, mediante tres áreas específicas: horticultura, investigación y educación ambiental (Warner, 2000)

3. OBJETIVOS

- a.** Desarrollar un protocolo de micropropagación en *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por medio del cultivo de ápices de brotes
- b.** Determinar un protocolo de desinfección efectivo para explantes de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* utilizando compuestos químicos fácilmente disponibles y económicamente accesibles.
- c.** Desarrollar las etapas de introducción, multiplicación y enraizamiento utilizando como variables el estado físico del medio de cultivo (medio líquido y medio semisólido) y dos clases de medio de cultivo (Murashige & Skoog (1962) modificado y Knudson C (1946) modificado).
- d.** Determinar la capacidad de formación de cuerpos protocórmicos de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* en medio de cultivo de introducción
- e.** Obtener el índice de brotación de cuerpos protocórmicos *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* en medio de cultivo de multiplicación.
- f.** Determinar el promedio de formación de raíces de vitroplantas de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* en medio de enraizamiento.

4. METODOLOGÍA

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Jardín Botánico Lankester, ubicado en la provincia de Cartago.

4.1 Selección de explantes y desinfección

Se utilizaron plantas de la especie *Cattleya skinneri* y del híbrido *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* (producido por polinización controlada en el Jardín Botánico Lankester) mantenidas en condiciones de invernadero (con acceso libre al público).



Figura 4.1 Invernadero del Jardín Botánico Lankester de donde se extrajeron las plantas de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* donadoras de explantes.

Los explantes que se utilizaron para ambos tipos de orquídea fueron ápices de brotes laterales de 4-7 cm de longitud. Los brotes de estas plantas se cortaron desde su base con un bisturí previamente desinfectado con alcohol (etanol) de 95°. Las plantas seleccionadas para la investigación debían poseer dos puntos de

crecimiento, de los cuales se extrajo el brote de uno de ellos. Los individuos utilizados no recibieron ningún tratamiento especial antes de extraer los brotes.



Figura 4.2 Brote lateral de *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* utilizado como explante inicial para el cultivo *in vitro* de ápices

Se probaron 4 tratamientos de desinfección tanto para *C. skinneri* como para *C. skinneri* x *C. maxima* (Cuadro 1 y 2). De estos, los tratamientos I, III y IV fueron idénticos para ambos tipos de orquídea. El tratamiento II difirió en el tiempo de exposición de los brotes en alcohol de 95^o, que para *C. skinneri* fue de 5 minutos y para *C. skinneri* x *C. maxima* fue de 30 segundos.

Una vez cortados los brotes, estos se llevaron al laboratorio, y en todos los casos fueron sumergidos en agua con detergente en polvo (1,5-2 g de detergente por cada

100 ml de agua) más 3 gotas detergente líquido, durante 10 minutos, en constante agitación.

Los 4 tratamientos de desinfección que se probaron en ambas orquídeas consistieron en una inmersión de alcohol de 95° y una doble desinfección con NaOCl; las variables fueron las concentraciones de NaOCl utilizadas y la duración de las inmersiones en los diferentes compuestos químicos. En todos los casos, las soluciones de NaOCl se utilizaron con 0,5% de Physan 20® (desinfectante, bactericida y fungicida) y 3 gotas de detergente líquido. Luego de la primera desinfección con NaOCl y de los lavados posteriores a ésta, los brotes fueron sometidos a una disección donde se eliminaron las hojas superficiales (4-5 hojas).

Tabla 4.1 Tratamientos de desinfección realizados en brotes laterales de *C. skinneri*

| Etapas de la desinfección | Tratamiento de desinfección | | | |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | I | II | III | IV |
| Alcohol de 95° (fuera de cámara) | 30 seg | 5 min | 30 seg | 5 min |
| NaOCl (fuera de cámara) | 1% por 10 min | 1% por 10 min | 3% por 10 min | 3% por 10 min* |
| Lavados con agua destilada estéril (en cámara) | 3 lavados de 2 min cada uno | 3 lavados de 2 min cada uno | 3 lavados de 2 min cada uno | 2 lavados de 2 min cada uno |
| NaOCl (en cámara) | 0,5% por 15 min | 0,5% por 20 min | 1% por 20 min | 1% por 20 min |
| Lavados con agua destilada estéril (en cámara) | 3 lavados de 2 min cada uno | 3 lavados de 2 min cada uno | 3 lavados de 2 min cada uno | 2 lavados de 2 min cada uno |

* Se realizó dentro de la cámara de flujo laminar

Tabla 4.2 Tratamientos de desinfección realizados en brotes laterales de *C. skinneri* x *C. maxima*

| Etapas de la desinfección | Tratamiento de desinfección | | | |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | I | II | III | IV |
| Alcohol de 95° (fuera de cámara) | 30 seg | 30 seg | 30 seg | 5 min |
| NaOCl (fuera de cámara) | 1% por 10 min | 1% por 10 min | 3% por 10 min | 3% por 10 min* |
| Lavados con agua destilada estéril (en cámara) | 3 lavados de 2 min cada uno | 3 lavados de 2 min cada uno | 3 lavados de 2 min cada uno | 2 lavados de 2 min cada uno |
| NaOCl (en cámara) | 0,5% por 15 min | 0,5% por 20 min | 1% por 20 min | 1% por 20 min |
| Lavados con agua destilada estéril (en cámara) | 3 lavados de 2 min cada uno | 3 lavados de 2 min cada uno | 3 lavados de 2 min cada uno | 2 lavados de 2 min cada uno |

* Se realizó dentro de la cámara de flujo laminar

Después del último lavado con agua destilada estéril, los brotes (en todas las desinfecciones) fueron disectados hasta obtener el ápice con 3-4 primordios foliares. Antes de introducir los explantes en medio de cultivo, los ápices se sumergieron en una solución de Ácido Cítrico (100 mg/l) durante 1 minuto, excepto en la desinfección IV (tanto de *C. skinneri* como de *C. skinneri* x *C. maxima*) en que esta inmersión tuvo una duración de dos minutos.

En el caso de *C. skinneri* se utilizaron 30 explantes. Para el híbrido *C. skinneri* x *C. maxima* se utilizó total de 28 explantes.

4.2 Etapa de introducción

Una vez desinfectados, los explantes fueron introducidos en medio de cultivo de iniciación (inductor de formación de cuerpos protocórmicos). Se utilizaron dos tipos de medio de cultivo:

- a. Medio con sales de Murashige & Skoog (1962) (Anexo 1) complementado con 0,031 mg/l de Cloruro de Níquel ($\text{NiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 2 mg/l de Glicina, 0,5 mg/l de Piridoxina, 0,1 mg/l de Tiamina, 0,1 mg/l de ANA, 0,2 mg/l de Kin, 15% de Agua

de Coco y 15 g/l de sacarosa. Este medio se utilizó en forma semisólida (2 g/l de Phyta-Gel®) y líquida.

b. Medio con sales Knudson C (1946) modificado (Anexo 2) complementado con 0,031 mg/l de NiCl • 6H₂O, 0,1 mg/l de ANA, 0,2 mg/l de Kin, 15% de Agua de Coco y 15 g/l de sacarosa. El medio de cultivo fue utilizado en forma semisólida (2 g/l de Phyta-Gel®) y líquida.

El agua de coco utilizada no recibió ningún tipo de tratamiento de filtración, ni se pudo obtener datos del estado de maduración ni la zona de procedencia.

Tabla 4.3 Número de explantes de *C. skinneri* colocados en medio de introducción según el tipo de medio de cultivo y el tratamiento de desinfección

| Tratamiento de Desinfección | Estado del medio de cultivo | Medio de cultivo | |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | | MS (1962) modificado | Knudson C (1946) modificado |
| I | Semisólido | 2 | 2 |
| | Líquido | 0 | 1 |
| II | Semisólido | 3 | 1 |
| | Líquido | 1 | 0 |
| III | Semisólido | 1 | 2 |
| | Líquido | 2 | 2 |
| IV | Semisólido | 3 | 3 |
| | Líquido | 3 | 3 |

Tabla 4.4 Número de explantes de *C. skinneri* x *C. maxima* colocados en medio de introducción según el tipo de medio de cultivo y el tratamiento de desinfección

| Tratamiento de Desinfección | Estado del medio de cultivo | Medio de cultivo | |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | | MS (1962) modificado | Knudson C (1946) modificado |
| I | Semisólido | 1 | 4 |
| | Líquido | 1 | 0 |
| II | Semisólido | 1 | 3 |
| | Líquido | 1 | 0 |
| III | Semisólido | 2 | 2 |
| | Líquido | 0 | 1 |
| IV | Semisólido | 2 | 3 |
| | Líquido | 3 | 4 |

Todos los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5,5, y se colocaron en el cuarto de crecimiento en condiciones de luz directa (1500-3000 lux) utilizando dos tipos de fluorescentes (Growth Lux y Day Light). La temperatura se mantuvo en (22 ± 2) °C, y el fotoperíodo en 12 horas luz. Los medios de cultivo líquidos, con un volumen de 50 ml y contenidos en erlenmeyers de 250 ml, se colocaron en agitación constante a 95-100 rpm.

Durante la primera semana de cultivo se determinaron los porcentajes de contaminación y oxidación de los explantes.

Los explantes desinfectados y que no murieron por oxidación, fueron subcultivados con una frecuencia de tres semanas, eliminando las partes necróticas y oxidadas en aquellos explantes que lo presentaron. Una vez que se formaron los cuerpos protocórmicos, se realizó la transferencia a medio de multiplicación.

4.3 Etapa de multiplicación

Solamente los ápices con formación de cuerpos protocórmicos se cultivaron en medio de multiplicación. Todos los explantes que llegaron a esta etapa provenían de medio de cultivo líquido. Al igual que en la etapa de iniciación se utilizaron dos tipos de medio:

- a.** Medio con sales MS (1962) (Anexo 1) complementado con 0,031 mg/l de NiCl • 6H₂O, 2 mg/l de Glicina, 0,5 mg/l de Piridoxina, 0,1 mg/l de Tiamina, 0,18 mg/l de ANA, 0,22 mg/l de Kin, 0,35 mg/l de AG₃, 15% de Agua de Coco y 20 g/l de sacarosa.

- b.** Medio con sales Knudson C (1946) modificado (Anexo 2) complementado con 0,031 mg/l de NiCl • 6H₂O, 0,18 mg/l de ANA, 0,22 mg/l de Kin, 0,35 mg/l de AG₃, 15% de Agua de Coco y 20 g/l de sacarosa.

