

Cítese como:

RODRÍGUEZ, L. Et al. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. [En línea]. Cuba. 2005. ISBN 959-250-156-4. *Disponible en:* www.dama.gov.co

Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas.

L. RODRÍGUEZ¹, R. GONZÁLEZ¹, A. DÍAZ¹, E. FAJARDO¹, E. SÁNCHEZ, J. HERNÁNDEZ²,
M. A. CASTAÑEIRA², G. DE LA CRUZ³ y J. GONZÁLEZ³.

¹Centro de Desarrollo de la Montaña

Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo Telef: (021) 82207–82140–322229

loexis@cdm.gtmo.inf.cu

²Centro Nacional de Áreas Protegida

³Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado

RESUMEN

Las orquídeas constituyen una de las familias de plantas de mayor demanda entre las ornamentales. La explotación irracional a que han sido sometidas unido a las exigencias medio ambientales de estas para su reproducción y desarrollo natural, han contribuido a que muchas especies se encuentren amenazadas o en peligro de extinción. Teniendo en cuenta la importancia que desde el punto de vista ecológico, económico y social revisten estas especies de plantas se llevó a cabo en el Centro de Desarrollo de la Montaña el estudio con el objetivo de lograr la producción a gran escala y la recuperación de orquídeas silvestres Cubanas y alcanzarlo en el menor tiempo, para ello se utilizaron cápsulas de 21 especies provenientes de las orquídeas silvestres del macizo montañoso Nipe - Sagua – Baracoa cultivadas en el banco de germoplasma *ex situ* del propio centro. Para lograr el objetivo propuesto se evaluaron indistintamente los factores: medios de cultivo, estado de madures de las cápsulas, estado de agregación del medio de cultivo, dosis de carbón activado, pH, sacarosa y sustrato. Los resultados permitieron alcanzar la micropropagación de las especies: *Bletia purpurea*, *Campylocentrum micranthum*, *Encyclia gravida*, *Encyclia oxypetala*, *Encyclia phoenicea*, *Epidendrum difforme*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum*, *Epidendrum wrightii*, *Eulophia alta*, *Oeceoclades maculata*, *Oncidium luridum*, *Prosthechea cochleata* y *Schomburgkia lyonsii*. Entre los factores de mayor incidencias en los resultados destacan la utilización de las cápsulas maduras, medio de cultivo en estado líquido para la germinación de las semillas, carbón activado a razón de 0.15 %, y el empleo de fibra de coco en la adaptación de las vitroplantas. Como parte de la conservación de estas especies se estableció un banco de germoplasma *ex situ* donde se representan 100 variedades de esta familia de plantas.

INTRODUCCION

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

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

Es bien conocido que las semillas de orquídeas crecen lentamente y requieren años para que la planta florezca. Algunas especies florecen más temprano, pero otras necesitan de varios años para florecer, por lo que la paciencia es el primer requerimiento para aumentar la población de una especie determinada. Sin embargo, es posible disminuir este tiempo e incrementar las poblaciones de orquídeas a través de las técnicas biotecnológicas suministrando a las semillas todos los nutrientes que necesitan para su crecimiento (Villalobos, 1990).

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

Pierick (1994), planteó que la deforestación de los bosques, la degradación de los ecosistemas montañosos y la contaminación ambiental han conllevado a que algunas especies se encuentren en peligro de extinción y con el menor conocimiento sobre su propagación. El cultivo de tejido es usado para la propagación rápida de orquídeas bajo determinados intereses y es empleado industrialmente en Tailandia, Singapur, Malasia, Indonesia y otros países (Arditti y Ernst, 1993).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto y concientes de la necesidad de disponer de un número mayor de individuos de las especies de orquídeas silvestre del macizo montañoso Nipe-Sagua-Baracoa las cuales constituyen una importante representación de la flora orquideológica de Cuba y que demandan la atención por todo lo que desde el punto de vista medio ambiental, ecológico y económico representan, se concibió esta investigación encaminada a lograr la micropropagación y adaptación de vitroplantas de las especies referidas anteriormente, considerando siempre las necesidades de cada una de ellas y la disponibilidad de material vegetal.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM) y el material vegetal de partida utilizado provino del Banco de Germoplasma de orquídeas silvestres del propio Centro.

