

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD

**GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES NACIONALES DE ORQUÍDEA EN
MEDIOS DE CULTIVO NATURALES**

José Pablo Elizondo Santana

CARTAGO, DICIEMBRE 2000

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES NACIONALES DE ORQUÍDEA EN MEDIOS DE CULTIVO NATURALES

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**MSc. Silvana Alvarenga Venutolo
Profesora Guía**

**Ing. Carmen Gutiérrez C.
Representante de la empresa**

**Lic. Jaime Brenes M.
Lector**

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES NACIONALES DE ORQUÍDEA EN MEDIOS DE CULTIVO NATURALES

José Pablo Elizondo Santana *

RESUMEN

Semillas de *Cattleya aurantiaca*, *C. skinneri* Var. Bateman y *C. skinneri* Var. Alba se cultivaron en cuatro medios de cultivo con el fin de disminuir los costos de germinación. Tres estaban constituidos a partir de yuca (*Manihot esculenta*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y germen de trigo comercial de la casa Bioland®. Como testigo se empleó el medio Knudson C (1946). El mayor número de semillas germinadas se obtuvo con la siembra *in vitro* de semillas de *Cattleya aurantiaca* en un medio de cultivo de yuca. Las semillas que presentaron el menor costo de germinación fueron de la especie *Cattleya aurantiaca*, sembradas en un medio de yuca (¢0,06 por cada semilla germinada).

Palabras clave: germinación de semillas de orquídea, *Cattleya skinneri* Var. Bateman, medios de cultivo naturales.

* Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2000.

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES NACIONALES DE ORQUÍDEA EN MEDIOS DE CULTIVO NATURALES

José Pablo Elizondo Santana *

Abstract

Seeds of *Cattleya aurantiaca*, *C. skinneri* Var. Bateman and *C. skinneri* Var. Alba was cultivated in four cultivation media with the purpose of diminishing the germination costs. Were three constituted starting from yucca (*Manihot esculenta*), tomato (*Lycopersicon sculentum*) and germ of wheat of the commercial house Bioland®. As witness the means Knudson C (1946) was used. The bigger number of germinated seeds was obtained with the sows *in vitro* of seeds of *Cattleya aurantiaca* in a means of yucca cultivation. The seeds that presented the smallest germination cost were of the species *Cattleya aurantiaca*, sowed in a media of yucca (¢0,06 for each germinated seed).

Key words: orchid seeds germination, *Cattleya skinneri* Var. Bateman, natural culture medium.

* Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2000.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia del agradecimiento dirigido a las siguientes instituciones y personas:

Al Instituto Nacional de Aprendizaje, en especial a los encargados del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, por su apoyo incondicional en las labores de laboratorio.

A los compañeros de la carrera por sus muestras de apoyo en todo momento.

A los miembros del Tribunal Evaluador, por su guía y sus valiosas sugerencias, durante la elaboración de la práctica.

Tabla de Contenido

| | |
|--|------------|
| RESUMEN | III |
| ABSTRACT | IV |
| AGRADECIMIENTOS | V |
| 1. INTRODUCCIÓN | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | 13 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3. REVISIÓN DE LITERATURA | 14 |
| 3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE | 14 |
| 3.2. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>CATTLEYA</i> | 14 |
| 3.2.1. Clasificación Taxonómica..... | 14 |
| 3.2.2. Descripción botánica | 15 |
| 3.2.3 Distribución Geográfica | 15 |
| 3.3. CULTIVO DE ORQUÍDEAS | 17 |
| 3.4. REPRODUCCIÓN COMERCIAL | 19 |
| 3.4.1 Reproducción vegetativa tradicional | 19 |
| 3.4.2 Reproducción por semillas | 19 |
| 3.4.3. Procesos de germinación de la semilla | 21 |
| 3.5. GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> | 21 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| 4.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO..... | 25 |
| 4.2. ESTIMACIÓN DEL VALOR ECONÓMICO DE LOS MEDIO DE CULTIVO | 26 |
| 4.3. DESINFECCIÓN DE LAS CÁPSULAS | 26 |
| 4.4. SIEMBRA DE SEMILLAS | 26 |
| 4.5. ESTADO DE DESARROLLO DE LAS SEMILLAS | 27 |
| 4.6. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE SEMILLAS GERMINADAS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO | 27 |
| 4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 28 |
| 4.8. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE LAS SEMILLAS GERMINADAS, PROTOCORMOS Y PLÁNTULAS OBTENIDAS EN CADA MEDIO DE CULTIVO..... | 28 |
| 5. RESULTADOS | 29 |
| 5.1. MEDIOS DE CULTIVO | 29 |
| 5.1.1. Características físicas de los medios de cultivo | 29 |
| 5.1.2. Valor económico | 30 |
| 5.2. ESTADO DE LAS SEMILLAS..... | 31 |
| 5.3. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS | 31 |

[Continua...](#)

| | |
|---|-----------|
| 5.4. TIEMPO DE DURACIÓN DE LA GERMINACIÓN..... | 32 |
| 5.5. CANTIDAD DE SEMILLAS GERMINADAS | 35 |
| 5.5.1. <i>Cattleya aurantiaca</i> | 36 |
| 5.5.2. <i>Cattleya skinneri</i> Var. <i>Bateman</i> y <i>C. skinneri</i> Var. <i>Alba</i> | 38 |
| 5.6. TIEMPO DE DURACIÓN DE LA GERMINACIÓN..... | 40 |
| 5.7. VALOR ECONÓMICO DE LA GERMINACIÓN..... | 40 |
| 5.7.1. <i>Cattleya aurantiaca</i> | 40 |
| 5.8. TIEMPO DE DURACIÓN DE LA GERMINACIÓN..... | 42 |
| 5.8.1. <i>Cattleya skinneri</i> Var. <i>Bateman</i> y <i>C. skinneri</i> Var. <i>Alba</i> | 42 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 44 |
| 6.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO..... | 44 |
| 6.2. VALOR ECONÓMICO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO | 44 |
| 6.3. TIEMPO DE DURACIÓN DE LA GERMINACIÓN..... | 45 |
| 6.3.1. <i>Cattleya aurantiaca</i> | 45 |
| 6.3.2. <i>Cattleya skinneri</i> Var. <i>Bateman</i> y <i>C. skinneri</i> Var <i>Alba</i> | 46 |
| 6.4. CANTIDAD DE SEMILLAS GERMINADAS | 47 |
| 6.4.1. <i>Cattleya aurantiaca</i> | 48 |
| 6.5. VALOR ECONÓMICO DE LA GERMINACIÓN..... | 53 |
| 6.5.1. <i>Cattleya aurantiaca</i> | 53 |
| 6.5.2. <i>Cattleya skinneri</i> Var <i>Bateman</i> y <i>C. skinneri</i> Var <i>Alba</i> | 53 |
| 7.CONCLUSIONES..... | 55 |
| 8. RECOMENDACIONES | 56 |
| 9. BIBLIOGRAFIA..... | 57 |
| 10. ANEXOS..... | 60 |
| ANEXO 1..... | 60 |
| ANEXO 2..... | 61 |
| ANEXO 3..... | 63 |
| ANEXO 4..... | 64 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 5.1.2. VALOR ECONÓMICO DE CUATRO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, UTILIZADOS PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEA. | 31 |
| TABLA 5.5. TOTAL DE SEMILLAS GERMINADAS DE <i>CATTLEYA AURANTIACA</i> , <i>C. SKINNERI</i> VAR. BATEMAN Y <i>C. SKINNERI</i> VAR. ALBA, EN 4 DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS. | 35 |
| TABLA 5.5.1. NÚMERO PROMEDIO DE PLÁNTULAS DE <i>CATTLEYA AURANTIACA</i> OBTENIDAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, A PARTIR DE 1 ML DE SEMILLAS EN SUSPENSIÓN..... | 37 |
| TABLA 5.6.1. VALOR ECONÓMICO DE UN PROTOCORMO Y DE UNA PLÁNTULA DE <i>CATTLEYA AURANTIACA</i> OBTENIDOS EN 4 DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. | 41 |
| TABLA 5.6.2. VALOR ECONÓMICO DE UN PROTOCORMO Y DE UNA PLÁNTULA DE <i>CATTLEYA SKINNERI</i> VAR. BATEMAN Y <i>CATTLEYA SKINNERI</i> VAR. ALBA, OBTENIDOS EN UN MEDIO DE CULTIVO KNUDSON (1946). | 43 |
| TABLA 6.4.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE TRES MEDIOS NATURALES PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>CATTLEYA</i> . (CONCENTRACIONES REPORTADAS PARA LAS CANTIDADES DE TOMATE, YUCA Y GERMEN DE TRIGO NECESARIAS PARA ELABORAR UN LITRO DE MEDIO DE CULTIVO) | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 5.2. SEMILLAS DE <i>CATTLEYA SKINNERI</i> . A: SEMILLAS DE <i>CATTLEYA SKINNERI</i> VAR. ALBA, CON EMBRIÓN. B: SEMILLA DE <i>CATTLEYA SKINNERI</i> VAR. BATEMAN, SIN EMBRIÓN.(40X) | 33 |
| FIGURA 5.3. ESTRUCTURAS DE <i>CATTLEYA AURANTIACA</i> . A: PROTOCORMO DE GERMINACIÓN (40X). B: COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES ESTADÍOS DE DESARROLLO. (10X)..... | 34 |
| FIGURA 5.5.1.A NÚMERO PROMEDIO DE SEMILLAS GERMINADAS DE <i>CATTLEYA AURANTIACA</i> , 4 DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO A PARTIR DE UNA ALÍCUOTA DE 1ML DE SEMILLAS DE SUSPENSIÓN | 36 |
| FIGURA 5.5.1.B. NÚMERO PROMEDIO DE PROTOCORMOS DE <i>CATTLEYA AURANTIACA</i> , OBTENIDOS EN 4 DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, A PARTIR DE UNA ALÍCUOTA DE 1 ML DE SEMILLAS DE SUSPENSIÓN | 38 |
| FIGURA 5.5.2. NÚMERO PROMEDIO DE SEMILLAS GERMINADAS DE <i>CATTLEYA SKINNERI</i> VAR. BATEMAN Y C. <i>SKINNERI</i> VAR. ALBA OBTENIDAS EN UN MEDIO DE CULTIVO KNUDSON C (1946), A PARTIR DE UNA ALÍCUOTA DE 1 ML DE SEMILLAS DE SUSPENSIÓN | 39 |
| FIGURA 5.5.1.B. NÚMERO PROMEDIO DE PROTOCORMOS DE <i>CATTLEYA AURANTIACA</i> , OBTENIDOS EN 4 DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, A PARTIR DE UNA ALÍCUOTA DE 1 ML DE SEMILLAS DE SUSPENSIÓN | 38 |
| FIGURA 5.5.2. NÚMERO PROMEDIO DE SEMILLAS GERMINADAS DE <i>CATTLEYA SKINNERI</i> VAR. BATEMAN Y C. <i>SKINNERI</i> VAR. ALBA OBTENIDAS EN UN MEDIO DE CULTIVO KNUDSON C (1946), A PARTIR DE UNA ALÍCUOTA DE 1 ML DE SEMILLAS DE SUSPENSIÓN | 39 |

1. INTRODUCCIÓN

Por ser Costa Rica un país tropical presenta un gran número de especies vegetales endémicas. Dentro de esta riqueza biológica, se encuentra la familia de las orquídeas, la cual incluye un gran número de géneros. En nuestro país, entre los géneros nacionales más comunes se encuentran el *Barkeria*, *Brassia*, *Catasetum*, *Cattleya*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Oncidium* y *Trichopilia*. El género *Cattleya*, es sin embargo, el más representativo, ya que es muy abundante y también tiene importancia cultural al ser la especie *Cattleya skinneri* Var. Bateman catalogada como la flor nacional.