Las condiciones físicas, la velocidad de agitación (95-100 rpm) y el pH del medio de cultivo se mantuvieron iguales que en la etapa de introducción. Después del segundo subcultivo se redujo el volumen de 50 ml a 20 ml. La frecuencia de transferencia continuó siendo de tres semanas.

El agua de coco utilizada no recibió ningún tipo de tratamiento de filtración, ni tampoco se tuvo datos de su procedencia y estado de maduración.

En la transferencia a medio de multiplicación, dos de los seis ápices de *C. skinneri* y uno de los cinco de *C. skinneri* x *C. maxima* que formaron estas estructuras (en etapa inicial, sin desarrollo de brote) fueron seccionados con bisturí en dos partes y cultivados en el medio de cultivo correspondiente según la etapa de introducción. El resto de los explantes con formación de cuerpos protocórmicos, simplemente se transfirieron a medio de multiplicación y se dejaron intactos hasta el desarrollo de brotes. Se realizaron subcultivos en intervalos de tres semanas aproximadamente en los explantes sobrevivientes. La multiplicación de los cuerpos protocórmicos con desarrollo de brotes se hizo por separación de los mismos con pinzas, y no por seccionamiento con bisturí. Dicha separación se hizo inicialmente cuando los brotes tenían tamaños de 0,5 cm o menos, pero por presentarse mortalidad en los mismos, la práctica se realizó cuando los brotes poseían 1,5 cm o más de longitud.

El índice de brotación de los explantes se obtuvo como un promedio del número de brotes nuevos por semana, en un período de 6 semanas, para cada tipo de orquídea y cada tipo de medio de cultivo.

Las explantes (con desarrollo de brote) se dejaron en medio de multiplicación hasta evidenciar la presencia de raíces. Inmediatamente después de ocurrir este hecho, las plantas se transfirieron a medio de enraizamiento.

4.4 Etapa de enraizamiento

Esta etapa sólo contó con material procedente de un mismo meristemo de *C. skinneri* cultivado en medio de cultivo Knudson C (1946) modificado. Se realizaron pruebas con vitroplantas en medio de cultivo líquido y otras en medio semisólido con las sales de Knudson C (1946) (Anexo 2) al 50% y 30 g/l de sacarosa. Se eliminó el uso de reguladores del crecimiento y el agua de coco; el medio semisólido se utilizó con 2 g/l de Phyta-Gel® y 2 g/l de Carbón Activado.

Las condiciones físicas en el cuarto de crecimiento, el pH del medio de cultivo y la agitación (en el caso del medio líquido) se mantuvieron iguales que en las etapas anteriores. El volumen del medio líquido se mantuvo en 20 ml, y los subcultivos en éste se realizaron cada semana. Los subcultivos en medio semisólido se realizaron cada 3 semanas. Tanto en medio semisólido como en medio líquido de enraizamiento se siguió realizando multiplicación de brotes por separación.

5. RESULTADOS

5.1 Selección de explantes y desinfección

La sobrevivencia de los explantes de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* dependió de la contaminación en la etapa de introducción en cultivo aséptico y de la oxidación presentada en la misma. La contaminación fue causada tanto por bacterias como por hongos. En el caso de la contaminación bacteriana presentada en ambos tipos de orquídea, ésta se evidenció en medio semisólido como colonias color blanco, y en medio líquido por el aspecto lechoso de éste. La contaminación por hongo fue más diversa, evidenciándose por la visualización del micelio.

La oxidación se determinó como una coloración marrón tanto en el explante como en el medio de cultivo. Los explantes colocados en medio semisólido presentaron oxidación momentos después de finalizar los lavados con el Ácido Cítrico (etapa anterior a la introducción *in vitro*). La producción de compuestos producto de oxidación aumentó con el tiempo hasta que los explantes se tornaron totalmente oscuros; fue muy evidente también en el medio de cultivo semisólido la coloración café cerca de la base del explante. Los explantes colocados en medio líquido que se descartaron por oxidación tardaron más en presentar esta característica, muchos de ellos la presentaron recién realizada la desinfección, pero una vez colocados en el medio de cultivo líquido esta disminuyó o desapareció.

Los porcentajes de contaminación en *C. skinneri* disminuyeron conforme avanzaron los diferentes tratamientos de desinfección (Tabla 5.1); esto mismo ocurrió con los porcentajes de oxidación, los cuales superaron siempre los porcentajes de contaminación en el respectivo tratamiento de desinfección (Tabla 5.2).

C. skinneri x *C. maxima* también presentó una disminución en los porcentajes de contaminación conforme se realizaron los tratamientos de desinfección (Tabla 5.1).

Los porcentajes de oxidación fueron variables, pero siempre iguales o mayores al 50% (Tabla 5.2).

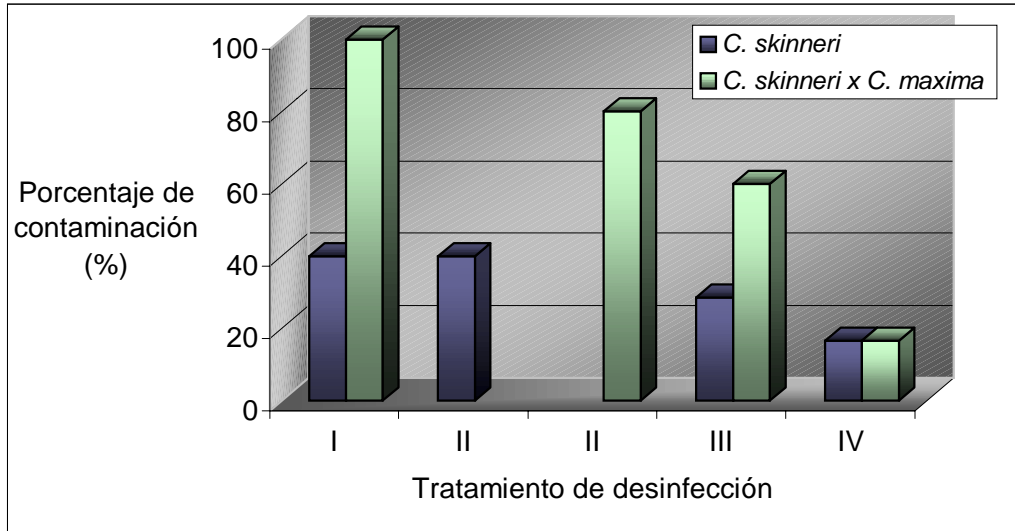
Tabla 5.1 Porcentaje de contaminación de explantes de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* introducidos en cultivo aséptico

| Tratamiento de desinfección | Porcentaje de contaminación | |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| | <i>C. skinneri</i> | <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> |
| I | 40 | 100 |
| II | 40 | 80 |
| III | 28,57 | 60 |
| IV | 16,66 | 16,66 |

Tabla 5.2 Porcentaje de oxidación de explantes de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* luego de ser introducidos en cultivo aséptico

| Tratamiento de desinfección | Porcentaje de sobrevivencia | |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| | <i>C. skinneri</i> | <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> |
| I | 80 | 50 |
| II | 60 | 60 |
| III | 42,86 | 80 |
| IV | 41,66 | 50 |

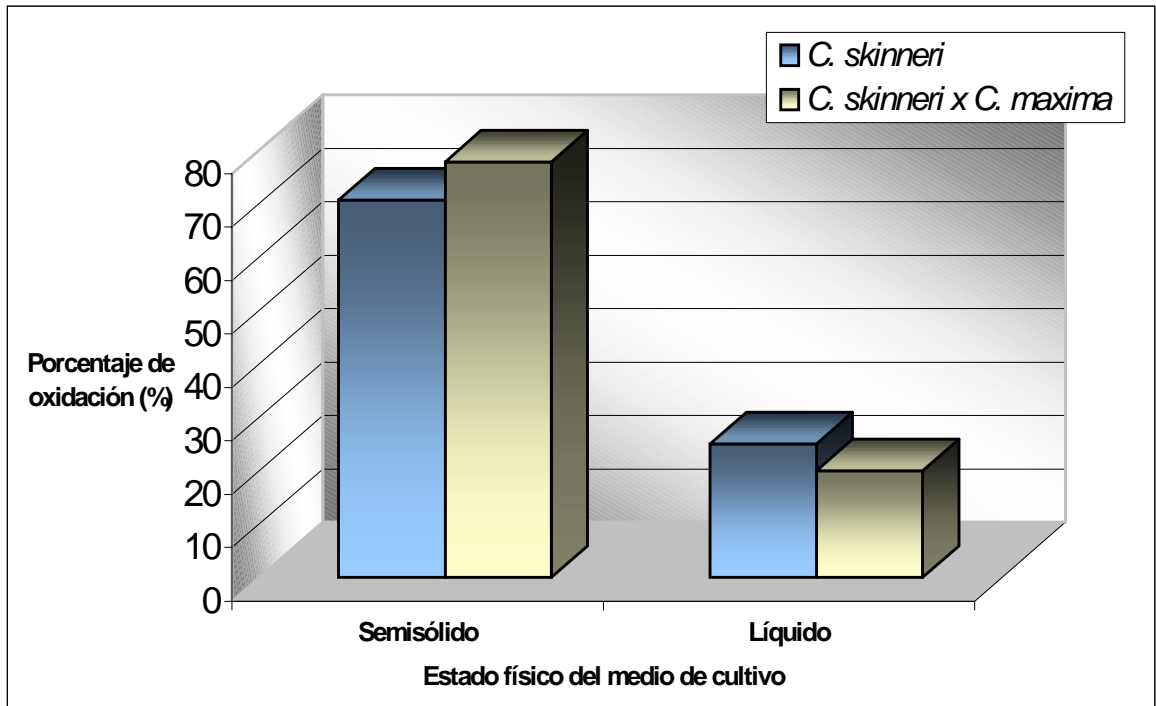
Los porcentajes de contaminación presentados en *C. skinneri* x *C. maxima* resultaron ser mayores que los reportados en *C. skinneri*, con excepción del tratamiento IV, en el cual el comportamiento fue exactamente el mismo. Aunque el tratamiento de desinfección II no es comparable por ser distinto en ambas clases de orquídea, el porcentaje de contaminación fue mayor en *C. skinneri* x *C. maxima* (Figura 5.1)



MICROSOFT EXCEL 97

Figura 5.1 Porcentaje de contaminación de ápices de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* sometidos a diferentes tratamientos de desinfección

Los porcentajes de oxidación de los explantes presentaron grandes variaciones de acuerdo con el estado físico del medio de cultivo en que se colocaron. Los meristemas en medio semisólido fueron los que presentaron mayores problemas de oxidación respecto de aquellos cultivados en medio líquido. Las variaciones, aunque mínimas, también se dieron según el tipo de orquídea: en medio semisólido *C. skinneri* x *C. maxima* fue la que presentó mayor porcentaje de oxidación, de forma contraria ocurrió en medio de cultivo líquido (Figura 5.2)



MICROSOFT EXCEL 97

Figura 5.2 Porcentaje de oxidación presentado en ápices de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*, de acuerdo con el estado físico del medio de cultivo.