I. Germinación asimbiótica *in vitro*

Para evaluar la germinación de las semillas se realizó un estudio con 20 especies en el cual se utilizaron cápsulas verdes (entre 60 y 80 días después de la polinización). Posteriormente se realizaron otros estudios para acelerar el proceso de germinación en el que además de emplear diferentes estados de madurez de las cápsulas se tuvieron en cuenta otros factores como el estado de agregación y diferentes formulaciones de medios de cultivos y adición de diferentes dosis de carbón activado.

La desinfección de las cápsulas se realizó teniendo en cuenta el grado de maduración de las mismas, por lo que se estableció la Desinfección I (D1) para el Estado I (E1) de madurez de las cápsulas (cápsulas verdes) y Desinfección II (D2) para el Estado II (E2) de madurez de las cápsulas (cápsulas maduras con cambio de coloración y dehiscentes). La utilización de dos tipos de desinfección se justifica porque las semillas de las cápsulas E2 se encuentran expuestas a contaminaciones ambientales, en tanto la desinfección D1 es solo para las cápsulas.

Desinfección I: Las cápsulas fueron lavadas con detergente al 1% y sumergidas cinco minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % de cloro activo al que se le añadieron dos gotas de Tween 20 y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. En la cabina de flujo laminar se sumergieron las cápsulas en solución de sulfato de cobre al 2% durante cinco minutos, luego en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 %, y finalmente se enjuagaron con suficiente agua destilada estéril. Antes de ser seccionadas, las cápsulas fueron pasadas por alcohol al 70% y flameadas.

Desinfección II: Las semillas fueron expuestas directamente a los desinfectantes, para ello primeramente se seccionaron las cápsulas y las semillas se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % acompañado con dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos en agitación constante. En condiciones de cabina de flujo laminar y con la ayuda de bomba de

vació, embudo y papel de filtro de 11 cm de diámetro se filtraron las semillas y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

En los experimentos en que solo se utilizó medio de cultivo semisólido se emplearon frascos de 250 ml de capacidad y en los que se evaluaron medios de cultivos semisólidos y líquidos se utilizaron erlenmeyer de 250 ml de capacidad, en todos los casos se le añadió 25 ml del medio de cultivo. El pH fue ajustado a 5.6 antes del autoclaveado en todos los casos, excepto cuando se evaluó la influencia del pH en el medio de cultivo.

La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave vertical a 1.2 Kg. f. cm² durante 20 minutos.

Las semillas se distribuyeron en los medios de cultivo establecidos para cada tratamiento, empleando 10 recipientes para cada tratamiento en diseños completamente aleatorizado. La incubación de los medios se realizó en la oscuridad y para los medios de cultivos líquidos se utilizó una zaranda orbital a 100 rpm (revoluciones por minutos). En los experimentos que no se cumplen algunas de estas condiciones se especifica.

➤ Experimento 1:

Determinación de los medios de cultivo para la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas.

En esta investigación se realizó un estudio sobre la germinación de las especies siguientes:

Bletia pátula Graham, *Campylocentrum micranthum* (Lindl.) Maury, *Cattleya labiata*, *Encyclia gravida* (Lindl.) Schltr, *Encyclia oxypetala* (Ldl.) Acuña, *Encyclia phoenicea* (Ldl.) Neum, *Epidendrum difforme* Jacq, *Epidendrum nocturnum* Jacq, *Epidendrum secundum* Jacq, *Epidendrum wrighthii* Ldl., *Eulophia alta* (L.) Fawc. et Rendle, *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl, *Oncidium luridum* Lindl, *Phaius tancarvilleae* (Banks) Blume, *Physinga polygonatum*, *Polystachya concreta* (Jacq.) Garay et Sweet, *Polystachya foliosa* (Hook.) Rchb. F., *Prosthechea cochleata* (L.) W. E. Higgins, *Prosthechea fragans* (Sw.) W. E. Higgins y *Schomburgkia lyonsii* Lindl.