Las orquídeas del género *Cattleya* presentan una alta demanda por parte de los coleccionistas de estas flores. Cada vez se tienen menos individuos en forma silvestre, debido a las constantes extracciones. Sin embargo, la depredación no es la única causa que pone en peligro a estas especies, la destrucción constante bosque tropical, provoca una disminución en las poblaciones de estas especies, lo que puede originar problemas relacionados con la erosión genética.

Por tal razón y por el aumento en los últimos años del comercio de estas especies, se hace necesario la producción de estas plantas en forma masiva o industrial. Esto con el fin de ofrecer una mayor cantidad y variedad de estas plantas a los interesados, sin necesidad de extraerlas de los bosques y al mismo tiempo, tratar de llevar individuos a su ambiente natural.

Sin embargo, todo proceso industrial involucra costos que afectan considerablemente el valor del producto deseado. La carencia del endospermo en las semillas de orquídea, hace necesario el suministro de nutrientes de una fuente externa. La siembra de semillas en medios de cultivo estériles es un método que se utiliza para la producción de orquídeas a gran escala. Para preparar estos medios de cultivo, son utilizados componentes químicos de alta pureza. Estos reactivos presentan un precio muy elevado en el mercado, lo que al final del proceso eleva el valor de las plantas.

Los medios de cultivo producidos a partir de componentes naturales se presentan como una alternativa para disminuir el valor agregado de las plantas. Esto debido a que su costo es mínimo si se compara con el costo de los medios de cultivo preparados con reactivos químicos, los cuales deben ser importados, operación que puede demandar de 30 a 60 días.

Componentes naturales como jugos de coco, tomate y banano; extractos de papa, tiquisque y yuca, hasta productos derivados del pescado, han sido utilizados para germinar diferentes semillas de orquídea, esto debido a su bajo costo y buenos resultados.

Además la facilidad con que se pueden conseguir, es un factor muy importante a la hora de utilizar estos componentes naturales, ya que no se debe acudir a empresas comerciales encargadas de importar y distribuir dichos reactivos en el país.

Con la utilización de medios de cultivo naturales, se espera obtener un determinado número de plantas a un precio rentable. Lo anterior resulta atractivo para aquellas empresas que se encuentran en etapa de crecimiento, donde los altos costos son uno de los principales obstáculos que se deben superar. Sumado a esto,

los consumidores también se verán beneficiados al poder adquirir plantas para sus colecciones a precios más cómodos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Desarrollar y comparar diferentes medios de cultivo naturales de bajo costo, para determinar su capacidad de inducir la germinación de semillas en distintas especies de orquídeas nacionales.

2.2. Objetivos Específicos

- Desarrollar y determinar el costo de diferentes medios de cultivo naturales para la germinación de semillas de orquídeas nacionales.
- Establecer el número de semillas germinadas de orquídea en cada medio de cultivo natural probado, para determinar su capacidad germinativa.
- Realizar una comparación de los medios de cultivo naturales para determinar cuales son los más rentables en cuanto a costo y germinación de las semillas de orquídea.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

La familia de las orquídeas es una de las que presenta mayor número de especies, de 25.000 a 35.000, logrando adaptarse a casi cualquier ecosistema del planeta. Hasta 1992 en nuestro país se tenían registradas entre 1.200 a 1.400 especies distribuidas en 181 géneros (Snyder, 1991; Sequeira, s.f.; Rivera y Sanabria, 1992).

3.1. Características de la familia Orchidaceae

Hierbas terrestres epífitas o saprófitas con rizomas o tubérculos y tallos aéreos que son los pseudobulbos y hojas alternas a veces solitarias o reducidas. Flores zigomorfas, hermafroditas con periantio biseriado. Los 3 sépalos coloreados, los bipétalos 3 piezas internas de forma diferente, 2 laterales semejantes entre sí y uno inferior modificado que es el labelo. Androceo reducido a un polinio; estambres unidos al estilo formando una columna llamada ginostegio. Ovario ínfero, tricarpelar, locular, fruto una cápsula, inflorescencias racemosas (Montiel, 1991).

3.2. Características del género *Cattleya*

3.2.1. Clasificación Taxonómica

| | |
|------------|----------------|
| Reino | Plantae |
| División | Anthophyta |
| Orden | Archidales |
| Familia | Orchidaceae |
| Subfamilia | Epidendroideae |
| Tribu | Epidendreae |
| Subtribu | Leliinae. |

3.2.2. Descripción botánica

Son plantas epífitas, perennes, con rizoma corto cubierto por brácteas apegaminadas y caducas. Raíces cilíndricas, verdes al inicio formando un velamen de varias capas, grisáceo o blanco verdoso en la madurez. Los tallos están formando pseudobulbos redondeados, cilíndricos o fusiformes, cubiertos por brácteas papiráceas basales y caducas. Presentan de una a dos hojas en el ápice del pseudobulbo, lanceoladas o elípticas, obtusas, coriáceas o carnosas, lisas, sésiles o con venación conduplicada. Inflorescencia terminal, racemosa, subtendida por una bráctea espatácea, generalmente con pocas flores, grandes y llamativas, resupinadas. El ovario es pedicelado y cilíndrico. Los sépalos son iguales, libres, patentes o ligeramente reflexos. Los pétalos son generalmente parecidos a los sépalos aunque un poco más anchos. Además presentan un labelo sésil, que puede ser simple o trilobulado y estar libre o ligeramente adnato a la base de la columna. Los lóbulos laterales envuelven la columna. La columna es de una consistencia fuerte, su forma varían entre cilíndrica o subclaviforme y estar ligeramente arqueada, terminada en tres dientes. Presentan una antera terminal, incumbente, operculada de dos celdas y cada una de ellas divididas por un septo longitudinal. Presentan además cuatro polinios céreos, de una forma elíptica, se encuentran ubicados paralelamente y ligeramente comprimidos, con caudículas prominentes, estigma entero (Rodríguez et al, 1984; Asociación Costarricense de Orquideología (A.C.O.), 1995).

3.2.3 Distribución Geográfica

Las orquídeas del género *Cattleya* se distribuyen a lo largo de toda América Central, pero no es sino en Guatemala y Costa Rica donde más abunda y se les aprecia.

En nuestro país, se pueden encontrar en ambientes de clima húmedo y tórrido a caliente y solamente en algunos casos se logra encontrar a un representante de este género a una altura mayor de 1000 metros sobre el nivel del mar (A.C.O., 1973).

En Costa Rica, el género *Cattleya* goza de gran popularidad entre los coleccionistas no sólo porque se puede encontrar en la mayor parte del territorio nacional, desde la zona de Guanacaste hasta la zona sur, sino que también es de importancia cultural ya que la especie *Cattleya skinneri*, perteneciente a este género es catalogada como flor nacional (A.C.O., 1973).

La afición de los costarricenses por la “Guaria morada” (*Cattleya skinneri* Var. Bateman) es indiscutible, ya que es la orquídea más sembrada en el país. Corresponde a la forma normal y más abundante de la especie, con tallos con dos hojas y racimos de flores lilas (morada). Tiene el labelo enrollado a manera de corneta, con un borde delantero de color lila muy intenso, seguido de una garganta blanca con un tinte amarillento y de una mancha morada en el fondo (A.C.O., 1995; Imes, 1997).

Sin embargo, también se debe tomar en cuenta su “albino” la Guaria Blanca (*Cattleya skinneri* Var. Alba). Ésta es idéntica a la Guaria Morada, pero con las flores blancas, con solo una mancha amarillenta. Valorada debido a que es muy escasa (por haber sido muy buscada por los coleccionistas y por aparecer sólo cuando la herencia de albinismo la recibe de ambos progenitores), a su belleza y a los diferentes híbridos que se pueden lograr con ellas (Hetherington, 1985; A.C.O., 1995).

Un poco menos importante para los coleccionistas es la *Cattleya aurantiaca*. Evidencia de esto es que existen pocas plantas de esta especie en colecciones nacionales. Es una *Cattleya* bifoliada, al igual que las dos anteriores, con flores vistosas de color naranja. Son las más pequeñas del género *Cattleya* (Smith, 1984; A.C.O., 1995).

3.3. Cultivo de orquídeas

La importancia del cultivo de las orquídeas radica principalmente en lo comercial. La belleza de estas flores ha hecho que en los últimos cuarenta años, el comercio mundial de estas plantas halla aumentado considerablemente. Esta situación ha generando importantes ingresos en las compañías que se especializan en la producción y venta de estas plantas (Sequeira, s.f.).

Sin embargo el cultivo de orquídeas también contribuye con la conservación de especies que se encuentran en vías de extinción. La destrucción del hábitat natural de las orquídeas en los bosques tropicales, debido a la agricultura, la ganadería y a la tala indiscriminada de árboles, sumado a la extracción de especies raras de los bosques para su comercialización; está ocasionando una erosión genética muy seria que pone en peligro a muchas especies de orquídeas endémicas. Sumado a todo esto, las reservas nacionales, que constituyen un 26% del territorio nacional (12 890 Km²), que en teoría deberían ser protegidas de la deforestación y el saqueo; no pueden ser bien atendidas ya que la Dirección General Forestal emplea pocos guardas, los cuales deben de patrullar territorios muy grandes (Dunsteville, 1985; Snyder, 1991).

En los últimos años, las técnicas de cultivo de tejidos han contribuido en la conservación de las especies de orquídeas.

Por esta vía se obtienen un gran número de plantas, que se encuentran libres de enfermedades y virus; además por fusión de protoplastos, se pueden generar híbridos que lleguen a enriquecer el acervo genético de las especies que sufren de una alta deriva genética. Como por ejemplo, un estudio realizados en un complejo de 70.000 híbridos, reveló que solamente contienen el genoma de cinco géneros (Price y Earle, 1984; Zettler et al, 1987; Elliott et al, 1987).

Los principales esfuerzos en la conservación de orquídeas se realizan en zonas templadas del mundo, mientras que la mayor diversidad de estas especies se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, ya que los países que se ubican a esas latitudes tienen los recursos necesarios para tal actividad (Muñoz, 1998).

En Costa Rica tales esfuerzos de conservación se llevan a cabo por universidades estatales, instituciones gubernamentales y en los últimos años por reservas biológicas privadas. Todos ellos trabajan para rescatar estas especies vegetales.

El Instituto Nacional de Aprendizaje (I.N.A.), en su Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, estableció el proyecto de Biotecnología producción – capacitación que tiene como objetivo la reproducción masiva de orquídeas nacionales e híbridos, las cuales se venden a personas que poseen pequeñas empresas encargadas en la comercialización de estas plantas. Pero no sólo de esta manera el I.N.A. contribuye con la conservación de estas especies. En esta institución se multiplican un número considerable de especies de orquídea en vías de extinción, que serán ubicadas en su hábitat natural dentro de los Parques Nacionales.