La contaminación y oxidación presentadas luego de que los explantes de ambas orquídeas fueron inoculados en condiciones *in vitro*, dieron como resultado bajos porcentajes de sobrevivencia, lo cual se traduce en una limitada cantidad de explantes (Tabla 5.3)

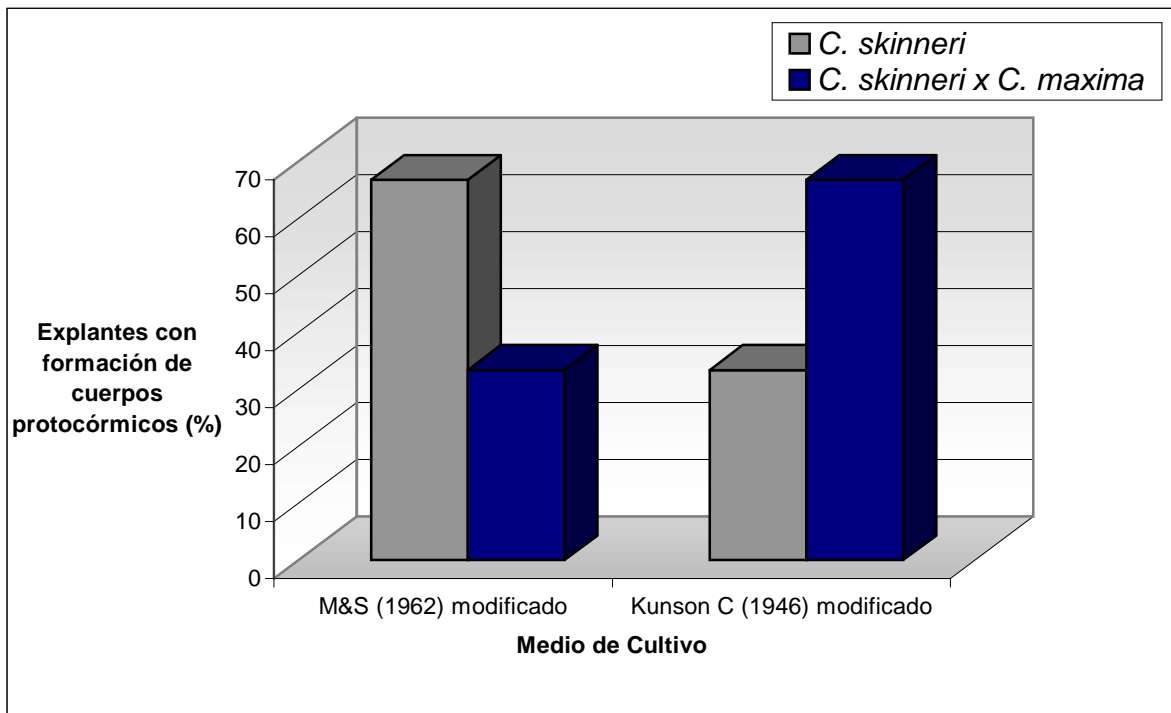
Tabla 5.3 Porcentaje de sobrevivencia de explantes de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* luego de ser sometidos a los diferentes tratamientos de desinfección

| Tratamiento de desinfección | Porcentaje de sobrevivencia | |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| | <i>C. skinneri</i> | <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> |
| I | 20 | 0 |
| II | 20 | 20 |
| III | 42,86 | 20 |
| IV | 41,66 | 33,33 |

5.2 Etapa de introducción

De los explantes sobrevivientes al proceso de desinfección y a los efectos de la oxidación, 60% formó cuerpos protocórmicos en *C. skinneri* y 50% en *C. skinneri* x *C. maxima*. Los explantes que no formaron estas estructuras presentaron al final de este proceso secciones de tejido dañado y otras partes con coloración verdosa.

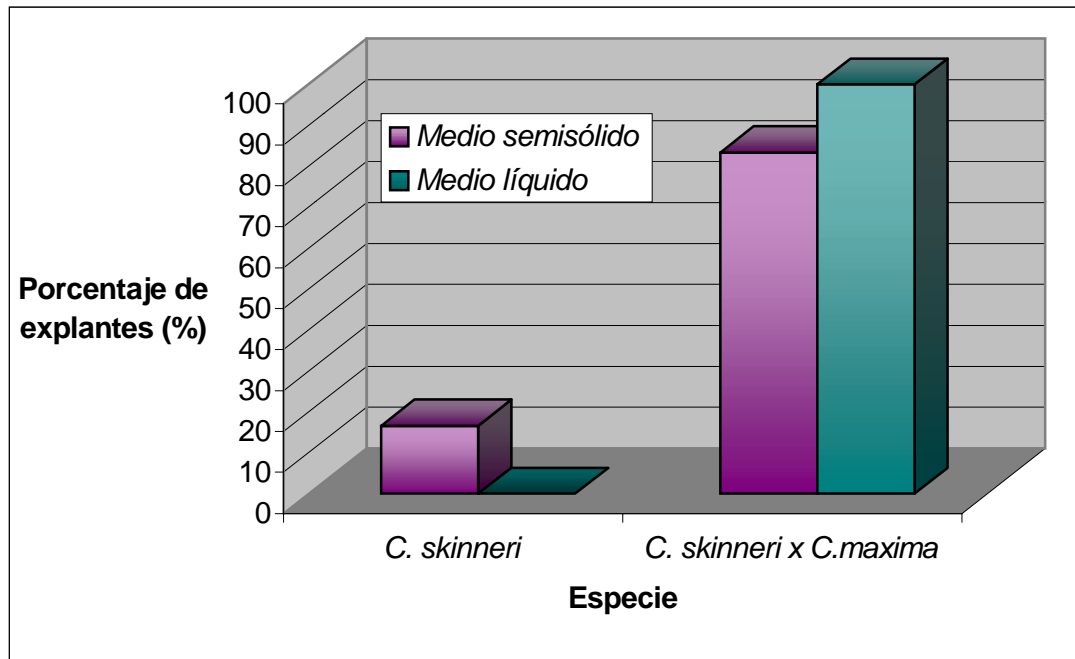
De los explantes que formaron cuerpos protocórmicos en *C. skinneri*, el 66,67% fue inoculado en medio MS (1962) modificado y el 33,33% en el medio Knudson C (1946) modificado. Un comportamiento opuesto ocurrió en el cultivo *in vitro* del híbrido, pues el 66,67% se dio en medio MS (1962) modificado y el 33,33% en medio de cultivo Knudson C (1946) modificado, tal y como se muestra en la siguiente figura.



MICROSOFT EXCEL 97

Figura 5.3 Porcentaje de explantes de *C. skinneri* y *C. skinneri* . *maxima* con formación de cuerpos protocórmicos de acuerdo con el tipo de medio de cultivo

Respecto a la formación de cuerpos protocórmicos de acuerdo al estado físico del medio de cultivo, un 83,33% formaron cuerpos protocórmicos en medio líquido en comparación con 33,33% en *C. skinneri*. En el caso de *C. skinneri* x *C. maxima*, la formación de estas estructuras solamente se dio en medio de cultivo líquido (100%) (Figura 5.4).



MICROSOFT EXCEL 97

Figura 5.4 Porcentaje de explantes de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* con formación de cuerpos protocórmicos de acuerdo con el estado físico del medio de cultivo

El inicio de la formación de cuerpos protocórmicos se evidenció cuando el explante se tornó totalmente verde, y las zonas donde se realizaron cortes en el momento de la inoculación experimentaron una especie de cicatrización. El tiempo transcurrido desde la inoculación hasta esta etapa (formación inicial de cuerpos protocórmicos) varió de acuerdo con el tipo de medio de cultivo, así, en *C. skinneri* esta etapa inició más rápidamente en medio MS (1962) líquido que en medio Knuson C (1946) líquido; sin embargo, el único explante de esta especie que formó cuerpos

protocormicos en medio semisólido MS (1962), fue el que más tardó en hacerlo (6 semanas después de la introducción) (Tabla 5.4).

En el caso de *C. skinneri* x *C. maxima* el momento de inicio de formación cuerpos protocórmicos en medio líquido MS (1962) y medio Knudson C (1946) fue muy parecido (Tabla 5.4)

Tabla 5.4 Tiempo promedio de formación de cuerpos protocórmicos en ápices de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*

| Tipo de medio de cultivo | Estado físico del medio de cultivo | Período de inicio de formación de cuerpos protocórmicos (semanas) | |
|-----------------------------|------------------------------------|--|---------------------------------------|
| | | <i>C. skinneri</i> | <i>C. skinneri</i> x <i>C. maxima</i> |
| MS (1962) modificado | Semisólido | 6 | - |
| | Líquido | 3,5 | 4,67 |
| Knudson C (1946) modificado | Semisólido | - | - |
| | Líquido | 5 | 4,5 |

Desde el momento de inicio de la formación de cuerpos protocórmicos en ambos tipos de orquídea, el desarrollo de estos continuó hasta la visualización de protuberancias de color verde, muy bien definidas, unidas en una sola estructura.



Figura 5.5 Ápice de *C. skinneri* con formación de cuerpos protocórmicos

El único explante que formó cuerpos protocórmicos (un total de 2) en medio semisólido (perteneciente a la especie *C. skinneri*) se dañó completamente en uno de los subcultivos de esta etapa de introducción, sin embargo, su estado de desarrollo era avanzado (aunque no había producido brotes).