Para ello se utilizaron cápsulas E1 en los medios de cultivo que contenían las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 50% (MS), Knudson C (1946) (K), Vacin y Went (1949) (V W) o Morel (1965) (M) suplementados con agua de coco (10 %), sacarosa (2 %), carbón activado (0 y 0,15 %) y gelificado con 0.7 % de agar técnico # 3. Las semillas se extrajeron de las cápsulas y fueron distribuidas de forma homogénea sobre los medios e incubadas bajo condiciones de oscuridad durante siete días y luego a 16 horas luz de fotoperíodo a intensidad de 27 $\mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y 25 ± 1 °C. Se evaluó la fenolización de las semillas y semanalmente su germinación.

➤ Experimento 2:

Germinación asimbiótica *in vitro* de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*

Para la realización de este estudio se utilizaron cápsulas en los estados de madurez E1 y E2. Los medios de cultivos (3) se emplearon en estados semisólido y líquido y estuvieron compuestos por los siguientes requerimientos: A- sales Knudson C (1946), B- sales macroelementos Knudson C (1946) y microelementos ½ MS (1962), C- sales ½ MS (1962). Todos los medios de cultivos fueron suplementados con 10 % de agua de coco, 2.0 % de sacarosa y para los medios semisólidos 0.15 % de carbón activado y 0.7% de agar. Se evaluó la germinación y su resultado fue expresado en días. El procesamiento estadístico se realizó con un análisis de varianza de Contrastes Ortogonales a Priori para 0.01 nivel de probabilidad.

II. Multiplicación de protocormos

➤ Experimento 3:

Comparación de dos métodos de cultivo en la multiplicación de protocormos de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*

Se utilizaron protocormos procedentes de semillas germinadas y las sales del medio de cultivo MS en estado líquido y semisólido con los suplementos 3.0 % de sacarosa, 15 % de agua de

coco, 0.1 mg.l⁻¹ de tiamina y para el estado semisólido 0,7% de agar, 0.15% de carbón activado y en ambos casos el pH fue ajustado a 5.6. En los dos métodos de cultivo se inició con 50 protocormos en cada recipiente los cuales contenían 25 ml del medio de cultivo y se contabilizaron los protocormos a los 10, 20 y 30 días posterior a la incubación que fue realizada en zaranda orbital (100 rpm) para el método de cultivo en estado líquido y 16 horas luz de fotoperíodo a intensidad de 27 uMol.m⁻².s⁻¹ y 25 ± 1 °C para los dos métodos de cultivo.

III. Aclimatización

Las condiciones ambientales en la casa de adaptación fueron mantenidas en los rangos siguientes: humedad relativa entre un 70 - 90 %, temperatura entre los 27 y 31 °C y un 30 % de iluminación natural.

➤ Experimento 4:

Influencia del tipo de sustrato en la adaptación de *Oncidium luridum* y *Encyclia phoenicea*

La parte experimental se realizó en la casa de vegetación del CNEA. Se utilizaron las especies de orquídeas *Oncidium luridum* y *Encyclia phoenicea* y la influencia que ejercen los sustratos: fibra de coco, zeolita, carbón vegetal, algarrobo y musgos en la adaptación de las mismas. Todos los sustratos se esterilizaron con formol al 1%. La siembra se realizó en macetas plásticas con drenaje adecuado, en las que se sembraron 3 plantas por macetas y un total de 10 macetas por tratamientos. Se establecieron escalas para las diferentes variables evaluadas con relación a la supervivencia de las vitroplantas las cuales se sembraron en un sustrato de fibra de coco y se regaron tres veces al día. Las vitroplantas se evaluaron en cuanto a longitud de la planta, número de hojas por planta y número y longitud de cada raíz por planta. Los datos fueron procesados a través de tablas de contingencia de 2 x 2 y R x C, utilizando como prueba de independencia la prueba G (Soakal y Rohla, 1995) y la tabla de X² para los niveles de significación de P ≤ 0.05, P ≤ 0.01 y P ≤ 0.001.