3.4. Reproducción comercial

3.4.1 Reproducción vegetativa tradicional

Para reproducir orquídeas en el ámbito comercial, se pueden utilizar técnicas de campo. Una de estas técnicas consiste en cortar la planta adulta en puntos apropiados y luego sembrar cada parte por separado. También se puede optar por remover las pequeñas plantas que se producen espontáneamente en los pseudobulbos o en los nudos de las varas florales. Sin embargo estas metodologías vegetativas no logran generar un gran número de plantas en un período de tiempo corto. Además, la utilización de estas técnicas de propagación, puede acarrear una serie de problemas vinculados con la transmisión de enfermedades de alto riesgo para las plantas, que puede terminar en su muerte (Sequeira, s.f.; Batchelor, 1993).

3.4.2 Reproducción por semillas

Un sistema comercial muy utilizado para la producción de orquídeas es la siembra de las semillas. Esta metodología permite obtener un gran número de plantas ya que una sola cápsula puede contener de 1.500 a 3 millones de semillas. No obstante esta técnica presenta un problema relacionado con las características propias de la semilla de orquídea.

Las semillas de las orquídeas son las más pequeñas del reino vegetal (de 1 a 2 mm de longitud y de 0,5 a 1 mm de ancho). Éstas no alcanzan un nivel de complejidad alto, ya que solamente presentan un embrión cubierto por una testa (cubierta seminal), la testa está formada por un tejido muerto y el 96% de éste está compuesto por aire (Pierik, 1990).

El embrión presenta células con una estructura simple, isodiamétricas y escasamente diferenciadas. Prácticamente contiene endospermo muchas monocotiledóneas, y la existencia de cotiledones es poco probable. Dentro del embrión se encuentra un punto de crecimiento potencial que se ubica en el extremo distal, sin embargo no es identificable en estado de semilla (Pierik, 1990; Rivera y Sanabria, 1992; García et al, 1993; Palma, 1993).

La evolución ha determinado que las semillas de orquídea pueden germinar en forma natural, siempre y cuando establezcan una relación simbiótica con micorrizas que le proporcionen los nutrientes necesarios para que se dé este proceso.

Los hongos más importantes que tiene relación simbiótica con orquídeas son del género *Rhizoctonia*. Estas micorrizas penetran en las células de la semilla y promueven el crecimiento del embrión, ya que las exoenzimas que el hongo produce, hacen que compuestos orgánicos del medio se fragmenten en compuestos más simples como azúcares y aminoácidos como la glutamina y el ácido glutámico, los cuales son absorbidos más fácilmente por el hongo y a través de él por la planta. El éxito de este tipo de simbiosis depende del balance que se establece entre la patogenicidad del hongo y la resistencia de la planta; un hongo muy fuerte matará a la plántula y por el contrario, si la planta es muy resistente al hongo no se producirá la infección, por lo que la planta sucumbirá al no poder contar con los compuestos orgánicos básicos, provenientes del hongo, para su desarrollo. Debe de haber tolerancia mutua para una simbiosis exitosa (Jiménez y Han Jan, 1994).

3.4.3. Procesos de germinación de la semilla

El proceso de germinación de una semilla de orquídea conlleva una serie de eventos que a continuación se describen. El embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen. Inmediatamente se inicia la división celular, rompiendo el embrión la cubierta seminal. A continuación se forma una estructura llamada protocormo de germinación, donde puede distinguirse el meristemo del vástago o caulinar. Tan pronto como se inicia la diferenciación de órganos (meristemo caulinar en un lado y rizoides en el opuesto), comienza un período de crecimiento intenso. Si el protocormo se expone a la luz, adquiere un color verde y al mismo tiempo se desarrollan las hojas. Como resultado de la formación de clorofila, la plántula se transforma parcialmente autrótofa. Al poco tiempo aparecen las primeras raíces verdaderas que se forman endógenamente; el protocormo y los rizoides (pelos radicales) pierden su función nutritiva y desaparecen. Se ha determinado que las semillas de orquídeas epífitas por lo general germinan más rápidamente y el hongo crece en el exterior. En contraste, las orquídeas terrestres germinan lentamente y el hongo penetra en el protocormo (Pierik, 1990).

3.5. Germinación *in vitro*

En 1922 Knudson demostró que las semillas de orquídea podían germinar en ausencia del hongo, cultivándolas *in vitro* en un medio que contuviera minerales y azúcares. Knudson logró obtener buenos resultados germinando semillas de *Cattleya*, *Epidendrum*, *Laelia* y otras orquídeas. Sin embargo, varios autores han demostrado que no siempre es posible que una especie de orquídea determinada logre germinar y se desarrolle en un medio de cultivo dado.

Por tal motivo un gran número de autores ha propuesto una serie de medios de cultivo para géneros de orquídea específicos. Dentro de los medios más importantes están: Knudson B (1922); Knudson C (1946); la Garde (1929); Raghavan & Torres (1964); Yates & Curtis (1949); Murashige y Skoog (1962); Norstog (1972); entre otros (Ballard, 1987; George et al, 1987; Pierik, 1990; García et al, 1993).

Estas técnicas de cultivo de tejidos para la germinación de semillas de orquídea, han revolucionado la producción y la comercialización de estas especies. Son más frecuentes los grandes laboratorios comerciales capaces de generar una gran cantidad de plantas de orquídea a partir de semilla, probando y utilizando diversos medios de cultivo y combinando técnicas novedosas con metodologías tradicionales en los invernaderos.

El mejoramiento constante de los medio de cultivo, la utilización de tratamientos que aceleren la floración de las plantas e invernaderos con condiciones climáticas más controladas son sólo algunas de estas técnicas utilizadas en la actualidad con el fin de incrementar la producción y disminuir los costos (Vandermeulen, 1985; Arthaukti, 1992; Aldelberg y Darling, 1993; Schudel, 1993).

A pesar del éxito que estos medios de cultivo presentan en la germinación de semillas de orquídea, para poder prepararlos se requieren reactivos químicos en estado puro, los cuales son de elevado valor económico y deben ser importados. Lo anterior desde el punto de vista comercial es desfavorable ya que aumenta los costos y el tiempo de espera en la llegada de los reactivos origina atrasos en la producción.

La utilización de mezclas complejas que incluyan compuestos naturales, han logrado reemplazar en algún grado, a los medios de cultivo químicos, generando resultados sorprendentes.

El bajo costo y la disponibilidad de los componentes de estos medio así como su fácil preparación hacen de éstos, una alternativa viable para la producción de orquídeas a escala comercial. Además, los reactivos que se utilizan en la elaboración de los medios químicos, pueden originar alteraciones genéticas dependiendo de las concentraciones que de éstos se utilicen. Mientras que del cultivo *in vitro* empleando medios naturales no se tienen informes sobre la producción de mutaciones (García et al, 1993; Schudel, 1993).

Mezclas que incluyan homogeneizado de banano, agua de coco, peptona, triptona, levadura de fermentación, hidrolizado de caseína, salep, jugo de piña, jugo de tomate y extracto de papa, ha sido descritas por autores como Arditti en 1982. No obstante medios de cultivo más simples ha sido reportados por varios autores (Pierik, 1990).

García (1996), informó que se obtuvo un porcentaje de germinación del 33,75% de semillas de *Cattleya skinneri* Var. Bateman sembradas en un medio de cultivo preparado a partir de yuca y de un 31,83% en un medio que contenía yema de trigo. Este mismo autor utilizó un medio de tiquisque obteniendo un porcentaje de germinación muy bajo. Medios de cultivos elaborados a partir de zanahoria, papa y banano han sido probados generando porcentajes de germinación inferiores al 6% (García et al, 1993).

Jimenez y Han Jan (1994), comunican la utilización de medios de cultivo que combinan tanto los reactivos químicos como las vitaminas de Gamborg y Hyponex así como componentes naturales como agua de coco, banano y manzana.

A raíz del incremento en la siembra *in vitro* de *Cattleya* con fines comerciales y del elevado costo de los medios de cultivo convencionales, se hace necesario utilizar varios medios de cultivo, de bajo precio, para semillas de *Cattleya*, y que logren buenos resultados en la germinación; con el fin de disminuir los gastos por parte de las empresas. Esta necesidad originó que se llevara a cabo este ensayo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto Nacional de Aprendizaje (I.N.A.), ubicado en la Uruca, San José.

4.1. Preparación de los medios de cultivo

Se prepararon 4 medios de cultivo diferentes, de los cuales tres presentaron un compuesto orgánico como componente principal. El primer medio se elaboró a partir de yuca (*Manihot esculenta*), para efectos del presente trabajo se denominará como medio Y. También se preparó un medio cuyo componente principal fue tomate (*Lycopersicon esculentum*), que se denominará como medio de cultivo T. Un tercer medio de cultivo se preparó con germen de trigo, este medio se denominará como medio de cultivo GT. Por último, se elaboró un medio Knudson C (1946) que se nombrará como medio K.

Para la preparación del medio Y, se siguió la metodología empleada por García (1996). Brevemente, se licuaron 250 gL⁻¹ de pulpa de yuca cocida hasta lograr una especie de puré y se agregaron 20 gL⁻¹ de sacarosa. En este punto, el pH se ajustó en 5,5. Una modificación que se realizó, fue la sustitución de la yema de trigo cruda por 3 gL⁻¹ de Phyta-Gel[□], como agente gelificante.

En la elaboración del medio T, se licuaron y se colaron 4 tomates maduros (aproximadamente 500 g), hasta que se obtuvieron 400 ml de jugo de tomate. A éste se le agregaron 20 gL⁻¹ de sacarosa, 1 gL⁻¹ de D - glucosa, luego se aforó a un litro. El pH se llevó a 5,7 y en este momento se agregaron 3 gL⁻¹ de Phyta-Gel[□] como agente gelificante.

Se utilizó germen de trigo comercial Bioland[□] para la preparación del medio GT. Para esto se utilizaron 100 gL⁻¹ de este germen de trigo, 20 gL⁻¹ de sacarosa y luego de ajustar el pH en 5,5 se utilizaron 3 gL⁻¹ de Phyta-Gel[□].

Como testigo se preparó el medio K (Anexo 1) utilizando 3 gL⁻¹ de Phyta-Gel[□] una vez que el pH se encontraba estabilizado en 5,7.

Se dispensaron 50 ml de cada medio de cultivo en frascos de cultivo (repeticiones) con capacidad para 500 ml. Se realizaron 20 repeticiones por cada tratamiento (tipo de medio de cultivo). Por cada tipo de *Cattleya* se realizaron 4 tratamientos

4.2. Estimación del valor económico de los medio de cultivo

Para estimar el valor de los medio de cultivo, se sumó el valor de cada uno de los componentes de los mismo, con el fin de obtener su costo total (Anexo 2).

4.3. Desinfección de las cápsulas

Cápsulas de *Cattleya skinneri* Var. Bateman, *C skinneri* Var. Alba y *C. aurantiaca* se lavaron con agua y jabón. Seguidamente se colocaron en alcohol de 96° y se trasladaron a condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar. Una vez ahí, se flameó la superficie de las cápsulas con alcohol de 96°, esta operación se realizó en dos ocasiones para cada cápsula.