5.3 Etapa de multiplicación

Los explantes con estructuras protocórmicas que fueron seccionados en dos partes con bisturí murieron en el lapso de una semana, pues el tejido verde del protocormo se tornó en ese período en un tejido café oscuro. El medio de cultivo en el que fueron inoculados (líquido en todos los casos) no presentó variaciones de color en ese período.

El resto de los explantes con formación de cuerpos protocórmicos, que no fueron seccionados, desarrollaron brotes múltiples (Figura 5.6), los cuales (tanto en *C. skinneri* como en el híbrido) iniciaron su formación en el punto donde se ubicaba el meristemo apical en la estructura inicial. De cada cuerpo protocórmico se desarrollaron varios brotes, no necesariamente un cuerpo protocórmico significó un brote.



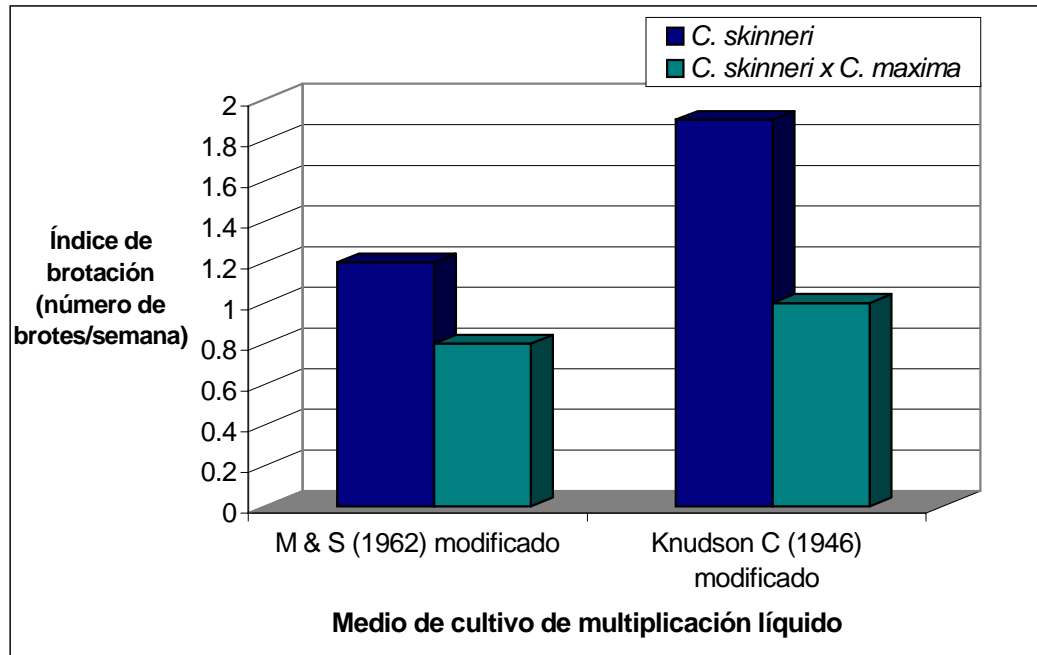
Figura 5.6 Brotes adventicios desarrollados a partir de cuerpos protocórmicos de *C. skinneri* x *C. maxima* cultivados *in vitro*

Se notó que cuando la división de los brotes se hacía en una etapa temprana de crecimiento (menos de 0,5 cm), el 100% de los brotes separados moría en un lapso de 4 a 5 días, pues se tornaban de un color café oscuro, semejante al visualizado en los cuerpos protocórmicos divididos por seccionamiento. Por el contrario los brotes con una longitud de 1,5 cm o más (Figura 5.7) sobrevivía perfectamente e incluso generaba más brotes en su base.



Figura 5.7 Brotes adventicios de *C. skinneri* con desarrollo foliar en etapa de multiplicación

El índice de brotación para *C. skinneri* en medio de multiplicación Knudson C (1946) modificado fue mayor que el presentado en medio de multiplicación MS (1962) modificado. Un comportamiento similar ocurrió con el híbrido *C. skinneri* x *C. maxima*. Si se compara entre los dos tipos de orquídea, existen índices de brotación menores en el híbrido (Figura 5.8).



MICROSOFT EXCEL 97

Figura 5.8 Índice de brotación de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*, en dos diferentes medios de cultivo líquidos de multiplicación

5.4 Etapa de enraizamiento

Al finalizar el período de la investigación, sólo plantas de un mismo ápice de *C. skinneri*, cultivadas en medio líquido Knudson C (1946) modificado, lograron desarrollar raíces (Figura 5.9).



Figura 5.9 Vitroplantas de *C. skinneri* en fase de enraizamiento cultivadas en medio líquido

Las vitroplantas colocadas en medio líquido Knudson C (1946) modificado desarrollaron en promedio 2,4 raíces, mientras que las plantas cultivadas en medio semisólido presentaron 3 raíces en promedio. Se observó daño (tejido color café) en el tallo y las hojas de las vitroplantas mantenidas en medio líquido, incluso se dio el desprendimiento de raíces en algunas de ellas. La estructura de las vitroplantas en medio semisólido fue muy diferente: tallos y hojas verdes e intactas, raíces más gruesas y con presencia de vellosidades.

El medio de cultivo líquido en esta etapa de enraizamiento presentó una coloración café claro translúcida después de una semana de introducir las vitroplantas en cada subcultivo.

Aunque la etapa final es de enraizamiento, las vitroplantas, tanto en medio semisólido como líquido, siguieron desarrollando brotes laterales, que fueron separados de forma semejante a la etapa de multiplicación y subcultivados en el mismo medio de enraizamiento.

6. DISCUSIÓN

6.1 Selección de explantes y desinfección

En la selección de los brotes laterales tanto de *C. skinneri* como de *C. skinneri* x *C. maxima*, se procuró la escogencia de brotes sin apertura foliar para reducir la posibilidad de entrada de agentes contaminantes al interior de la estructura, que dificultaran aún más el proceso de desinfección; además, las plantas escogidas debían poseer dos o más puntos de crecimiento para que al eliminar uno de los brotes, la planta no frenara su crecimiento. Estos requerimientos dieron como resultado una limitante en el número de explantes, tomando también en cuenta que por brote sólo se obtuvo un ápice (con 3 a 4 primordios foliares). De un brote lateral como el utilizado en la investigación también se pueden extraer yemas laterales que poseen tejido meristemático, sin embargo, para ello se utilizan otros medios de cultivo y representa un procedimiento diferente de cultivo.

El estado de contaminación de las plantas madres constituyó un factor incierto, pues todas provenían de un mismo invernadero sin ningún tipo de restricción sanitaria de acceso; además, el invernadero poseía una estructura abierta a los lados, lo que permitía el ingreso de agentes contaminantes, incluso de insectos. Las plantas que crecen en ambientes externos están invariablemente contaminados con microorganismos y enfermedades; debido a que se parte de explantes pequeños que deben ser inoculados en un medio nutritivo, que es favorable para el crecimiento y la multiplicación de estos microorganismos, el cultivo de tejidos debe ser establecido y mantenido en condiciones asépticas, lo que significa realizar un tratamiento de desinfección de las superficies expuestas (George, 1993).

Como el objetivo de la introducción del material vegetal era la micropropagación y no la limpieza de virus estrictamente, no se realizó ningún tipo de prueba serológica para comprobar la presencia de estos microorganismos.

Todos los tratamientos de desinfección a que fueron sometidos los brotes fueron similares: un lavado inicial con detergente para eliminar las partículas e impurezas más grandes, seguido de una inmersión en alcohol de 95°; posteriormente una desinfección inicial con NaOCl más fuerte que la segunda (también en NaOCl), y 3 lavados con agua destilada estéril después de cada desinfección con NaOCl para eliminar los restos de los compuestos químicos. El alcohol de 95°, además de servir como agente bactericida, se utilizó como surfactante para que los tejidos fueran fácilmente penetrados por los siguientes germicidas (el NaOCl en este caso). La primera desinfección con NaOCl se utilizó siempre en mayor concentración que la segunda, pues el tejido inicial (hojas superficiales del brote lateral entero) requería una desinfección sin importar el daño de ese tejido, ya que no era el explante de interés; además, por tratarse de un brote cerrado, el contacto del alcohol y del NaOCl de la primera desinfección difícilmente alcanzó el meristemo apical. La segunda desinfección con NaOCl se utilizó siempre en menor concentración respecto de la primera, pues ya para el momento de su realización, se habían eliminado algunas hojas superficiales, lo que incrementaba la posibilidad de contacto del compuesto químico con el meristemo apical, el cual es un tejido muy sensible (Flores, 1998).

La acción bactericida de las soluciones de hipoclorito se debe tanto al Ácido Hipocloroso (HOCl) como al ión OCl^- . La primera forma es probablemente más efectiva que la del ión, ya que la eficiencia desinfectante del cloro es mejor en soluciones de hipoclorito ligeramente ácidas y decrece con el incremento del pH, correspondiente a la conversión del Ácido Hipocloroso en OCl^- (Dychdala, 1977). La escogencia de este compuesto para desinfectar el material vegetal se hizo por su fácil disponibilidad en el mercado y por ser económicamente accesible, mismas razones del uso del alcohol de 95°.

En todos los casos, las soluciones de NaOCl se utilizaron con un compuesto comercial llamado Physan 20®, el cual es un desinfectante, bactericida y fungicida; esto como un refuerzo del proceso de desinfección; sin embargo, la concentración

nunca fue variada, es decir, no constituyó una variable, por lo que no puede afirmarse que esa fuera la ideal para la especie y el híbrido utilizados. El detergente líquido en las soluciones de NaOCl se utilizó como agente tensoactivo para reducir la tensión superficial del agua y permitir así un mejor acceso de los desinfectantes al tejido vegetal.

Al ápice desnudo no se le realizó ningún tipo de desinfección directa, ya que explantes delicados como éste, recubiertos con una capa protectora, generalmente están libres de contaminación microbiana (George, 1993).

Aunque *C. skinneri* y el híbrido respondieron igual al tratamiento de desinfección IV (el más fuerte y efectivo de todos los tratamientos), *C. skinneri* x *C. maxima* demostró ser la orquídea que provenía del invernadero con más contaminación, de acuerdo a los tratamientos de desinfección I y III (los cuales son comparables entre los dos tipos de orquídea). De igual forma, el híbrido resultó con un porcentaje mayor de contaminación respecto de *C. skinneri* con el tratamiento de desinfección II, aunque no fue el mismo para ambas.