➤ Experimento 5:

Utilización de diferentes sustrato en la aclimatización de vitroplantas de *Prosthechea cochleata*

La investigación se realizó en la casa de vegetación del CDM con vitroplantas de *Prosthechea cochleata* procedentes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del propio centro. Las mismas poseían una altura inicial entre 2.5 – 3.0 cm y dos pares de hojas con 11 semanas de edad en el cultivo *in vitro*. Antes de realizar la siembra se prepararon bandejas de poliestirano de 120 alvéolos que fueron previamente desinfectadas con una solución de fenol al 0,1 %. Se utilizaron cuatro sustratos (Fibra de coco (FC), Pergamino de café (PC), restos de búcaro en descomposición (B) (*Eritrina glauca*) y aserrín, escogidos teniendo en cuenta la disponibilidad de estos en las condiciones del macizo Nipe- Sagua-Baracoa. Las vitroplantas se regaron tres veces al día durante las dos primeras semanas para y posteriormente dos veces al día con riego por micro aspersión aérea.

Se evaluaron las variables altura de la planta (cm), número de hojas, diámetro de la base del tallo (cm) y supervivencia cada 15 días hasta los dos meses considerando que a partir de esta fecha las plantas mostraron condiciones estables de crecimiento y supervivencia. Las pruebas de homogeneidad realizada al material inicial para todas las variables a evaluar corroboraron que se partió de un material homogéneo. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar y cada tratamiento se replicó 20 veces. Para el procesamiento estadístico de los resultados se realizaron análisis de varianza de clasificación simple para cada variable.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Germinación asimbiótica *in vitro*

➤ Experimento 1:

Determinación de los medios de cultivo para la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas.

En la tabla 1 se muestran los resultados alcanzados en la investigación donde se aprecia que 13 de las 20 especies evaluadas germinaron bajo diferentes condiciones de medios de cultivos. Solo tres del total de las especies que germinaron pudieron lograrlo con y sin carbón activado en el medio en tanto las restantes 10 necesitaron de este suplemento para germinar, en su ausencia las semillas fenolizaron. Es importante destacar que cuando *Prosthechea cochleata* y *Epidendrum nocturnum* germinaron sin la adición de carbón activado al medio de cultivo, disminuyeron en una semana el tiempo para germinar en presencia de las sales MS comparado con el periodo que necesitaron cuando si estuvo presente. En tanto *Epidendrum secundum* disminuyó el mismo periodo con iguales condiciones en todos los medios.

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

La fenolización estuvo presente de manera parcial o total en 14 de las 20 especies evaluadas. Tisserat y Jones (1999), coinciden en plantear que la exudación de fenoles fitotóxicos durante el cultivo de tejidos de orquídeas constituye un serio problema para su cultivo *in vitro*, y que la vía más efectiva para solucionar este problema es realizar cambios frecuentes al medio de cultivo y/o añadir carbón activado.

Arditti y Ernst (1993), plantearon qué entre las posibles explicaciones al efecto positivo que ejerce el carbón activado en el cultivo de tejidos de orquídeas se encuentra el aumento de la aireación del medio de cultivo. Una segunda razón es que absorbe el etileno el cual puede inhibir el crecimiento y la diferenciación, y basado en el estudio de las características de absorción y cambios que se producen en el medio de cultivo durante el autoclaveado el carbón activado absorbe el 5-hydroxymethylfurfural que se forma por la deshidratación de la sacarosa durante este proceso el cual es inhibidor del crecimiento así como productos fenólicos y carboxílicos producidos por los tejidos. El carbón también puede absorber las hormonas vegetales y las vitaminas lo que explica porque en ocasiones puede ser inhibidor del crecimiento.

Prosthechea cochleata, *Encyclia oxypetala* y *Epidendrum difforme* marcaron cambios con respecto al resto de las especies en cuanto al tiempo para la germinación según el tipo de medio de cultivo con intervalos de cinco, cuatro y cuatro semanas respectivamente entre el periodo más corto y el más largo según el medio de cultivo.