4.4. Siembra de semillas

Para esto se realizó un corte longitudinal a cada cápsula y las semillas se vertieron en 250 ml de agua estéril.

Se sumergieron todas las semillas en el agua estéril, se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión de semillas y se agregó a cada frasco de cultivo. Esta operación se alternó con la agitación de las semillas que se encontraban sedimentadas.

Las semillas se colocaron a la luz directa con una intensidad lumínica de 2000 lux, un fotoperíodo de 16 horas y una temperatura promedio de 23°C, durante 12 semanas.

4.5. Estado de desarrollo de las semillas

El estado de desarrollo de las semillas se determinó mediante la observación de las mismas al estereoscopio. Se utilizó una solución de azul de metileno con la cual se tiñeron las semillas para lograr una mejor apreciación del embrión.

4.6. Estimación del número de semillas germinadas en los medios de cultivo

Finalizado el período de tiempo de germinación, las semillas se extrajeron para realizar los distintos análisis de germinación.

El número de semillas germinadas se determinó contando el número de protocormos y plántulas de un tamaño mayor a los 3 mm, que se encontraban dentro de los medios de cultivo. La suma de las plántulas y de los protocormos obtenidos en cada repetición generó el número total de semillas germinadas. El conteo se realizó en una muestra de 13 repeticiones por cada tratamiento, obteniendo de cada uno un promedio de plántulas, protocormos y semillas germinadas.

4.7. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza y pruebas de Tukey para la comparación de medias, para lo cual se utilizó el programa Statistix [□] para Windows [□]

4.8. Determinación del valor de las semillas germinadas, protocormos y plántulas obtenidas en cada medio de cultivo.

El costo de las semillas germinadas se determinó mediante el cociente del valor de 50 ml de cada medio de cultivo, entre el número promedio de semillas germinadas en el medio de cultivo respectivo. La estimación del costo de los protocormos y las plántulas se realizó de forma antes descrita, solamente que se varió el número de semillas germinadas por el número de protocormos o de plántulas según fuera el caso

En este cálculo se realizó estrictamente a partir del valor de los medios de cultivo. No se incluyó el valor de los desinfectantes, de la mano de obra (tiempo empleado por los operarios), ni gastos fijos de laboratorio como electricidad y agua.

5. RESULTADOS

5.1. Medios de cultivo

5.1.1. Características físicas de los medios de cultivo

La coloración de los medios de cultivo varió dependiendo del componente principal que los formaba. Por lo tanto, todos los medios presentaron una coloración diferente por la cual se diferenciaban uno del otro con facilidad.

El medio GT, presentó una coloración café característica del germen de trigo. Además, en algunas ocasiones se formó una especie de nata blanca que se confundía con algún tipo de contaminación bacteriana, cuando en realidad, era parte del medio.

Por su parte, el medio T cambió de un color rojo, característico del tomate, a un color naranja después del autoclavado. A pesar de que este medio se filtró, siempre se observaron algunas fibras de color verde, las cuales se podían tomar por semillas germinadas.

El medio de cultivo Y adquirió una coloración blanca. Este color resultó ser bastante beneficioso para detectar contaminación por hongos, ya que ésta contrastaba con el medio. La contaminación bacteriana resultó más difícil de detectar.

El medio K no presentó ningún tipo de coloración. Esta característica permitió que junto con el medio Y, se pudiera detectar la germinación de las semillas desde el momento en que ésta se llevó a cabo.

Lo anterior fue prácticamente imposible en el medios GT y T, debido a su coloración oscura, donde se detectó la germinación hasta cuando los protocormos se encontraron bastante desarrollados.

Los medios de cultivo elaborados presentaron diferentes consistencias a la hora de solidificarse. El medio de cultivo GT, presentó la mayor solidificación, todo lo contrario ocurrió con el medio T, éste adquirió una consistencia bastante líquida a la hora de realizar la siembra de las semillas. Por su parte, la solidificación de los medios K y Y fueron muy parecidas. Ésta se caracterizo principalmente, por ubicarse en un punto intermedio entre la solidificación del medio GT y la del medio T. Sin embargo cabe destacar que la solidificación del medio Y no fue tan homogénea como la del medio K, es decir, en algunos casos tendió a perder su consistencia sólida.

5.1.2. Valor económico

En general, los valores de los medios de cultivo empleados fueron bajos. No obstante, existieron diferencias en el precio de los mismos. En la Tabla 5.1.2., se muestra como el medio T fue el más caro, ya que 50 ml de este medio tuvieron un valor de ¢21,3. Seguidamente se ubicó el medio K, cuyo costo fue de ¢13,4. Más baratos y con un precio muy similar se encontraron los medios Y y GT.

Tabla 5.1.2. **Valor económico de cuatro diferentes medios de cultivo, utilizados para la germinación de semillas de orquídea.**

| Medios de cultivo | 1 litro | | 50 ml | |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | Colones (¢) | Dólares (\$)* | Colones (¢) | Dólares (\$)* |
| K | 268,50 | 0,87 | 13,40 | 0,04 |
| Y | 197,80 | 0,64 | 9,90 | 0,03 |
| T | 426,70 | 1,37 | 21,30 | 0,07 |
| GT | 183,00 | 0,59 | 9,15 | 0,03 |

*1\$ = ¢310 Tipo de cambio del 28/07/2000

Microsoft Word

5.2. Estado de las semillas

La observación al estereoscopio de las tres clases de semillas de *Cattleya*, demostró que no en todos los casos éstas presentaban embrión. Sin embargo, las semillas que presentaban embrión eran más frecuentes que las semillas en las cuales el embrión no se encontraba (Figura 5.2.).

5.3. Germinación de las semillas

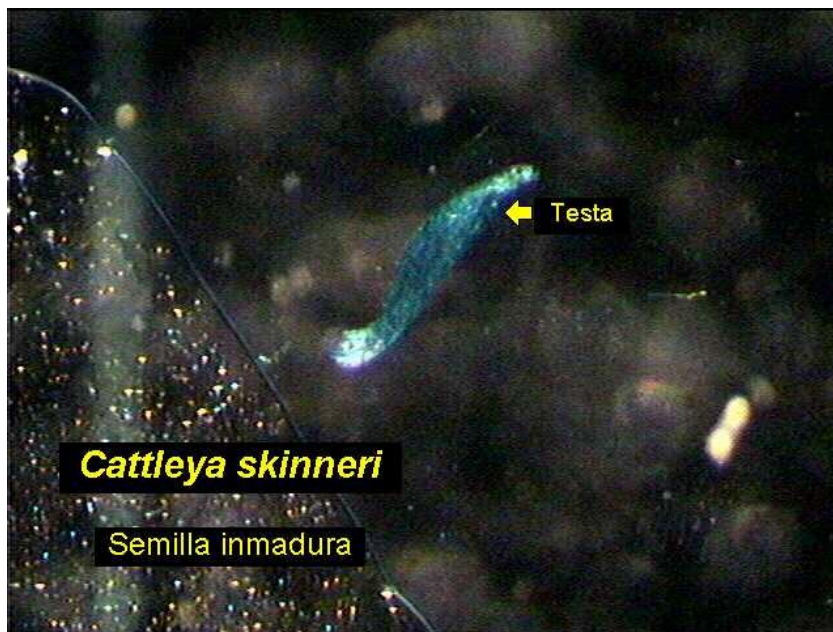
La germinación de las semillas se manifestó en la presencia de pequeños puntos de color verde en los medios de cultivo. Como resultado de ésta se obtuvo la formación de protocormos de germinación (Figura 5.3.). Aproximadamente a las 4 semanas, estas estructuras se desarrollaron en plántulas con una o dos hojas, con un tamaño que promediaba entre los 3 y los 5 mm. En muchos casos los protocormos obtenidos se desarrollaron muy lentamente, durando más de 8 semanas para tomar una apariencia de plántula.

5.4. Tiempo de duración de la germinación

El tiempo que tardaron las semillas en germinar varió de acuerdo a la especie. Las semillas de *Cattleya aurantiaca* fueron las primeras en dar indicios de germinación. Tiempo después se observó la germinación de las semillas de *Cattleya skinneri* Var. Alba y por último las de la variedad Bateman.



A



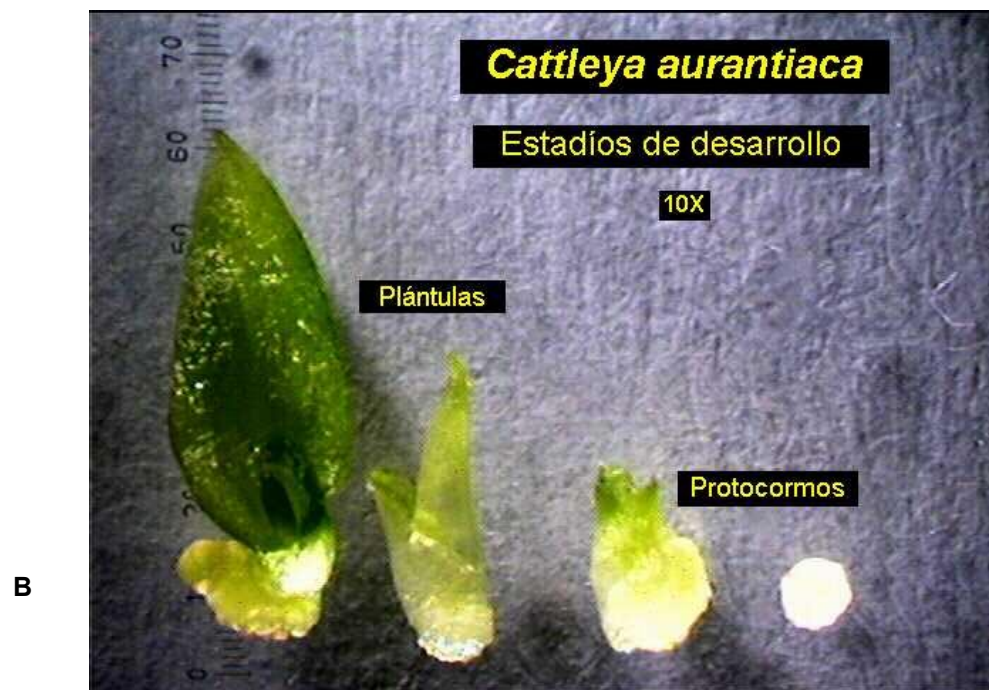
B

Leica Capture

FIGURA. 5.2. Semillas de *Cattleya skinneri*. A: Semillas de *Cattleya skinneri* Var. Alba, con embrión. B: Semilla de *Cattleya skinneri* Var. Bateman, sin embrión.(40X)



A



B

Leica
Capture

Figura 5.3. Estructuras de *Cattleya aurantiaca*. A: Protocormo de germinación (40X). B: Comparación de los diferentes estadios de desarrollo. (10X)

La mayoría de las semillas de *Cattleya aurantiaca* comenzaron a germinar aproximadamente a los 23 días después de la siembra, pero no alcanzó su máximo sino hasta los 41 días. El medio de cultivo que generó una respuesta más rápida de germinación fue el Y, ya que a los 23 días se presentaron puntos de color verde, mientras que en el medio K hubo indicios de germinación hasta los 26 días. En un segundo plano quedaron los medios GT y T, debido a que presentaron respuestas a los 33 y 34 días respectivamente.