De acuerdo a los altos porcentajes de contaminación presentados con los tratamientos de desinfección iniciales, la concentración de NaOCl y los períodos de exposición en éste y en alcohol de 95° se intensificaron en los tratamientos posteriores, produciendo resultados más efectivos. El tratamiento IV fue el más efectivo tanto para *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*, éste consistió en sumergir inicialmente el brote completo durante 5 minutos en alcohol de 95°, y aunque los tejidos superficiales se pudieron dañar severamente con el compuesto durante ese lapso de tiempo, el meristemo apical difícilmente tuvo contacto directo con el alcohol, ya que el brote estaba cerrado. Lo mismo sucedió con la primera desinfección con NaOCl, la cual fue lo suficientemente fuerte (solución al 3%) y duradera (20 minutos) para dañar los tejidos con los que hizo contacto, pero no con el meristemo apical. La segunda desinfección con NaOCl en el tratamiento IV se hizo con una concentración

del 1% (del compuesto activo), la cual fue lo suficientemente fuerte para desinfectar el explante sin dañarlo; la concentración fue menor por la disección realizada luego de la primera desinfección.

Una de las variables que pudo afectar positivamente el proceso de desinfección del tratamiento IV respecto de los otros, fue que las dos desinfecciones con NaOCl se realizaron dentro de la cámara de flujo laminar, situación que no ocurrió con las anteriores donde solamente se trabajó en cámara a partir de los lavados con agua estéril posteriores a la primera desinfección con NaOCl. La cámara de flujo laminar provee un área estéril por la expulsión de aire previamente filtrado libre de microorganismos, esto sin duda contribuyó a reducir las posibilidades de contaminación por manipulación.

La práctica de extracción de meristemas en orquídeas es un procedimiento que requiere cierta destreza, y es probable que un porcentaje de los explantes se contaminara por manipulación incorrecta al realizar esta práctica, especialmente en los primeros tratamientos de desinfección; sin embargo, en medio semisólido, la proliferación de bacterias y hongos siempre se observó en la base o sobre el explante, lo que indica que el contaminante ingresó sobre o dentro de los tejidos. Esta determinación no puede hacerse en medio líquido pues al estar en agitación, es difícil conocer el punto inicial de crecimiento de los microorganismos.

Los explantes inoculados en medio semisólido y que resultaron contaminados con bacteria, presentaron la misma formación de colonias en la base de los explantes lo que indica que la bacteria muy probablemente era de tipo endógeno. Las plantas que crecen en ambientes externos están contaminadas con microorganismos, los que están generalmente confinados en la superficie exterior de la planta, además, algunos microorganismos y virus pueden ser sistémicos con los tejidos (George, 1993). Los tratamientos de desinfección realizados tenían como objetivo eliminar la contaminación superficial, no la endógena; por lo tanto, si ese fue el caso, en muchas

situaciones donde sólo se presentó contaminación por bacteria, el proceso de desinfección superficial pudo tener éxito, pero la presencia de bacteria endógena eliminó el explante. A pesar de esta posibilidad, la contaminación por bacteria endógena se contempló dentro de los porcentajes de contaminación por desinfección.

El explante extraído de los brotes laterales consistió del ápice con 3-4 primordios foliares, pues esto incrementaba la posibilidad de una respuesta morfogenética si se compara con un explante que consista sólo del meristemo apical o que posea 1 o 2 primordios foliares inclusive. Los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los pequeños, pero generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor; la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja; los explantes pequeños tienden, además, a ser dañados más fácilmente (Litz y Jarret, 1991). Además, como el objetivo de la investigación era la micropropagación y no la limpieza de virus, un explante de mayor tamaño aumentaba la posibilidad de éxito. Las investigaciones llevadas a cabo por Morel (1960) con *Cymbidium*, demostraron que se obtenían plantas libres de virus, sólo en el caso de que se utilizaran meristemos (de aproximadamente 1mm) con dos primordios foliares; el clonado que se hace con porciones apicales de vástago mucho más grandes que las utilizadas por Morel, tiene pocas probabilidades de producir plantas libres de virus (Pierik, 1987).

El hecho de haber cultivado explantes conteniendo el ápice con 3-4 primordios foliares hace que la técnica no sea estrictamente "cultivo de meristemos", la cual se refiere a cultivo de ápices de brotes muy pequeños que contiene el domo meristemático apical con uno o dos primordios filiales (George, 1993). De esta forma, la técnica aplicada podría llamarse "cultivo de ápices" o "cultivo de puntas de brotes"; que consiste en cultivar puntas de brotes más grandes que los empleados para establecer cultivo de meristemos, conteniendo varios primordios foliares (George, 1993).

6.2 Oxidación de los explantes

Debido a que en la literatura se citan grandes problemas de oxidación en *Cattleya* (Kuan y González, 1993; Gutiérrez y Chen-Han, 1994; Fast, 1980); se decidió realizar un lavado de los explantes en Ácido Cítrico (100 mg/l) justo antes de la inoculación *in vitro*. Algunas clases de plantas, particularmente las especies tropicales, contienen una alta concentración de sustancias fenólicas, las cuales son oxidadas cuando las células son heridas o están senescentes; el tejido aislado se torna entonces de color café o negro y falla el crecimiento (George, 1993).

Las medidas preventivas para evitar la oxidación incluyen el uso de compuestos adsorbentes de las sustancias polifenólicas tales como el Polivinil Pirrolidona (PVP) y el Carbón Activado; también se cita el uso de compuestos antioxidantes como el Ácido Cítrico, Ácido Ascórbico, Tiourea y L-Cisteína. Prácticas como el uso de los tres aminoácidos Glutamina, Arginina y Asparagina, subcultivos frecuentes a medio de cultivo fresco, uso de medio de cultivo líquido, mantenimiento de los explantes en la oscuridad en el caso de que la coloración marrón sea causada por fotooxidación en la base de los brotes, reducción de los cortes de tejido, disminución de la concentración de sales, omisión del uso de reguladores de crecimiento y la realización de lavados con agua antes de la inoculación en cultivo aséptico han dado resultados exitosos (Pierik, 1987). En casos de oxidación también es útil usar las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante (Mroginski y Roca, 1991).

El nivel de oxidación presentado en *C. skinneri* y en el híbrido *C. skinneri* x *C. maxima* fue tan alto que la inmersión de los explantes en Ácido Cítrico (100 mg/l) antes de la inoculación en cultivo aséptico fue insuficiente para detener y evitar el proceso de liberación de fenoles, provocando un alto porcentaje de mortalidad de explantes. Los cortes realizados con bisturí en los tejidos de los explantes produjeron lisis celular, y con ello la liberación de polifenoles que resultaron tóxicos a las células

debido a su oxidación (Pierik, 1987). Es por eso que la oxidación se presentó justo después de realizar los cortes, y los lavados no resultaron ser tan efectivos. El uso de medio líquido para una mayor difusión de los fenoles y el uso de Carbón Activado en medio semisólido de enraizamiento fueron las prácticas alternativas para contrarrestar la oxidación, produciendo una respuesta positiva.

Aunque la oxidación produjo altos porcentajes de mortalidad en los explantes, esta respuesta no es dependiente del tratamiento de desinfección, sino del grado de polifenoles que contengan las células de la especie o individuo en estudio, del daño que reciban las células en el momento del corte y del estado físico del medio de cultivo en que se inoculen, fue por ello que no se presentó un comportamiento particular de los porcentajes de oxidación según el tratamiento de desinfección. Tanto *C. skinneri* como *C. skinneri* x *C. maxima* pueden ser catalogadas como plantas con altas concentraciones de fenoles.

Con respecto a la presencia de oxidación en los explantes inoculados, se dio una respuesta diferente de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* según el estado físico del medio de cultivo: *C. skinneri* presentó una menor oxidación en medio sólido respecto al híbrido, mientras que en medio líquido ocurrió lo contrario; esto demuestra que tales resultados fueron producto del estado físico del medio de cultivo y no tanto por efectos genotípicos o componentes del medio. Además, fue claro que ambas clases de orquídea responden mejor en medio de cultivo líquido.

La sobrevivencia de los explantes luego de la introducción en cultivo aséptico dependió entonces de la contaminación y de la oxidación presentada, factores que en algunos casos se dieron en un mismo explante simultáneamente. Esto produjo una reducción significativa en el número de explantes aparte de la ya de por sí limitada cantidad inicial.

6.3 Etapa de introducción

Los dos tipos de medio de cultivo de introducción utilizados se complementaron con los mismos reguladores de crecimiento y a las mismas concentraciones, pues como no era una de las variables a probar, se utilizaron de acuerdo a lo citado por Lindemann *et al.* (1970) y los cuatro medios de iniciación propuestos por Morel (1970) para el cultivo de *Cattleya*. Aunque el medio MS (1962) y el Knudson C (1946) no contemplan dentro de sus microelementos el uso del Níquel, se utilizó el compuesto $\text{NiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como un factor de enriquecimiento del medio de cultivo. La concentración utilizada de este compuesto (0,031 mg/l) se utilizó de acuerdo a lo establecido por Lindemann *et al* (1970).

La adición de auxina:citocinina (en una relación 1:2) se utilizó para promover la división celular y para inducir y acelerar el proceso de formación de cuerpos protocórmicos. Las auxinas tienen la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Krikorian, 1991a). Las citocininas son generalmente utilizadas para estimular el crecimiento y el desarrollo; promueven división celular, especialmente si son adicionadas junto con una auxina (Pierik, 1987). La Cinetina (KIN) es una sustancia estimuladora de la división celular (Krikorian, 1991a).

El uso de los reguladores de crecimiento en la etapa de introducción no fue una variable en estudio, por lo que sólo se utilizó en una sola combinación. Por esta misma razón, no puede asegurarse que esa sea la concentración óptima para *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*. Diferentes autores mencionan el uso de 0,1 mg/l de ANA y 0,2 mg/l de KIN para la etapa de introducción en *Cattleya* (Lindemann *et al.*, 1970; Morel, 1970); incluso Morel (1970) propone 4 tipos de medios de cultivo de introducción, tres de los cuales poseen la combinación de ANA y KIN mencionada.