Encyclia phoenicea, *Polystachya foliosa*, *Schomburgkia lyonsii*, *Phaius tancarvilleae* y *Eulophia alta* fueron más específicas que las demás especies en cuanto al tipo de sal para alcanzar la germinación y siempre con carbón activado. Las preferencias que muestran las especies por un medio de cultivo determinado tienen lugar debido a que varía bastante de un genotipo a otro las exigencias nutritivas, por eso muchas especies pueden proliferar muy bien en medios simple como el Knudson C (1946), pero otras como las pertenecientes al género *Cattleya* requieren de medios más complejos para la germinación (Singh, 1993).

Vale destacar que *Encyclia oxypetala*, y *Prosthechea cochleata* fueron las especies más precoces al ocurrir la germinación de las semillas a las 6 y 7 semanas respectivamente, en tanto que *Phaius tancarvilleae*, *Oeceoclades maculata* y *Eulophia alta* con 32; 32 y 40 semanas respectivamente fueron de las especies que germinaron la que más demoraron en hacerlo. George (1996), planteó que las especies terrestres no germinan bien en los medios utilizados normalmente para orquídeas epífitas, y que en ocasiones no toleran altas concentraciones de sales y otras solo germinan en presencia de nitrógeno orgánico o inorgánico.

Las diferencias en las respuestas a la germinación teniendo en cuenta los factores analizados, también han tenido lugar en experimentos realizados con otras especies por McKendrick (2000),

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

➤ Experimento 2:

Germinación asimbiótica *in vitro* de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*

Las respuestas de las especies a los diferentes tratamientos (tabla 2) muestran de manera general amplia diversidad en los periodos que se requieren para la germinación influenciada por los factores involucrados en la investigación.

En las tablas 3 y 4 están representado para *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* respectivamente las comparaciones realizadas mediante contrastes. Al comparar el comportamiento del medio de cultivo líquido agitado con zaranda (100 rpm) frente al medio de cultivo semisólido, los resultados muestran diferencias altamente significativas favorables al medio líquido para las dos especies evaluadas, con importantes reducciones del tiempo para la germinación que alcanza su mayor valor en *Encyclia phoenicea* con 19.2 días (gráfico I).

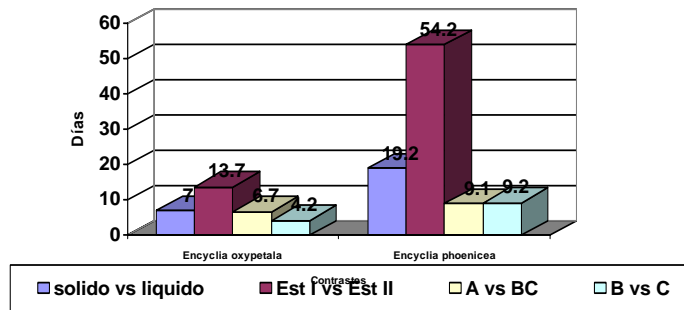


Gráfico I: Cantidad de días en que se reduce el período para la germinación de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*

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

Se puso de manifiesto el efecto positivo del medio líquido en la germinación. La aceleración del proceso se logra porque intervienen factores físicos y químicos que propician condiciones favorables para la respiración, síntesis de proteínas, toma de nutrientes y facilita la dilución de algunos inhibidores específicos o movimientos de productos creados en los procesos de crecimiento y diferenciación (Singh, 1993).

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

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

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

54.2 días del periodo de germinación de semillas para *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* respectivamente (gráfico I).

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

Los contrastes realizados para la comparación de los tres medios de cultivo empleado en la investigación mostraron que para las dos especies las diferencias son altamente significativas tanto para A vs BC como para B vs C, por lo que se evidencia que los resultados mas deseados se obtienen con el empleo de las sales $\frac{1}{2}$ MS en el medio de cultivo. Aunque los tres medios evaluados han sido utilizados indistintamente para la germinación *in vitro* de semillas de otras especies de orquídeas, la aceleración en la germinación depende en buena medida de las preferencias por las fuentes apropiadas de nitrógeno, cosa esta que varía en especies de un mismo género (Arditti, 1995).