Por su parte, las semillas de las dos variedades de *Cattleya skinneri* germinaron a los 50 días para la variedad Alba y 70 días para la variedad Bateman.

5.5. Cantidad de semillas germinadas

La cantidad de semillas germinadas en cada medio de cultivo varió con la especie. La especie *C. aurantiaca* fue en la que germinó un mayor número de semillas, además, fue la única que logró germinar en los cuatro medios probados. Las dos variedades de *C. skinneri* solamente lograron germinar en el medio K, el cual era el testigo. Lo anterior se pone de manifiesto en la Tabla 5.5., donde se presenta el número total de semillas germinadas por especie y se aprecia la diferencia que se presentó entre la especie *Cattleya aurantiaca* y las variedades de *C. skinneri*

Tabla 5.5. **Total de semillas germinadas de *Cattleya aurantiaca*, *C. skinneri* Var. Bateman y *C. skinneri* Var. Alba, en 4 diferentes medios de cultivo utilizados.**

| Especie | Número de semillas germinadas |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Cattleya aurantiaca</i> | 3960 |
| <i>Cattleya skinneri</i> Var. Bateman | 15 |
| <i>Cattleya skinneri</i> Var. Alba | 14 |

Microsoft Word

5.5.1. *Cattleya aurantiaca*

La mejor respuesta de germinación en esta especie se obtuvo en el medio Y, con un promedio de 149,03 semillas germinadas por cada alícuota de 1 ml de semillas en suspensión. Con un promedio de 133,27 se ubicó el medio K, con 69,05 el medio T y con un promedio mucho más bajo que el resto (8,55) se encontró el medio GT (Figura 5.5.1.a).

(Anexo 3)

No se encontraron diferencias significativas en el número de semillas germinadas entre los medios Y, K y T para una confianza del 5%, al realizar la prueba de Tukey para la comparación de medias. Sin embargo los medios de cultivo Y y K, si presentaron diferencias significativas con el medio GT, para una confianza del 5%

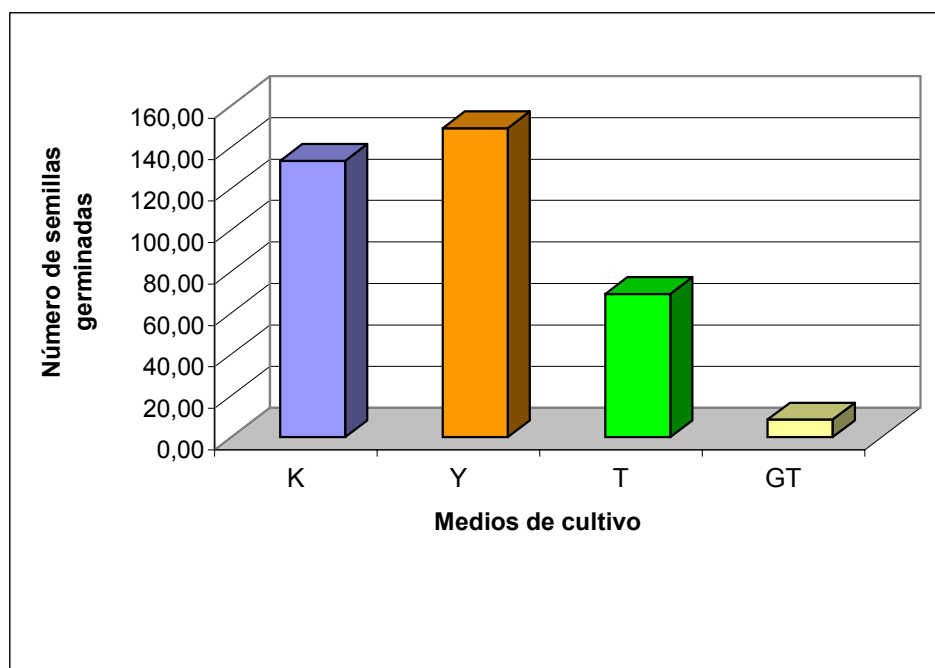


Figura 5.5.1.a Número promedio de semillas germinadas de *Cattleya aurantiaca*, 4 diferentes medios de cultivo a partir de una alícuota de 1ml de semillas de suspensión

No obstante, en la generación de plántulas y protocormos se observó una diferencia importante entre los medios de cultivo. Esta diferencia radica en que a pesar de que el medio Y generó una mayor germinación de semillas con respecto al medio K, este último indujo a una formación de plántulas mayor que el resto de los medios de cultivo.

Estas diferencias en el promedio de plántulas obtenidas en los diferentes medios de cultivo, a partir de una alícuota de 1 ml de una suspensión de semillas, se aprecian en la Tabla 5.5.1., donde se resalta la mínima o casi ninguna generación de plántulas por parte de los medios T y GT. Es importante recalcar que existieron diferencias significativas en la generación de plántulas, para una confianza del 5%, entre los medios K y Y con respecto a los medios T y GT (Anexo 4).

Tabla 5.5.1. **Número promedio de plántulas de *Cattleya aurantiaca* obtenidas en diferentes medios de cultivo, a partir de 1 ml de semillas en suspensión.**

| Medios de cultivo | Número promedio de plántulas |
|-------------------|------------------------------|
| K | 123,27 |
| Y | 114,36 |
| T | 1,45 |
| GT | 0,27 |

Microsoft Word

Sin embargo, el medio T generó el mayor número de protocormos de germinación en *Cattleya aurantiaca*, si se compara con los otros medios de cultivo empleados. En el medio K se produjeron en promedio 10 protocormos, superando apenas el 8,27 que se obtuvo en el medio GT.

Con un mayor promedio de protocormos producidos por alícuota de 1 ml de una suspensión de semillas, se encontraron los medios de cultivo T (67,64 protocormos por ml de suspensión) y el Y (34,23 protocormos por ml de suspensión de semillas). Lo anterior se pone de manifiesto en la Figura 5.5.1.b.

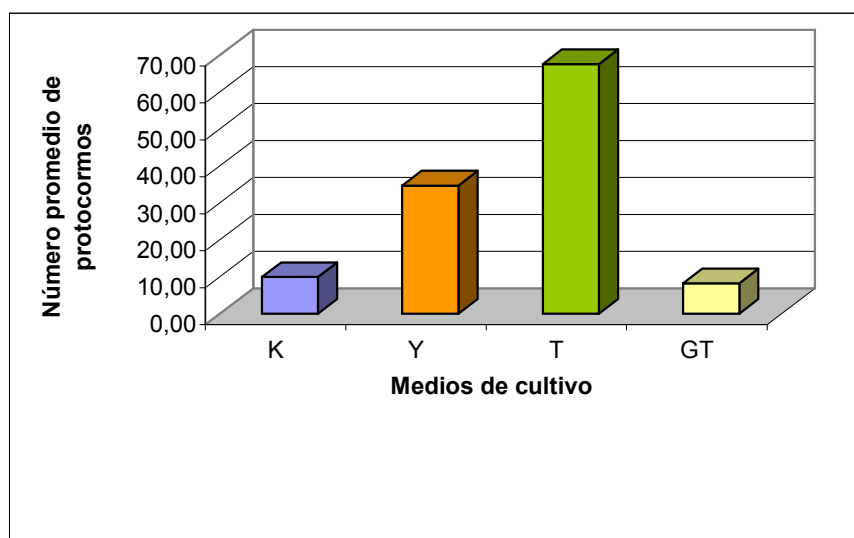


Figura 5.5.1.b. Número promedio de protocormos de *cattleya aurantiaca*, obtenidos en 4 diferentes medios de cultivo, a partir de una alícuota de 1 ml de semillas de suspensión

Al realizar la prueba de Tukey para la comparación de medias, se estableció que los medios de cultivo T y Y no presentaron diferencias significativas, en el promedio de protocormo obtenidos, para una confianza del 5%. (Anexo 5). Sin embargo si se establecieron diferencias significativas entre el medio de cultivo T y los medio GT y K para una confianza del 5%

5.5.2. *Cattleya skinneri* Var. Bateman y *C. skinneri* Var. Alba

En estas dos variedades de *Cattleya skinneri*, la germinación fue mucho menor que la obtenida en *C. aurantiaca*. En ambas, los únicos resultados se dieron en el medio K.

En el resto de los medios, las semillas presentaron un aumento de volumen sin originar algún tipo de respuesta que se pudiera tomar por germinación y mucho menos por desarrollo.

La variedad Bateman generó un promedio de 1,36 semillas germinadas por cada ml de semillas en suspensión, de donde un 87% se presentaron como protocormos y sólo un 13% se desarrollaron en plántulas, hasta el momento de la evaluación.

Por su parte, la variedad Alba presentó un promedio de 1,27 semillas germinadas por cada 50 ml de medio, de las cuales aproximadamente el 100% se desarrollaron como protocormos.

En la Figura 5.5.2., se observa la ligera diferencia que se presentó entre la variedad Bateman y la variedad Alba, en la germinación de semillas

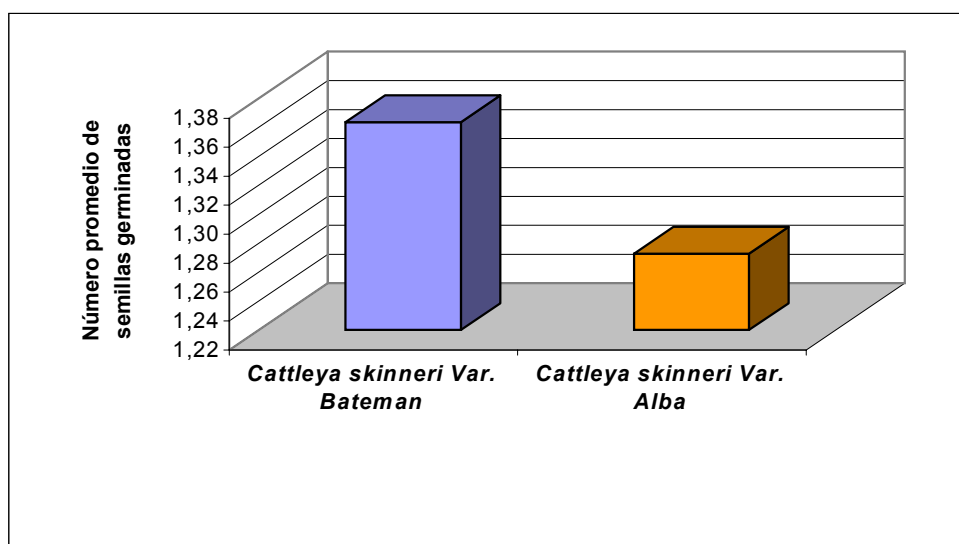


Figura 5.5.2. Número promedio de semillas germinadas de *Cattleya skinneri* Var. Bateman y *C. skinneri* Var. Alba obtenidas en un medio de cultivo Knudson C (1946), a partir de una alícuota de 1 ml de semillas de suspensión

5.6. Tiempo de duración de la germinación

El tiempo que tardaron las semillas en germinar varió de acuerdo a la especie. Las semillas de *Cattleya aurantiaca* fueron las primeras en dar indicios de germinación. Tiempo después se observó la germinación de las semillas de *Cattleya skinneri* Var. Alba y por último las de la variedad Bateman.