El uso del agua de coco es bastante común en el cultivo de meristemos de *Cattleya*, especialmente en la etapa de introducción (Lindemann *et al.*, 1970; Morel, 1970; Scully, 1967; Huang, 1984; Gutiérrez y Chen-Han, 1994) por su capacidad de estimular la formación de cuerpos protocórmicos en las células epidérmicas (Homes *et al.*, 1972). La composición del agua de coco utilizada no se determinó, y varió en algunos medios de cultivo pues se utilizaron varios cocos, cuya procedencia y estado de maduración era desconocida, produciendo probablemente diferencias en la respuesta de los explantes.

El agua de coco es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos; tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el agua de coco es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables, y se pueden reemplazar por un medio salino basal. El contenido de azúcar, de alrededor de 2,5%, no es algo fuera de lo común y se puede reemplazar (se han identificado sustitutos como glucosa, fructosa, sacarosa y otros azúcares). Adicionalmente, se encuentra en ella nitrógeno no proteínico soluble en forma de aminoácidos. El lugar de origen de los cocos y, más probablemente, la época del año en que se cosechan puede tener una influencia significativa en los aminoácidos solubles presentes en el endosperma líquido; la etapa de desarrollo también desempeña un papel importante (Krikorian, 1991a).

Algunas sustancias reguladoras del crecimiento también están presentes en el agua de coco en concentraciones variables: Auxina (0,07 mg/l), Citocininas (6 mg/l); se ha determinado la presencia de Giberelinas, 1,3-Difenilurea, Zeatina, Glucósido de zeatina y Ribósido de zeatina pero su concentración ha sido difícil de medir (George, 1993).

La respuesta en cuanto a formación de cuerpos protocórmicos fue mejor en *C. skinneri* que en el híbrido, pues el 60% de los explantes de esta especie que sobrevivieron al proceso de desinfección y a los efectos de la oxidación produjeron estas estructuras, mientras que sólo el 50% de los explantes del híbrido lo lograron. Sin embargo, se dio una respuesta diferencial de acuerdo al tipo de medio de cultivo, pues los explantes pertenecientes a *C. skinneri* lo hicieron en mayor proporción en medio MS (1962) modificado que en medio Knudson C (1946) modificado (66,67% contra un 33,33%); una respuesta contraria se dio con el híbrido *C. skinneri* x *C. maxima* donde el 66,67% de los explantes formó los cuerpos protocórmicos en medio Knudson C (1946) modificado. El medio de cultivo MS (1962) modificado utilizado en la fase de inducción fue un medio más rico que el medio Knudson C (1946) modificado, pues contenía mayor porcentaje de nitrógeno y vitaminas (ausentes en el medio Knudson); sin embargo, en el caso de *C. skinneri* x *C. maxima* la respuesta podría depender más de la constitución genética que del medio de cultivo, pues la mayor formación de cuerpos protocórmicos se dio en el medio menos rico. El hecho de haber utilizado agua de coco sin la información del lugar de procedencia, estado de maduración y constitución química también pudo tener repercusiones diferenciales en la respuesta *in vitro* del material utilizado, especialmente por la presencia de reguladores de crecimiento que pudo variar significativamente.

El cultivo de ápices realizado se puede catalogar como un cultivo de órganos indeterminados, pues el crecimiento en ellos es potencialmente ilimitado (George, 1993). El punto de crecimiento de brotes puede ser cultivado de tal forma que continúe creciendo ininterrumpidamente y de forma organizada; como este brote inicial da como resultado nuevos brotes organizados que pueden luego enraizar, su cultivo tiene gran significado en términos de propagación (George, 1993). Sin embargo, en orquídeas, este proceso tiene una fase intermedia entre el cultivo del explante inicial y los brotes, la formación de cuerpos protocórmicos.

El fenómeno de formación de cuerpos protocórmicos es una característica genética propia de las orquídeas y su estructura supone un uso distinto en términos de micropropagación, pues permite un manejo más simplificado; incluso han sido definidos como órganos de perennidad (Krikorian, 1991b). Algunas especies producen órganos de perennidad *in vitro* y cuando esto ocurre, se cuenta con los medios para una multiplicación clonal a otro nivel; si esa característica es controlable, es posible realizar por este medio la siembra directa o el almacenamiento de germoplasma de ciertas plantas. La papa puede formar microtubérculos, los gladiolos pueden formar tallos bulbosos; en ciertos lirios, cebollas, narcisos, jacintos, en *Dioscorea*, etc se han encontrado bulbillos; y, por supuesto, las orquídeas han producido protocormos (Krikorian, 1991b).

Todos los explantes que respondieron formando cuerpos protocórmicos lo hicieron en todos los casos sin pasar por una etapa de callo, lo que significa que el proceso fue por organogénesis directa.

Los tejidos mesitemáticos inoculados y que respondieron efectivamente a las condiciones *in vitro* para la formación de cuerpos protocórmicos sufrieron un proceso de rejuvenecimiento celular y una multiplicación de las células meristemáticas (con características embrionarias), de ahí que se formaron estas estructuras tan parecidas a los protocormos provenientes de semilla.

De acuerdo con el estado físico del medio de cultivo, tanto *C. skinneri* como *C. skinneri* x *C. maxima* respondieron mejor en medio líquido que en medio semisólido en lo que respecta a la producción de cuerpos protocórmicos, debido a que el medio líquido en agitación promueve la división celular y mantiene disueltos los polifenoles que liberan los tejidos, además de que la oxigenación de las células y el alcance de los nutrientes a éstas es más efectivo, pues la totalidad del explante está en contacto con el medio, mientras que los explantes cultivados en medio semisólido contactan con los nutrientes sólo en las secciones que están insertadas en el medio. El

aislamiento de meristemos de orquídeas generalmente tiene lugar en medios semisólidos con la excepción de *Cattleya*; la propagación de protocormos generalmente tiene lugar en medios líquidos (Homes *et al.*, 1972)

El uso de 95-100 rpm de agitación en los medios de cultivo líquido se hizo para que los explantes tuvieran la oportunidad de salir a la superficie en determinado momento de las rotaciones, esto para un mejor intercambio gaseoso celular. En medio líquido, algún método de soporte es necesario para los órganos o explantes pequeños, los cuales de otra forma se sumergirían completamente bajo la superficie del medio estático, los cuales morirían por la falta de aireación; muchos tejidos y órganos, grandes y pequeños, también crecen bien en medio de cultivo líquido, proveyendo agitación o movimiento (George, 1993).

Con respecto al tiempo necesario para la formación de los cuerpos protocórmicos en medio líquido, en *C. skinneri* la inducción se dio con más velocidad en medio MS (1962) modificado que en medio Knudson C (1946) modificado, debido probablemente a la mayor cantidad de compuestos del primer medio; también debe tomarse en cuenta variables como la composición del agua de coco, lo cual pudo afectar positivamente el desarrollo temprano de los cuerpos protocórmicos en el medio MS (1962). El único explante (de *C. skinneri*) que produjo cuerpos protocórmicos en medio de cultivo semisólido lo hizo en el mayor tiempo si se compara con el resto de los explantes en medio líquido (incluso comparado con los de *C. skinneri* x *C. maxima*), pues el acceso de los nutrientes y el estímulo de división (por la ausencia de movimiento) fue menor. En *C. skinneri* x *C. maxima*, el tiempo requerido para la formación de cuerpos protocórmicos fue muy similar en los dos tipos de medios de cultivo, sin embargo, el medio menos rico (Knudson) fue el que dio mejores resultados. El número limitado de explantes que llegaron a formar cuerpos protocórmicos afecta las determinaciones estadísticas realizadas, pues son muestras muy pequeñas; de ahí que las afirmaciones que se deducen podrían variar considerablemente si se realizan pruebas con un mayor número de explantes.

Lindemann *et al.* (1970) y Morel (1970) obtuvieron cuerpos protocórmicos de *Cattleya* en un período de 2 meses; si esto se compara con el tiempo requerido en *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*, es claro que estos dos tipos de orquídea forman los cuerpos protocórmicos en menor tiempo, independientemente del tipo de medio de cultivo y del estado físico de éste. Esta respuesta es dependiente del factor genético, del medio de cultivo utilizado y de las condiciones físicas en las que fueron mantenidos.

Pierik (1987) y Champagnat (1977) aseguran que en el proceso de formación de protocormos en *Cattleya*, el meristemo apical no juega ningún papel y al final se pierde. Tanto en *C. skinneri* como en *C. skinneri* x *C. maxima* la parte apical del explante formó cuerpos protocórmicos y posteriormente brotes adventicios, lo que implica que la parte apical respondió efectivamente al proceso de inducción de cuerpos protocórmicos.

El número de cuerpos protocórmicos por explante pudo variar de acuerdo al tamaño inicial del ápice; así, los explantes de mayor tamaño (con más yemas axilares), al poseer mayor número de puntos de crecimiento, tenían más probabilidad de producir un mayor número de cuerpos protocórmicos, pues las yemas contienen tejido meristemático, que al igual que el meristemo apical, forma estas estructuras. Además de ese factor, los componentes y el estado físico del medio de cultivo, así como la respuesta genética, influyeron de una u otra forma en el número de cuerpos protocórmicos producidos por explante. Esto no significa que en ausencia del meristemo apical la formación de cuerpos protocórmicos sea imposible.

6.4 Etapa de multiplicación

Los cuerpos protocórmicos se dividen espontáneamente, pero generalmente esto se consigue cortando el protocormo en porciones (Morel, 1965; Pierik, 1987). En el proceso de multiplicación de cuerpos protocórmicos de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C.*

maxima no se evidenció división espontánea, y los protocormos que fueron seccionados con bisturí murieron en los días siguientes después de realizado el fragmentamiento por daño del tejido. Los cuerpos protocórmicos están compuestos de células meristemáticas, las cuales son muy sensibles, poseen paredes celulares de tipo primario que se fracturan con facilidad liberando el contenido celular; el corte del tejido produjo un daño celular que se extendió a las células vecinas produciendo la muerte de todo el tejido. Debido a estos resultados, se evitó la práctica de diseccionar el resto de explantes sobrevivientes y se dejó que alcanzaran la brotación sin realizar ningún tipo de corte. La sensibilidad del tejido de los cuerpos protocórmicos ya se había evidenciado con la muerte del explante que produjo cuerpos protocórmicos en medio semisólido, y que se dañó en uno de los subcultivos, sin haber realizado ningún tipo de corte.