Mitra (1987), planteó que el nitrato de amonio es la mejor fuente de nitrógeno para garantizar el crecimiento y desarrollo de un gran número de especies de orquídeas y que las sales de amonio promueven el crecimiento y la formación de protocormos durante la germinación. Después que las raíces y hojas se forman, las plántulas prefieren nitrato para continuar creciendo.

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

II. Multiplicación de protocormos

➤ Experimento 3:

Comparación de dos métodos de cultivo en la multiplicación de protocormos de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*.

Los resultados mostrados en la tabla 5 reafirman todas las bondades referidas en experimentos anteriores sobre el empleo del medio líquido en la germinación de semillas de orquídeas. En todos los periodos evaluados y para las dos especies en estudios el cultivo líquido superó estadísticamente al cultivo semisólido. A pesar de las diferencias encontradas, los valores de multiplicación de las especies en los dos métodos de cultivo podemos considerarlo de aceptables. No obstante sobresale *Encyclia phoenicea* que multiplicó 10 veces el número de protocormos a los 30 días de cultivo en el medio de cultivo líquido (Fig. 1).



Fig. 1: Multiplicación de protocormos. Izquierda: medio líquido. Derecha: medio semisólido

El proceso de multiplicación de protocormos se ilustra en la Fig. 2 donde además se aprecia la diferenciación y el crecimiento de la vitroplanta.

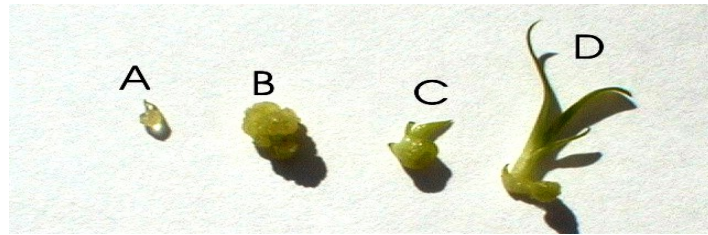


Fig. 2: Proceso de micropropagación de orquídeas. **A:** formación de protocormo a partir de la semilla. **B:** formación de protocormos secundarios. **C:** diferenciación del protocormo. **D:** crecimiento de la vitroplanta

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

Yang *et al* (1999), compararon el cultivo líquido versus cultivo semisólido en la multiplicación de protocormos de *Cymbidium* a los 3, 5, 7, 10 y 30 días. En todos los casos el coeficiente de multiplicación fue significativamente superior en el cultivo líquido.

III. Aclimatización

➤ Experimento 4:

Influencia del tipo de sustrato en la adaptación de *Oncidium luridum* y *Encyclia phoenicea*.

Es preciso señalar que no se han encontrado referencias de trabajos precedentes similares a este tanto a escala nacional como internacional por lo cual constituyen resultados que solo pueden ser discutidos en función de los diferentes tratamientos realizados. Se evidencia en la tabla 6 un mayor porcentaje de plantas vivas de *Encyclia phoenicea* en todos los parámetros evaluados. La fibra de coco fue el mejor sustrato al evaluar la supervivencia, mostrando un 99 % en *Encyclia phoenicea* y un 86 % en *Oncidium luridum* ($P \leq 0.001$), superando en ambos casos a los demás sustratos evaluados. La Zeolita resultó ser el segundo en orden de supervivencia mostrando en *Encyclia* un 97 % de supervivencia; muy próximo al de fibra de Coco. El sustrato de Musgo fue el de peor respuesta para ambas especies, dando un 0 % de supervivencia de las plantas. De modo general se pudo evidenciar que a medida que aumentaban los rangos en las tres variables, existía un mayor porcentaje de supervivencia en las dos especies estudiadas. También se observó que con la fibra de coco los bajos niveles de estas variables no influyen en la respuesta a la adaptación, ya que presentaron valores muy similares indistintamente de la longitud de la planta, número de hojas y raíces (Fig 3).