5.7. Valor económico de la germinación

De los tres tipos de *Cattleya* estudiadas, en la que se obtuvo un menor valor de la germinación fue en *C. aurantiaca*, seguida por *C. Skinneri* Bateman y por último la variedad Alba.

5.7.1. *Cattleya aurantiaca*

En esta especie, se obtuvieron diferencias importantes en el valor económico de las semillas germinadas en los cuatro diferentes medios de cultivo analizados.

El medio que disminuyó de una manera más significativa los costos germinación fue el Y, ya que una semilla de esta especie germinada en él, alcanzó un valor de ¢0,07. El medio de cultivo K se ubicó en un segundo puesto de economía, una semilla germinada en este medio tuvo un costo de ¢0,10. Seguido del medio K, se situó el medio T, ¢0,31 por semilla germinada. El mayor costo por semilla germinada se obtuvo en el medio GT, ya que cada semilla germinada alcanzó un valor de ¢1,08.

Al cuantificar el valor de las plántulas de esta especie obtenidas en los diferentes medios de cultivo, se observó que el comportamiento se mantuvo muy similar al observado en el valor de las semillas germinadas.

Las plántulas más baratas fueron aquellas que se obtuvieron en el medio Y, ya que una plántula obtenida en este medio alcanzó un valor de ¢0,09. Seguidamente se ubicó el medio de cultivo K, el valor de cada plántula fue de ¢0,11. El tercer puesto lo ocupó el medio T, donde cada plántula obtenida tuvo un valor de ¢14,64. Las plántulas obtenidas en el medio GT presentaron el costo más elevado, el aumento en su valor se considera bastante significativo, ya que cada plántula costó ¢33,73.

Por otra parte, los protocormos que presentaron un costo más bajo fueron aquellos que se obtuvieron en el medio Y, ¢0,29 por protocormo. Pero en este caso el segundo puesto lo ocupó el medio de cultivo T, ya que cada protocormo obtenido en él, presentó un valor de ¢0,31. En los medios GT y K, el valor de un protocormo aumentó considerablemente si se compara con uno obtenido en el medio Y. Para el medio GT, el costo fue de ¢1,11 por cada protocormo, mientras que para el medio K ¢1,34 por protocormo. Lo anterior se pone de manifiesto en la Tabla 5.6.1.

Tabla 5.6.1. Valor económico de un protocormo y de una plántula de *Cattleya aurantiaca* obtenidos en 4 diferentes medios de cultivo.

| Medios de cultivo | Valor de un protocormo | | Valor de una plántula | |
|-------------------|------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | Colones (¢) | Dólares (\$)* | Colones (¢) | Dólares (\$)* |
| K | 0,11 | 0,00032 | 1,34 | 0,004 |
| Y | 0,09 | 0,00026 | 0,29 | 0,001 |
| T | 14,64 | 0,0481 | 0,31 | 0,001 |
| GT | 33,73 | 0,11 | 1,11 | 0,004 |

*1\$ = ¢310 Tipo de cambio del 28/07/2000
Microsoft Word

5.8. Tiempo de duración de la germinación

El tiempo que tardaron las semillas en germinar varió de acuerdo a la especie. Las semillas de *Cattleya aurantiaca* fueron las primeras en dar indicios de germinación. Tiempo después se observó la germinación de las semillas de *Cattleya skinneri* Var. Alba y por último las de la variedad Bateman.

5.8.1. *Cattleya skinneri* Var. Bateman y *C. skinneri* Var. Alba

En estas variedades de *Cattleya skinneri*, el valor de cada semilla germinada fue bastante elevado, al compararlo con la especie *C. aurantiaca*.

Una semilla de *C skinneri* Var. Bateman germinada en el medio K presentó un costo de ¢9,83. Por otra parte, una plántula de esta variedad que se obtuvo en este mismo medio se valoró en ¢73,70; mientras que un protocormo alcanzó un valor de ¢11,34; esto representa una diferencia de ¢62,36, entre ambas estructuras, la cual es considerable.

Por otro lado, en la variedad Alba, cada semilla que se obtuvo llegó a alcanzar un valor de ¢10,53. En esta variedad no se obtuvieron plántulas desarrolladas, por lo cual el valor de los protocormos es exactamente igual al de la germinación de las semillas. Lo mencionado anteriormente se pone de manifiesto en la Tabla 5.6.2.

Tabla 5.6.2. Valor económico de un protocormo y de una plántula de *Cattleya skinneri* Var. Bateman y *Cattleya skinneri* Var. Alba, obtenidos en un medio de cultivo Knudson (1946).

| Variedades | Valor de un protocormo | | Valor de una plántula | |
|---------------------------------------|------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | Colones (¢) | Dólares (\$)* | Colones (¢) | Dólares (\$)* |
| <i>Cattleya skinneri</i> Var. Bateman | 11,34 | 0,04 | 73,70 | 0,24 |
| <i>Cattleya skinneri</i> Var. Alba | 10,53 | 0,03 | - | - |

*1\$ = ¢310 Tipo de cambio del 28/07/2000

Microsoft Word

6. DISCUSIÓN

6.1. Características físicas de los medios de cultivo

La incapacidad de poder detectar el inicio de la germinación de las semillas de orquídea, es una desventaja que se presentó con la utilización de los medios GT y T, esto debido a su consistencia viscosa, que no permitió observar a través de él. Lo anterior se establece ya que no se puede determinar anticipadamente a la formación de protocormos desarrollados, el éxito de cada siembra.

6.2. Valor económico de los medios de cultivo

La diferencia en el valor económico entre el medio más barato es decir el Y y el más caro, el T, para 50 ml, fue de ¢12,2. No obstante, el valor de estos medios de cultivo se ve afectado por los precios de los productos en los mercados nacionales e internacionales, la inflación y la oferta y la demanda.

El medio Knudson (1946) es menos susceptible al cambio de precio repentino ya que los reactivos químicos están valorados en dólares y su precio es constante a través del año. El medio GT, al ser un producto comercial es controlado por la inflación y las leyes que establecen el precio de los mismos, por lo que su precio aumenta constantemente.

Sin embargo, el medio Y y en mayor proporción el medio T, ven afectado sus precios por razones de oferta y demanda, al ser sus componentes principales productos agrícolas. Estos precios pueden sufrir descensos o aumentos repentinos, cuando los productos escasean o abundan en el mercado, dependiendo de la época del año.

Lo anterior se presenta como una desventaja de los medio formulados a partir de compuestos naturales. Esto se debe a que el valor de los mismos podría subir de un momento a otro elevando de esta manera los costos de producción, o bien se podrían conseguir en el mercado pero a precios elevados

6.3. Tiempo de duración de la germinación

6.3.1. *Cattleya aurantiaca*

La germinación tardía de las semillas de *Cattleya aurantiaca* en los medios de cultivo GT y T (33 y 34 días, respectivamente) con respecto a los medios Y y K (32 y 24 días), se relacionó principalmente con la consistencia de los mismos.

El medio de cultivo GT, como se mencionó anteriormente, presentó una solidificación bastante fuerte, por lo que posiblemente no se contó con agua disponible dentro del mismo, al ser ésta retenida por el gelificante. Esta deficiencia de agua, originó que el embrión no lograra absorber agua de una manera eficiente, por lo que la división celular se pudo ver afectada y por ende la duración de la germinación.

Por otra parte, el bajo nivel de solidificación del medio T, causó que las semillas no se depositaran sobre el medio, sino que, al presentar éste una consistencia bastante líquida, las semillas se hundieron en él. Esta situación se consideró perjudicial para la pronta germinación, ya que se pudo dar una deficiencia de oxígeno al no encontrarse este medio en agitación, lo cual generó muy posiblemente una disminución del metabolismo del embrión.

La respuesta más rápida de la germinación de las semillas de ésta especie en los medios K y Y, se debió muy probablemente por la buena solidificación que se obtuvo en estos medios. Al lograrse una solidificación intermedia, el gelificante no retuvo el agua por completo, por lo que fue absorbida por parte del embrión activando así la división celular. Además esta apropiada solidificación permitió que las semillas se ubicaran en la superficie de los medios, logrando así un adecuado intercambio de oxígeno.

6.3.2. *Cattleya skinneri* Var. Bateman y *C. skinneri* Var Alba

La diferencia en el tiempo de germinación observada entre las semillas de *Cattleya aurantiaca* y las variedades de *C. skinneri*, se vincula principalmente con el estado de desarrollo del embrión.

Mientras que en el presente ensayo las semillas de *Cattleya skinneri* Var. Alba y *Cattleya skinneri* Var. Bateman germinaron a los 50 y 70 días respectivamente, en un medio Knudson C (1946), García (1996), observó a los 15 días después de la siembra, la germinación de las semillas de *C. skinneri* Var. Bateman, en un medio de yuca. Este resultado obtenido por García sólo se puede comparar con el obtenido en la especie *C. aurantiaca*, donde a los 23 días se observó una respuesta por parte de las semillas sembradas en un medio de yuca.

Debido a que el material se obtuvo de fuentes externas al ensayo, no se logró tener un control sobre la edad de las cápsulas. Por tal motivo, se corrió el riesgo de trabajar con semillas no viables, o poco maduras, que tardaran mucho tiempo en activar su metabolismo a pesar de encontrar condiciones adecuadas para la germinación.

6.4. Cantidad de semillas germinadas

Se contaron como semillas germinadas solamente los protocormos y plántulas de una tamaño mayor a los 3 mm, debido a que esto permitió eliminar todas aquellas estructuras que se encontraban susceptibles a morir, o que debido a su lento crecimiento se podría incurrir en gastos de elaboración de medios y trasplante de plántulas. Estos gastos en un futuro aumentarían los costos de producción en lugar de disminuirlos.

La diferencia en el número de semillas germinadas en cada uno de los medios probados, se vinculó con la capacidad de éstos de satisfacer las necesidades hídricas y energéticas de los embriones; dejando en un segundo plano las necesidades nutricionales. Esto se debe a que en esta etapa de desarrollo, los requerimientos minerales de las semillas de orquídea no son generalmente altos (Pierik, 1990).

Los almidones en los medios naturales se hidrolizan y sufren cambios químicos que los transforman en azúcares, durante el proceso de esterilización. Estos azúcares funcionan como una fuente importante de energía y son asimilados más fácilmente por la semilla (García et al, 1993).

El agua, por otra parte, al ser absorbida por la semilla genera un aumento en el volumen de ésta, estimulando el inicio de la división celular, primer paso en el proceso de germinación (Pierik, 1990).

Como se mencionó anteriormente, las necesidades nutricionales de los embriones son de menor relevancia durante la germinación. Prueba de esto es la discutida participación de las vitaminas en la este proceso. Sin embargo, García y colaboradores (1993) determinaron que la presencia de vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico, podría estar involucrado con una mayor

germinación de las semillas de orquídea. Además, algunos autores han establecido que las semillas necesitan hierro y muy posiblemente manganeso para germinar (Pierik, 1990).

6.4.1. *Cattleya aurantiaca*

No se presentaron diferencias significativas en el número promedio de semillas germinadas entre los medios Y, K y T, por lo que se estableció que estos medios lograron satisfacer las necesidades antes descritas de una manera más o menos similar.