La cantidad de volumen de medio líquido en que estaban inoculados los explantes en medio de multiplicación (50 ml de medio en erlenmeyers de 250 ml) pudo ser, además del daño causado al tejido por el corte, una de las razones de la muerte de los explantes que fueron seccionados con bisturí, ya que al ser tan pequeños, pasaban la mayor parte de las rotaciones totalmente sumergidos en el medio de cultivo, evitando un efectivo intercambio gaseoso. Debido a esta posibilidad, el volumen del medio fue variado a 20 ml. Esta reducción significó mayores posibilidades de intercambio gaseoso y un ahorro en la producción de medio de cultivo; sin embargo, la práctica de seccionamiento de cuerpos protocórmicos no fue realizada otra vez para no arriesgar el poco material con el que se contaba; por lo que no puede afirmarse que el motivo de la muerte haya sido la falta de oxigenación.

El cambio en el volumen del medio de cultivo no demostró variaciones en el crecimiento, por el contrario, los explantes se desarrollaron perfectamente, lo que indica que la cantidad de nutrientes contenida en los 20 ml de medio fue suficiente para el crecimiento y desarrollo de los mismos.

La etapa de multiplicación se efectuó en la división de brotes adventicios, fase que corresponde al proceso natural posterior a la formación de los cuerpos protocórmicos. Incluso en el proceso de brotación se pudo verificar la sensibilidad de los tejidos, pues la separación de brotes muy pequeños (menores de 0,5 cm) significó siempre la muerte de los mismos, hecho que descartó de cierta forma la posibilidad de que la muerte fuera por falta de oxigenación, ya que para ese entonces la reducción del volumen en el medio de cultivo había sido realizada.

La sobrevivencia de los brotes con longitud de 1,5 cm o más al ser separados del cuerpo principal de cuerpos protocórmicos significó que la diferenciación celular en estos era tal que permitía a la estructura mantenerse por sí sola, y que el daño de tejido ocasionado en la separación era mínimo. Una mayor longitud del brote adventicio, implica una mayor diferenciación celular en los tejidos pues ya hay un mayor crecimiento y desarrollo de las hojas y tallo, las células han alcanzado un mayor grado de especialización y por tanto son más resistentes (Pierik, 19878; Flores, 1998). Además, debe tomarse en cuenta que se trató de una simple separación de los brotes, y no de cortes con bisturí, lo que reduce el daño celular. El éxito de la separación de brotes con 1,5 cm o más de longitud se demostró en el mantenimiento de la estructura vegetal y en la producción de más brotes adventicios en la base de los explantes separados.

La brotación de los cuerpos protocórmicos se dio en todos los explantes sobrevivientes que habían formado estas estructuras, indicando que el proceso de brotación es 100% exitoso en medio líquido, contrario a lo encontrado por Holmes *et al.*(1972) quien afirmó que los protocormos generalmente no se transforman en plántulas en un medio de cultivo líquido.

Los medios de cultivo de multiplicación MS (1962) modificado y Knudson C (1946) modificado se mantuvieron con el mismo tipo de auxina (ANA) y citocinina (KIN), con una leve modificación de la concentración, como promotores e inductores

de la división celular. Además se añadió Ácido Giberélico (AG₃), como un factor para promover el crecimiento por elongación. Varias giberelinas, que son productos complejos del metabolismo de hongos y de plantas superiores, son capaces de intervenir en el crecimiento celular (Krikorian, 1991a). En general, las giberelinas inducen elongación de internodos y el crecimiento de meristemos o yemas *in vitro* (Pierik, 1987); esto significa que el papel del AG₃ en el medio de multiplicación fue inducir elongación de los brotes; sin embargo, tanto esta giberelina como los otros reguladores de crecimiento se utilizaron en una sola combinación de acuerdo a lo establecido por Lindemann *et al.*(1970) para el cultivo *in vitro* de *Cattleya* a partir de meristemos, lo que no permite establecer comparaciones para determinar la combinación óptima para *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*. Además, es probable que parte de la actividad biológica del AG₃ se haya perdido en el autoclavado (forma en que fue esterilizado) (Arditti y Ernst, 1993)

El AG₃ es termosensible: después del autoclavado el 90% de la actividad biológica se pierde (Pierik, 1987). Arditti y Ernst (1993) recomiendan su esterilización en frío por medio de filtración o disolviendo el compuesto en etanol. Esta última recomendación fue considerada en el momento de preparar la solución madre de AG₃ y se procedió a añadirla en esa forma en el medio de cultivo para su posterior esterilización por autoclavado.

De acuerdo al índice de brotación, *C. skinneri* es la especie que más brotes nuevos produce por semana independientemente del tipo de medio de cultivo, si se compara con *C. skinneri* x *C. maxima*. Genéticamente, *C. skinneri* tiene la cualidad de producir más brotes adventicios comparada con el híbrido. A nivel de medio de cultivo, en ambos tipos de orquídea analizados, el medio Knudson C (1946) modificado, a pesar de ser un medio menos rico que el MS (1962) modificado, resultó ser el más propicio para la producción de nuevos brotes adventicios. El agua de coco utilizada pudo ser un factor diferencial en la respuesta a la brotación.

En el índice de brotación no se contempló el número de brotes iniciales en el explante (que depende del tamaño inicial de éste), sino del número de brotes nuevos que se producen en determinado período de tiempo, lo que podría depender de la interacción del genotipo con el medio de cultivo y las condiciones físicas de crecimiento.

La formación inicial de raíces en el medio de multiplicación podría indicar que esta respuesta está dada más que todo por el componente genético y el proceso de desarrollo de las plantas *in vitro*, y no tanto por el uso de un medio especial de enraizamiento. En realidad el medio de enraizamiento se utiliza para una proliferación mayor de raíces, pero el enraizamiento (en *C. skinneri*) pudo darse en el medio de multiplicación mientras la planta estuviera en esa etapa de desarrollo.

6.5 Etapa de enraizamiento

El enraizamiento de vitroplantas de *C. skinneri* se dio exitosamente en medio Knudson C (1946) modificado, tanto en estado semisólido como líquido. Aunque la proliferación de raíces se dio en los dos tipos de medio (semisólido y líquido), fue evidente que el medio ideal para el enraizamiento de vitroplantas de *C. skinneri* fue el semisólido por el número mayor de raíces producidas. Esta respuesta se dio debido a que el medio semisólido representó una matriz más estable para la penetración de las raíces, que por su estructura y función tienden a realizar esa acción. Las vitroplantas en medio líquido presentaron un menor crecimiento que aquellas en medio semisólido, y fue claro el daño mecánico producido por el movimiento rotatorio del agitador orbital, evidenciado por el daño en los tejidos y el desprendimiento de raíces.

El medio de cultivo de enraizamiento se diseñó con una concentración menor de sales minerales (al 50%) y se eliminó el uso de reguladores de crecimiento y agua de coco para producir en las plantas un efecto de aclimatación previo al retiro de las mismas de condiciones *in vitro*; esto es, que entre menos condiciones favorables

tengan las plantas en esta etapa, más obligadas se verán a prepararse a las condiciones *ex vitro*.

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio MS (1962), por ejemplo, diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1980). En el caso de *C. skinneri* se decidió eliminar incluso las auxinas, pues en el momento de introducir las plantas en medio de enraizamiento, todas las plantas tenían formación de estas estructuras.

El uso de carbón activado (2 mg/l) en medio semisólido se hizo con el objetivo de evitar la oxidación y adsorber las exudaciones de la raíz, lo cual fue muy evidente en medio líquido (donde no se usó carbón activado). El carbón activado se caracteriza por contener una extremada gran área por unidad de peso y esto es aprovechado para la adsorción de sustancias (Arditti y Ernst, 1993).

En la etapa de introducción y multiplicación, los subcultivos se realizaron en períodos de tres semanas, pero en la fase de enraizamiento en medio líquido los subcultivos se redujeron a una semana, pues era tal la exudación de las raíces que el medio se tornaba oscuro. Esta frecuencia de subcultivo en medio líquido provoca mayores costos en el proceso de enraizamiento si se compara con el medio semisólido, en el cual las plantas pueden pasar incluso más de tres semanas sin la presencia de oxidación ni exudaciones. Además, debe contemplarse que el uso de un agitador orbital implica un aumento en los costos si se compara con el uso de recipientes estáticos con medio semisólido. Ni siquiera se justifica en el caso de enraizamiento de plantas de *C. skinneri*, pues fue bastante claro el mejor desarrollo en medio semisólido.

En general, la propagación y el crecimiento son mejores en un medio en movimiento que en un medio sólido (Pierik, 1987), pero el enraizamiento es exitoso en medio semisólido, autores como Lindemann *et al.* (1970), Morel (1970), Reinert and Mohr (1967), Scully (1967), Gutiérrez y Che-Huan (1994) han utilizado medio semisólido para el enraizamiento de brotes de *Cattleya*.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales en que se llevó a cabo el proceso de micropropagación de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*, se desprenden las siguientes conclusiones:

- a.** El tratamiento de desinfección más efectivo para brotes laterales de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* fue el tratamiento IV, que contempló un lavado inicial de los brotes con agua y detergente por 10 minutos, seguido de una inmersión en alcohol de 95° por 5 minutos. Posteriormente se aplicó una doble desinfección con NaOCl (al 3% y 1%, por 10 y 20 minutos, respectivamente) conteniendo cada una 0,5% de Phytan 20® y 3 gotas de detergente líquido. Después de cada desinfección con NaOCl se aplicaron lavados con agua estéril (3 lavados después de la primera desinfección y 2 después de la segunda, todos con una duración de 2 minutos). Después de los lavados posteriores a la primera desinfección con NaOCl se realizó la disección de 4-5 hojas superficiales, y luego de los lavados que siguieron a la segunda desinfección con NaOCl se inoculó el ápice.
- b.** De acuerdo a los tratamientos de desinfección realizados, se deduce que el híbrido *C. skinneri* x *C. maxima* provenía del invernadero con mayor porcentaje de contaminación, comparado con los explantes de *C. skinneri*.
- c.** La alta mortalidad de explantes tanto de *C. skinneri* como de *C. skinneri* x *C. maxima* dependió de la contaminación y de la oxidación producida por los explantes luego de la disección del ápice.
- d.** *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* podrían ser catalogadas como orquídeas con alto porcentaje de fenoles.