Fig 3: Adaptación de vitroplantas de *Encyclia phoenicea* con el empleo de fibra de coco

Según Nogueira (2001), la fibra de coco es el sustrato que posee las características físicas y químicas más cercana al sustrato ideal y que le confiere condiciones favorables para la utilización del mismo en el cultivo de muchas plantas. Este presenta buena capacidad de retención de humedad, estabilización del pH y es fácil de manejar, por lo que se destina a diversos usos como cultivos ornamentales, hortícolas, frutales, semilleros, jardinería, viveros de plantas forestales, producción de esquejes, entre otros. La creciente demanda por este material está respaldada además de sus características químicas y físicas, por ser un material orgánico que soporta hasta diez años de uso y no contamina al medio ambiente (Anónimo, 2000).

Con relación a la influencia de la altura de la planta en la supervivencia en la especie *Oncidium luridum*, no se manifestó una dependencia de la supervivencia con la altura de la planta ($P \leq 0.05$), no obstante a medida que aumenta el tamaño se evidencia un mayor porcentaje de supervivencia. En *Encyclia phoenicea* se evidencia una estrecha dependencia de la supervivencia con la longitud de la planta. *Oncidium luridum* mostró dependencia en cuanto al número de hojas ($P \leq 0.01$) y raíces ($P \leq 0.05$) con respecto a la supervivencia de las plantas. Se puede observar que cuando en esta especie se utiliza un sustrato como el de las fibras de coco, se logran altos porcentajes de supervivencia independientemente del nivel de escala de las diferentes variables analizadas. Con *Encyclia phoenicea* la supervivencia de las plantas fue independiente tanto del número de raíces como de hojas no existiendo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en los diferentes niveles de las escalas utilizadas.

➤ Experimento 5:

Utilización de diferentes sustrato en la aclimatización de vitroplantas de *Prosthechea cochleata*

A los 60 días de cultivo en condiciones de casas verdes el sustrato empleado con restos de Búcaro en descomposición mostró solo un 20 % de supervivencia, mientras los demás sustratos hasta esta fecha mantenían el 100 % de las plantas con que se inició la investigación. Es por ello que se decidió no tenerlo en cuenta en el procesamiento estadístico de los resultados, descartando así la posibilidad de emplearlo en la adaptación de vitroplantas de *Prosthechea cochleata*.

El análisis de varianza realizado para las variables altura de la planta, número de hojas y diámetro de la base del tallo no mostró diferencias significativas para ningunos de los sustratos utilizados (tabla 7), a pesar de que en todos los casos la fibra de coco alcanzó los mayores valores y pergamino de café los más bajos en todas las variables. Por todo ello es evidente que es factible también el empleo de aserrín y pergamino de café en la adaptación de vitroplantas de *Prosthechea cochleata* como sustratos alternativos. Pérez (1998), planteó que en la adaptación de vitroplantas se pueden utilizar residuos de plantas, y entre los más utilizados están las fibras procedentes de corteza de árboles (pinos, fibras de coco, aserrín, etc.). Por su parte la fibra de coco ha sido reportada por Roca (1991), Pérez (1998) y Nogueira (2001) como un sustrato de excelentes condiciones para la adaptación de vitroplantas de un gran número de cultivo.

CONCLUSIONES

Después de analizar los resultados expuestos en las investigaciones realizadas llegamos a las siguientes conclusiones:

- Se logró la germinación *in vitro* de semillas de 13 especies con el empleo de cápsulas inmaduras en un periodo comprendido entre 6 y 40 semanas. Se puso de manifiesto el efecto positivo del carbón activado en el medio de cultivo para la germinación *in vitro* de las semillas contrarrestando la fenalización así como la gran variabilidad de respuestas en este proceso entre las especies.
- Se aceleró la germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* con el empleo de medio de cultivo en estado líquido, cápsulas maduras y sales $\frac{1}{2}$ MS.
- Se logró la multiplicación de los protocormos de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* de modo significativamente superior con la utilización de medio líquido agitado con zaranda

orbital a 100 rpm y a medida que aumentó el periodo evaluado también aumento el número de protocormos.