La mayor germinación que se presentó en el medio Y, si se compara con los dos medios de origen natural, se atribuyó principalmente a que este medio contenía una mayor cantidad de carbohidratos. Además, la solidificación del medio de cultivo Y fue apropiada para que se diera una buena absorción de agua, por parte de la semilla.

La aceptable germinación que se obtuvo en el medio T, se relacionó con la concentración de carbohidratos y vitaminas como la niacina. Esta vitamina es de uso frecuente en los ensayos de germinación, por su posible participación en la estimulación de este proceso (Pierik, 1990).

La disponibilidad de agua, que se presentó en este medio, al encontrarse parcialmente licuado, favoreció a esta buena respuesta de germinación. Sin embargo, al presentarse algún tipo de agitación, esta situación produjo que las semillas penetraran en el medio, generando en alguna medida una deficiencia de oxígeno en estas estructuras; lo que contribuyó muy posiblemente con la disminución de la respiración celular, reduciendo la actividad metabólica del embrión.

La pobre germinación obtenida en el medio GT, podría involucrarse con la poca disponibilidad de agua que se presentó en este medio de cultivo. Sin embargo, se observó una moderada respuesta de germinación por parte de las semillas que fueron sembradas en este medio. Esta respuesta se generó muy probablemente a la presencia de carbohidratos y a una alta concentración de vitaminas como tiamina y niacina.

El medio de cultivo K, se utilizó como control ya que ha sido utilizado en muchas ocasiones para la siembra de semillas de diversos géneros de orquídea. Su constitución es simple, sin embargo en él se presentan compuestos como el sulfato de amonio, el cual según Raghavon (1964) citado por García (1996), contribuye con la germinación de semillas de *Cattleya*. Además este medio de cultivo satisface las necesidades hídricas de las semillas al presentar una solidificación semi – sólida. Por tal razón, el promedio de semillas germinadas en este medio fue segundo a nivel general.

En los medios Y y K, se generó la mayor producción de plántulas. Este resultado se relacionó con la presencia de minerales importantes en la nutrición vegetal como el fósforo y el calcio, este último muy importante en la división celular. Además, la presencia de hierro en estos medios, contribuyó con el desarrollo de los protocormos originando un mayor número de plántulas. Lo anterior se establece debido la función de este elemento se ha relacionado estrechamente con la conversión de energía durante la fotosíntesis (García, 1996).

Sin embargo, éstas plántulas se deben transplantar ya que se hace necesario un cambio de medio cultivo. Esto se debe que los minerales presentes en éstos se llegan a agotar y los medios tienden a deshidratarse. Cuando esto sucede, se dan variaciones en el pH, el cual por lo general desciende.

Además se acumulan fenoles, gases y otras sustancias tóxicas que podrían causar la muerte de las plántulas (Jiménez y Han Jan, 1994).

En la Tabla 6.4.1., se evidencia la composición química de los componentes principales de los diferentes medios de cultivo. También se ponen de manifiesto las diferencias en la concentración de algunos elementos como el calcio y el hierro y de algunas vitaminas, especialmente la tiamina y la niacina. A partir de estas concentraciones se estableció la presencia o no de los componentes antes mencionados, en los diferentes medios de cultivo.

Tabla 6.4.1. Composición nutricional de los componentes principales utilizados en la elaboración de tres medios naturales para la germinación de semillas de *Cattleya*. (Concentraciones reportadas para las cantidades de tomate, yuca y germen de trigo necesarias para elaborar un litro de medio de cultivo)

| Componentes | Tomate Lycopersicum sculentum ¹ | Yuca Manihot esculenta ² | Germen de Trigo ³ |
|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Proteínas (g) | 0,20 | 0,10 | 1,40 |
| Carbohidratos (g) | 1,15 | 4,70 | 1,60 |
| Ca (mg) | 1,75 | 4,50 | 2,65 |
| P (mg) | 6,00 | 5,90 | 50,00 |
| Fe (mg) | 0,15 | 0,14 | 0,37 |
| Vitamina A (ug) | 45,00 | 0,62 | - |
| Tiamina (ug) | 15,00 | 7,50 | 100,00 |
| Riboflavina (ug) | 7,50 | 5,00 | 27,5 |
| Niacina (ug) | 175,00 | 87,5 | 275,00 |
| Ácido ascórbico (mg) | 5,75 | 5,00 | - |
| Sacarosa (g) | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

Fuentes: ¹ Ministre des Approvisionnements et Services, 1988; ² Instituto de nutrición de Centro América y Panamá, 1961; ³ Información del producto.

Microsoft Word

Por otra parte, en los medios T y GT, se encontraron principalmente protocormos en lugar de plántulas. El retraso del crecimiento de las plántulas se vincula principalmente con el tipo de medio empleado. Estos medios posiblemente no ofrecen los nutrientes adecuados para la formación de plántulas. Dentro de estos nutrientes debe de tomar especial atención a la concentración de calcio presente en estos medios, ya que este elemento es de vital importancia en la división celular.

Los medios T y GT, presentaron muy posiblemente, una concentración de calcio inferior a la contenida por los medios K y Y y esto puede explicar la gran diferencia en el número de plántulas que se obtuvo entre estos medios de cultivo. Lo anterior indica que los medios T y GT no deben ser empleados para la generación de plántulas, a pesar de que se obtuvieron resultados positivos en la germinación como fue el caso del medio T.

No obstante, la composición mineral de los componentes primarios de los medios de origen natural, se puede ver alterada o modificada debido a varios factores. El primero de ellos es de índole genético. En una cosecha de tomates, por ejemplo, se pueden tener frutos de una misma planta que presentan diferencias en la concentración de carbohidratos.

El segundo factor es de carácter fisiológico. Dependiendo del estado de madurez y de estado de las plantas que originan la materia prima de los medios, así tendrán éstos más o menos cantidad de un componente dado.

El tercer aspecto se relacionó con el ambiente. Los suelos, la época de cosecha y otros factores de índole culturales, pueden afectar la cantidad de nutrientes que se encuentren en ese momento dentro de la materia prima para los medios de cultivo.

Es por esta razón que a la hora de trabajar con medios de origen natural se debe de tener en cuenta que se corre el riesgo de que estos medios no posean la capacidad de generar respuesta alguna de germinación. Esto debido a que no presentan la concentración adecuado de nutrientes como para que se una reacción metabólica por parte de las semillas.

Cattleya skinneri Var. Bateman y *C. skinneri* Var. Alba

La diferencia en el número de semillas germinadas que se obtuvo entre la especie *Cattleya aurantiaca* y las variedades de *C. skinneri*, se relacionó principalmente con el estado de madurez de los embriones. Como se mencionó anteriormente, el estado de madurez en que se encuentren las semillas podría afectar el tiempo de germinación, sin embargo, también la germinación se afecta por este factor.

En las semillas muy jóvenes, el embrión aún no se ha diferenciado por completo, lo que ocasiona que ocasiona que presenten las condiciones apropiadas para la germinación. (Jiménez y Han – Jan, 1994)

Las semillas de orquídea deben sembrarse en condiciones *in vitro*, cuando éstas se encuentran en un estado de desarrollo entre la fertilización y la maduración de la cápsula. Exactamente cuando la cápsula tiene dos tercios de su madurez. (Pierik, 1990)

A pesar de que se realizó una observación de las semillas de las diferentes especies tratadas al estereoscopio y se confirmó la presencia del embrión en la mayoría de ellas, la sola presencia del embrión dentro de la semilla no brinda la seguridad de que ésta se encuentre madura. Para asegurarse de la viabilidad de una semillas se hace necesaria una prueba con Tetrazolio.

En este test, los embriones viables se tiñen de rojo, mientras que los no viables se quedan blancos. (Pierik, 1990)

6.5. Valor económico de la germinación

6.5.1. *Cattleya aurantiaca*

Al realizar el cálculo del costo de cada semilla germinada, protocormo y plántula obtenida en los diferentes medios de cultivo, se estableció que el medio que generó una mayor disminución en el costo de germinación fue el medio Y. Este resultado se dio principalmente ya que el medio Y presentó un costo bajo de elaboración, y además en él se generó la mejor respuesta de germinación. Sin embargo también se debe de tomar en cuenta que este medio no presentó diferencias significativas con el medio K en la producción de plántulas y tampoco presentó diferencias significativas en el número de protocormos obtenidos con el medio T.

6.5.2. *Cattleya skinneri* Var Bateman y *C. skinneri* Var Alba

En estas variedades, el valor de germinación fue mayor al que se obtuvo en la especie *Cattleya aurantiaca*. Esto se relacionó principalmente con la poca germinación obtenida en estas variedades de *C. skinneri*, ya que el valor de los medios de cultivo fue el mismo para todas las pruebas realizadas.

Con relación al valor de las plántulas y los protocormos, se establece lo mismo que en el caso del costo de la germinación. El número tan reducido de plántulas y protocormos obtenidos elevó considerablemente el valor de estas estructuras vegetativas.

Sin embargo, al estar los medios de cultivo naturales expuestos a cambios repentinos en el precio de su materia prima, el valor de las semillas germinadas, los

protocormos y las plántulas se afecta considerablemente originando a la empresa problemas de presupuesto.

7. CONCLUSIONES

- La yuca (*Manihot esculenta*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y el germen de trigo, presenta sustancias que satisfacen los requerimientos energéticos, hídricos y nutricionales de los embriones de *Cattleya*
- El costo de un medio de cultivo para orquídeas del género *Cattleya* se redujo significativamente al utilizar yuca (*Manihot esculenta*) como componente principal.
- El número de semillas germinadas de *Cattleya aurantiaca* experimentó un aumento, al utilizar un medio de cultivo elaborado a partir de yuca, con respecto a los otros medios naturales utilizados.
- El valor económico de un protocormo de *Cattleya aurantiaca*, disminuyó considerablemente al utilizarse un medio de cultivo elaborado a partir de yuca, en relación con el costo de uno obtenido en un medio de cultivo Knudson (1946).