- e.** Por los resultados obtenidos en este ensayo, el lavado de los ápices de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* en Ácido Cítrico (100 mg/l) antes de la inoculación en cultivo aséptico no evitó ni redujo el efecto de la oxidación en los mismos
- f.** Se observó una respuesta positiva de los explantes de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima* en el medio líquido en la etapa de introducción y multiplicación. La etapa de enraizamiento se favoreció con el uso de medio semisólido.
- g.** El uso de medio líquido en la etapa de introducción redujo los efectos nocivos de los fenoles producidos en la oxidación.
- h.** Los explantes de *C. skinneri* produjeron cuerpos protocórmicos más rápido que los del híbrido *C. skinneri* x *C. maxima*.
- i.** El medio MS (1962) modificado de introducción resultó ser el más efectivo para la inducción de cuerpos protocórmicos en *C. skinneri*; en tanto que en los explantes de *C. skinneri* x *C. maxima* el medio más efectivo para la inducción de protocormos fue el Knudson C (1946) modificado.
- j.** Se determinó que los cuerpos protocórmicos de ambos tipos de orquídea se produjeron de forma más exitosa en medio líquido.
- k.** Un volumen de 20 ml de medio líquido resultó eficiente para el desarrollo de los explantes en medio de multiplicación y enraizamiento.
- l.** La formación de cuerpos protocórmicos en *C. skinneri* se inició con mayor rapidez en medio de cultivo MS (1962) modificado de introducción que en medio Knudson C (1946) modificado. En el híbrido los cuerpos protocórmicos se iniciaron en un

lapso menor en medio Knudson C (1946) modificado.

- m.** El seccionamiento de tejido de cuerpos protocórmicos como vía de multiplicación no resultó efectivo en ninguna de las especies estudiadas.
- n.** Se determinó que la separación de brotes con longitudes mayores o iguales a 1,5 cm resultó ser la única forma de multiplicación en *C. skinneri* y en *C. skinneri* x *C. maxima*
- o.** *C. skinneri* mostró una mayor capacidad de formación de brotes nuevos por unidad de tiempo comparado con *C. skinneri* x *C. maxima*.
- p.** En el medio de multiplicación Knudson (1946) modificado se indujo la brotación de los explantes de los dos genotipos de *Cattleya* utilizados.
- q.** El enraizamiento de vitroplantas de *C. skinneri* se dio efectivamente tanto en medio líquido como semisólido, sin embargo en el medio de cultivo semisólido las raíces se produjeron en mayor número y la estructura de las mismas fue mejor que aquellas producidas en medio de cultivo líquido.

8 RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones en cultivo de ápices de *C. skinneri* y *C. skinneri* x *C. maxima*, se recomienda lo siguiente:

- a.** Pretratar las plantas en invernadero con fungicidas sistémicos semanas antes de la extracción de los explantes para aumentar las posibilidades de éxito del tratamiento de desinfección
- b.** Realizar pruebas de extracción de meristemas con 1, 2 y ningún primordio foliar de plantas con virus, y realizar pruebas serológicas después del proceso de micropropagación para determinar cuál es el tamaño del explante inicial requerido para limpieza de virus.
- c.** Evitar el uso de medio semisólido en la etapa de introducción
- d.** Efectuar pruebas con medio semisólido en la etapa de multiplicación, para comparar la respuesta respecto al medio líquido en lo que se refiere a índice de brotación y tamaño óptimo de los brotes adventicios para su multiplicación por separación
- e.** Realizar pruebas para reducir la oxidación colocando los explantes recién disectados en oscuridad durante los primeros días de cultivo.
- f.** Incorporar al medio de introducción antioxidantes como el Ácido Cítrico, Ácido Ascórbico, Tiourea o L-Cisteína; o utilizar de forma conjunta los aminoácidos Glutamina, Arginina y Asparagina para comprobar su efecto en la reducción de la oxidación.

- g.** Realizar ensayos en diferentes volúmenes de medio de cultivo (menores a 50 ml) en la etapa de introducción para comprobar la respuesta de los explantes en la formación de cuerpos protocórmicos.

- h.** Realizar tratamientos con diferentes combinaciones de auxinas, citocininas y giberelinas en las etapas de introducción y multiplicación.

- i.** Evitar el uso de medio líquido en la etapa de enraizamiento

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A. y Muñoz, A. 1997. Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión. pp 4-10.
- Abdelnour, A. y Vincent, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Cartago, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 38 p.
- American Orchid Society. 1995. El cultivo de las cattleyas y sus híbridos. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 48-49.
- American Orchid Society. *Cattleya maxima* comment. (<http://www.orchidworks.com/orchids/cattleya/maxima-c.htm>). 1996.
- Ardittit, J y Ernests, R. 1993. Micropropagation of orchids. New York, United States of America. John Waley & Sons, Inc. pp 25-86,199-240.
- Dressler, R.L. 1993. Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama. New York, Estados Unidos de América. Cornell University Press. 374 p.
- Dychdala, G.R. 1977. Disinfection, Sterilisation and Preservation. In: Block ss (ed). Philadelphia, United States of America. Lea and Sebigier. pp 167-195.
- Fast, 1980. Orchideen Kulture. Verlag E. Ulmer, Stuttgart: 1-460.
- Flores, E. 1998. La Planta: estructura y función. 2 ed. Cartago, Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 501 p.
- García, J. 1995. La Subtribu Laeliinae: las cattleyas y sus parientes. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 6-7.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture Part 1: The Technology. 2 ed. England. Exegetics Ltda. 574 p.
- González, F. 1995. Presentación. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 4-5.

Gutiérrez, C. y Chen-Han, J. 1994. Propagación clonal *in vitro* de *Cattleya* por medio de meristemas. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. 13 p.

Homes *et al.* 1972. Bull. Soc. Roy. Belg. 106: 123-128

Horich, C. 1980. Las *Cattleyas* en Costa Rica. En: Orquídeas: su cultivo en Costa Rica. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Impresora Delta, S.A. pp 9-11.

Huang, L. C. 1984. Alternative media and method for *Cattleya* propagation by tissue culture. American Orchid Society Bulletin. 53:167-170.

Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin. 15: 214-217.

Krikorian, A.D. 1991a. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 41-78.

Krikorian, A.D. 1991b. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 95-125.

Kuan, C. y González, L. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. pp 1-16, 47-53, 75-76.

Leffring. 1968. Meded. Dir. Tuinbouw. 31: 392-395.

Lindemann, E. G. P.; Gunkenl, J. E. y Davison, O. W. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. American Orchid Society Bulletin. 39: 1002-1004.

Litz, R.E y Jarret, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 143-172.

Mora, D y Warner, J. 1995. La conservación de las orquídeas en el Jardín Botánico Lankester. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 54-55.

Mora-Retana, D. y García, J. 1992. Lista actualizada de las orquídeas de Costa Rica (Orchidaceae). En: Brenesia. (37). Ed. Por Departamento de Historia Nacional, Museo Nacional de Costa Rica. pp 79-124.

- Morel, G. M. 1960. American Orchid Society Bulletin. 29: 495-497.
- Morel, G. M. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymb. Soc. News. 20 (7): 3-11.
- Morel, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. En: The Orchids: Scientific studies. Ed. por Withner C.L. New York, United States of America. John Wiley and Sons. pp 169-222.
- Mroginski, L. A. y Roca, W. M. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 19-40.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiology. 25:135-166.
- Murashige, T. 1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. Botanical Bulletin of the Academia Sinica. 18:1-24.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15:473-497.
- Pierik, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. Dordrecht, The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers. 343 p.
- Quesada, A. 1997. Interpretación de los sectores y senderos del Jardín Botánico Lankester. Tesis para optar el grado de licenciatura con énfasis en interpretación ambiental. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 137 p.
- Reinert, R. A. y Mohr, H. C. 1967. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristem. Pro. Am. Soc. Sci. 91: 664-671.
- Rodríguez, R. 1995. ¿Qué clase de guarías hay en Costa Rica?. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 31-35.
- Rodríguez, R.; Mora, D; Barahona, M. y Williams, N. 1986. Orquídeas de Costa Rica. San José, Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 336 p.
- Scully, R.M. Jr. 1967. Aspects of meristem culture un *Cattleya* Alliance. American Orchid Society Bulletin. 36: 103-108.

Sequeira, R. 1980. Algunos datos históricos sobre las orquídeas. En: Orquídeas: su cultivo en Costa Rica. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Impresora Delta, S.A. pp 3-7.

Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. En: Vasil, I. K (ed). Perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, New York, pp 71-111.

Trich, G. 1995. La Subtribu Laeliinae en Costa Rica: algunos géneros. En: Orquídeas de Costa Rica y su cultivo Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Ed. por la Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta LIL. pp 8-20.

Vacin, E. F. y Went, F. W. 1949. Some pH changes in natural solutions. *But. Gaz.* 110: 605-613.

Villalobos, V.M. y Thorpe, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 127-141.

Walter, K. 1979. Orquídeas. Traducido por: Luis Diego Gómez. San José, Costa Rica. s.e. 42 p.

Warner, J. 2000. Descripción botánica del híbrido *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima*. Jardín Botánico Lankester. Cartago, Costa Rica. (Comunicación personal).

ANEXO 1

Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (1962)

| Compuesto Químico | Concentración (mg/l) |
|---|-----------------------------|
| <i>Macroelementos</i> | |
| KNO ₃ | 1900 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| CaCl ₂ • 2H ₂ O | 440 |
| MgSO ₄ • 7H ₂ O | 370 |
| <i>Microelementos</i> | |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 |
| MnSO ₄ • 4H ₂ O | 22,3 |
| ZnSO ₄ • 7H ₂ O | 8,6 |
| KI | 0,83 |
| Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O | 0,25 |
| CuSO ₄ • 5 H ₂ O | 0,025 |
| CoCl ₂ • 6H ₂ O | 0,025 |
| Fe-EDTA | 43 |

ANEXO 2

Composición del medio de cultivo Knudson C (1946) modificado

| Compuesto Químico | Concentración (mg/l) |
|---|-----------------------------|
| <i>Macroelementos</i> | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 500 |
| Ca(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O | 1000 |
| MgSO ₄ • 7H ₂ O | 250 |
| KH ₂ PO ₄ | 250 |
| <i>Microelementos</i> | |
| H ₃ BO ₃ | 0,056 |
| MnSO ₄ • 4H ₂ O | 7,5 |
| ZnSO ₄ • 7H ₂ O | 0,331 |
| Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O | 0,25 |
| CuSO ₄ | 0,040 |
| Fe-EDTA | 43 |