8. RECOMENDACIONES

- Al realizar pruebas de germinación en orquídeas, se debe establecer un control estricto sobre la edad de las cápsulas. Es preferible que dentro del mismo proyecto se lleve este control. Todo esto con el fin de eliminar el riesgo de sembrar semillas inmaduras.
- Con todo, si no se logra tener un control adecuado de la edad de la cápsula, se hace necesario la utilización de la prueba de Tetrazolio con el fin de evitar errores en los resultados.
- La medición del pH de los medios naturales después de los procesos de esterilización (autoclavado), es un factor a tomar en cuenta en futuros ensayos con este tipo de medios. Esto se establece, ya que en los medios de cultivo elaborados a partir de reactivos químicos se establece que el pH disminuye en 0,5 después del autoclavado. Sin embargo, en los medios naturales no se encuentran reportes sobre la variación del pH después del proceso de autoclavado

9. BIBLIOGRAFIA

- ALDERBERG, J; DARLING, J. 1993. *In vitro* membrane treatment accelerates flowering of *Laeliocattleya* (El Cerrito X Springs Fires). American Orchid Society. 62(9): 920-923.
- ARTHAYUKTI, W. 1992. The birth of Thai orchid industry: a personal experience. Network News. 6(5): 2-23.
- ASOCIACIÓN COSTARRICENSE DE ORQUIDEOLOGÍA. 1973. Orquídeas su cultivo en Costa Rica. San José, C.R. Impresora Delta S.A. p. 3-11.
- ASOCIACIÓN COSTARRICENSE DE ORQUIDEOLOGÍA. 1995. Orquídeas de Costa Rica y su cultivo. San José, C.R. Litografía e Imprenta LIL. p. 12-35.
- BALLARD, W.W. 1987. Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds. American Orchid Society. 56(9): 935-946.
- BATCHELOR, S.R.; Your first orchid. American Orchid Society. 62(9): 909-914.
- DUNSTERVILLE, K. 1985. Conservation in an overpopulated world. American Orchid Society. 54(10): 1189-1193.
- ELLIOTT, M.S.; ZETTER, F.W.; SHEEHON, T.J.; WISLER, G.C. 1985. A virus disease of *Dendrobium* in Florida. American Orchid Society. 56(10): 1052-1057.
- GARCÍA, J.A. 1996. Efecto de cuatro medios de origen orgánico sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de *Cattleya skinneri* Bateman (Guaria Morada), en condiciones de cultivo *in vitro*. Tesis Lic. Heredia, C.R. Universidad Nacional. 83p.
- GARCÍA, J.A.; VALERIN, A.T.; SALAZAR, R. 1993. Utilización de tres medios orgánicos para la germinación in vitro de semillas de Guaria Morada *Cattleya skinneri* (Bateman). Uniciencia. 10: 79-83.
- GEORGE, E.F., D.J. PUTTOCK, H.J. GEORGE. 1987. Plant culture media, Vol 1: Formulation and uses. England, British Library Cataloguing in Publication Data. 567 p.

- HETHERINGTON, E. 1985. Semi-Albas. American Orchid Society Bulletin. 54(1): 6-14.
- IMES, R. 1997. Orquídeas. Trad. por Elena Gaminde. México, Editorial Zendera Zoriquey S.A. p. 20-23.
- INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA. 1961. Tabla de composición de alimentos para uso en América Latina. Guatemala. p. 40-41
- JIMÉNEZ, B; HAN JAN, C. 1994. Manual técnico: Propagación in vitro de orquídeas a través de semilla. San José, C.R. Instituto Nacional de Aprendizaje – Misión China. p. 22-24.
- MINISTRE DES APPROVISIONNEMENTS ET SERVICES. 1988. Valeur nutritive de quelques aliments usuels. Canada. p. 18
- MONTIEL, M. 1991. Introducción a la flora de Costa Rica. 2 edición. San José, C.R., Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 206.
- MUÑOZ, A. 1998. Cultivo de meristemas de tres especies de orquídeas y evaluación de su protocolo para su crioconservación. Tesis Lic. San José, C.R. Universidad de Costa Rica. 77p.
- PALMA, T. 1993. Micropropagación de orquídeas, germinación y desarrollo. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 16p.
- PIERIK, R.L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. por Luis Ayerde. Madrid, E, Ediciones Mundi-Prensa. p. 149-158.
- PRICE, G.R.; EARLE, E.D. 1984. Sources of orchid protoplast for fusion experiments. American Orchid Society. 53(10): 1035-1043.
- RIVERA, G; SANABRIA, E. 1992. Morfología de las orquídeas. Boletín Agrario # 43, Heredia, C.R., Universidad Nacional. 6p.
- RODRIGUEZ, R; MORA, D.F., BARAHONA, M.F.; WILLIAMS, N.H. 1986. Géneros de orquídeas de Costa Rica. San José, C.R., Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 88-89.
- SCHUDEL, J.G. 1993. Future generations. American Orchid Society. 62: (5) 486-494

- SEQUEIRA, R. s.f. Preguntas frecuentes sobre orquideología y sus repuestas. Boletín de la Asociación Costarricense de Orquideología. 6p.
- SMITH, F. 1984. Bifoliate *Cattleyas* and their culture. American Orchid Society Bulletin. 53(7): 690-698.
- SNYDER, G. 1991. Will orchids survive? The current situation in Costa Rica. American Orchid Society Bulletin. 60(12): 1166-1176.
- VANDERMEULEN, J.H. 1985. Greenhouse culture in Canada American Orchid Society. 54(1): 31-46.
- ZETTER, F.W.; WISLER, G.C.; ELLIOTT, M.S.; KO, N.J. 1987. Some new, potentially significant viruses of orchid and their probable means of transmission. American Orchid Society. 56(10): 1045-1051.

10. ANEXOS

Anexo 1.

Composición del medio de cultivo Knudson C (1946)

| Componentes | Fórmula | Cantidad (g/l) |
|--------------------------|--|----------------|
| Sulfato de amonio | $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ | 0,5 |
| Sulfato ferroso | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| Sulfato de magnesio | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 |
| Sulfato de manganeso | MnSO_4 | 0,0075 |
| Nitrato de calcio | $\text{Ca}(\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1 |
| Fosfato de potasio | KH_2PO_4 | 0,25 |
| Sacarosa | - | 20 |
| Phytigel | - | 3 |

Anexo 2

Estimación del valor económico (colones) de los medios de cultivo utilizados para la germinación de semillas de Cattleya.

Medio Y

| Componente | Cantidad (g/l) | Valor por litro (¢) | Valor por 50 ml (¢) |
|------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Yuca | 250 | 30 | 1,5 |
| Sacarosa | 20 | 3,5 | 0,2 |
| Phytigel | 3 | 164,3 | 8,2 |
| Totales | | 197,8 | 9,9 |

Medio T

| Componente | Cantidad (g/l) | Valor por litro (¢) | Valor por 50 ml (¢) |
|------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Tomate | 500 | 202,5 | 10,1 |
| Sacarosa | 20 | 3,5 | 0,2 |
| Glucosa | 1 | 56,4 | 2,8 |
| Phytigel | 3 | 164,3 | 8,2 |
| Totales | | 426,7 | 21,3 |

Medio GT

| Componente | Cantidad (g/l) | Valor por litro (¢) | Valor por 50 ml (¢) |
|-----------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Germen de trigo | 100 | 71 | 3,6 |
| Sacarosa | 20 | 3,5 | 0,2 |
| Phytigel | 2 | 108,5 | 5,4 |
| Totales | | 183,0 | 9,2 |

Medio K

| Componente | Cantidad (g/l) | Valor por litro (¢) | Valor por 50 ml (¢) |
|--|----------------|---------------------|---------------------|
| $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ | 0,5 | 27,7 | 1,39 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 | 1,2 | 0,06 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 | 9,3 | 0,46 |
| MnSO_4 | 0,0075 | 0,3 | 0,02 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1 | 46,5 | 2,32 |
| KH_2PO_4 | 0,25 | 15,5 | 0,77 |
| Sacarosa | 20 | 3,5 | 0,17 |
| Phytigel | 3 | 164,3 | 8,21 |
| Totales | | 268,5 | 13,40 |

Anexo 3

ANÁLISIS DE VARIANZA Y COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY,
PARA EL NÚMERO DE SEMILLAS GERMINADAS EN LOS DIFERENTES
MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

K: KNUDSON
Y: MEDIO DE YUCA
T: MEDIO DE TOMATE
GT: GERMEN DE TRIGO

STATISTIX FOR WINDOWS

ONE-WAY AOV FOR: GT K T Y

| SOURCE | DF | SS | MS | F | P |
|---------|----|--------|---------|------|--------|
| BETWEEN | 3 | 136799 | 45599.8 | 6.09 | 0.0016 |
| WITHIN | 40 | 299383 | 7484.57 | | |
| TOTAL | 43 | 436182 | | | |

| VARIABLE | SAMPLE | | GROUP | |
|----------|--------|------|---------|--|
| | MEAN | SIZE | STD DEV | |
| GT | 8.5455 | 11 | 8.9595 | |
| K | 133.27 | 11 | 133.84 | |
| T | 69.091 | 11 | 60.184 | |
| Y | 149.09 | 11 | 91.223 | |
| TOTAL | 90.000 | 44 | 86.513 | |

CASES INCLUDED 44 MISSING CASES 0

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

| VARIABLE | HOMOGENEOUS | |
|----------|-------------|--------|
| | MEAN | GROUPS |
| Y | 149.09 | I |
| K | 133.27 | I |
| T | 69.091 | II |
| GT | 8.5455 | .. I |

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 3.791 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 98.895
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 36.889

Anexo 4

ANÁLISIS DE VARIANZA Y COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA EL NÚMERO DE PLÁNTULAS OBTENIDAS EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

STATISTIX FOR WINDOWS

ONE-WAY AOV FOR: GT K T Y

| SOURCE | DF | SS | MS | F | P |
|---------|----|--------|---------|------|--------|
| BETWEEN | 3 | 153490 | 51163.4 | 8.51 | 0.0002 |
| WITHIN | 40 | 240486 | 6012.14 | | |
| TOTAL | 43 | 393976 | | | |

| VARIABLE | SAMPLE MEAN | GROUP SIZE | STD DEV |
|----------|-------------|------------|---------|
| GT | 0.2727 | 11 | 0.6467 |
| K | 123.27 | 11 | 127.36 |
| T | 1.4545 | 11 | 4.2039 |
| Y | 114.36 | 11 | 88.369 |
| TOTAL | 59.841 | 44 | 77.538 |

CASES INCLUDED 44 MISSING CASES 0

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

| VARIABLE | HOMOGENEOUS MEAN | GROUPS |
|----------|------------------|--------|
| K | 123.27 | I |
| Y | 114.36 | I |
| T | 1.4545 | .. I |
| GT | 0.2727 | .. I |

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

| | | | |
|-------------------------------|-------|-----------------|-------|
| CRITICAL Q VALUE | 3.791 | REJECTION LEVEL | 0.050 |
| CRITICAL VALUE FOR COMPARISON | | 88.635 | |
| STANDARD ERROR FOR COMPARISON | | 33.062 | |

Anexo 5

ANÁLISIS DE VARIANZA Y COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY
PARA EL NÚMERO DE PROTOCORMOS OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES
MEDIOS DE CULTIVO

K: MEDIO KNUDSON
Y: MEDIO DE YUCA
T: MEDIO DE TOMATE
GT: MEDIO DE GERMEN DE TRIGO

STATISTIX FOR WINDOWS

ONE-WAY AOV FOR: GT K T Y

| SOURCE | DF | SS | MS | F | P |
|---------|----|---------|---------|------|--------|
| BETWEEN | 3 | 25419.0 | 8472.99 | 6.92 | 0.0007 |
| WITHIN | 40 | 48960.9 | 1224.02 | | |
| TOTAL | 43 | 74379.9 | | | |

| VARIABLE | SAMPLE MEAN | GROUP SIZE | STD DEV |
|----------|-------------|------------|---------|
| GT | 8.2727 | 11 | 8.5216 |
| K | 10.000 | 11 | 8.1976 |
| T | 67.636 | 11 | 58.826 |
| Y | 34.727 | 11 | 35.997 |
| TOTAL | 30.159 | 44 | 34.986 |

CASES INCLUDED 44 MISSING CASES 0

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

| VARIABLE | HOMOGENEOUS MEAN | GROUPS |
|----------|------------------|--------|
| T | 67.636 | I |
| Y | 34.727 | II |
| K | 10.000 | ..I |
| GT | 8.2727 | ..I |

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 3.791 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 39.993
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 14.918