- El sustrato de fibras de coco resultó ser el más idóneo en la adaptación de las orquídeas epifitas *Oncidium luridum* y *Encyclea phoenicea* y como alternativa se puede emplear la zeolita. Las normas requeridas para lograr el éxito en la adaptación de estas vitroplantas son: *Encyclea phoenicea*: longitud de la planta superior a 3.5 cm; *Oncidium luridum*: poseer más de 5 hojas y presentar de 3-4 raíces por planta; que sean sembrados en un sustrato adecuado (fibras de coco o zeolita).
- Para el proceso de aclimatización de *Prosthechea cochleata* además de la fibra de coco pueden utilizarse los sustratos pergamino de café y aserrín.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, K; Telles, E; Vallés, R; Rodríguez, L y Cala, M (2001) Efecto de tres concentraciones de sacarosa en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de Ruda (*Ruta graveolens*). Informe final de proyecto territorial –055. Guantánamo.
- Anónimo (2000) Para cosecha de primera calidad. La fibra de coco como sustrato. Horticultura 146 Julio 2000
- Arditti, J. (1979) Aspects of the physiology of orchids. In: Woohouse (ed.). advances in Botanical Research, Vol. 7, pp. 422-638 Academic Press, New York
- Arditti, J. y Ernst, R. (1993) Micropropagation of Orchids. John Wiley-Sons, INC. New York.
- Calderon, B.; Baltierra, X.; Le-Feubre, R.; Lopez, I.; Jofré, M. y Matthei, E. (2001) Enraizamiento *in vitro* de orquídeas Chilena. IV Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 2001. Brasil.
- De la Cruz, G.; Temo, D.; Veitia, E. y González, J (1999) Efecto del fertilizante FERMAG en el proceso de endurecimiento *in vitro* de *Oncidium luridum*.
- Díaz, M. A (1988) Las orquídeas nativas de Cuba. La Habana: Científico Técnica. 63 p.
- George, E. F. (1996) Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd. Edington, Wilts. England. Second Edition pp. 575-1361
- Hew C. S. y Yong J. W. H (1997) The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry. World Scientific. National University of Singapore. 331 pp
- Kano, K. (1965) Memoirs of faculty of Agriculture Kagawa University. Studies on the medio for Orchid Seed Germination. Mikityo, Kagawa, Japan.
- Knudson, L. (1946) A New Nutrient Solution for Germination of Orchid Seeds. Ibid. 15: 214-217
- Knudson, L. (1952) Nutrient Solution for Germination of Orchid Seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 21: 94-96
- Mckendrick, S. (2000) Manual para la Germinación *in vitro* de Orquídeas. Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito.
- Mitra, G. C. (1987) some aspects of asymbiotic nutrition of orchic embryos. J. Orch. Soc. Ind., 1: 91-108
- Morel, G. (1965) A new means of clonal propagation of orchids. Amer. Orch. Soc. Bull., 473 – 477
- Murashige, T. and skoog, F. S. (1962). A revied medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. Plant Physiology. 15. p. 173-197
- Nogueira V. (2001) Comunicación personal

ANEXOS

Tabla 1: Germinación de semillas de orquídeas dado en semanas en cuatro medios de cultivo^a.

Especies	Morel (1965)	½ Ms (1962)	V. y (1949)	Went Knudson C(1946)
<i>Bletia pátula</i>	--- (---)	--- (---)	--- (---)	--- (---)
<i>Cattleya labiata</i>	--- (---)	--- (---)	--- (---)	--- (---)
<i>Prosthechea cochleata</i>	9 (9)	8 (7)	12 (12)	12 (12)
<i>Prosthechea fragans</i> ^b				
<i>Encyclia oxypetala</i>	8 (---)	6 (---)	10 (---)	8 (---)
<i>Encyclia gravida</i>	--- (---)	--- (---)	--- (---)	--- (---)
<i>Encyclia phoenicea</i>	--- (---)	11 (---)	--- (---)	15 (---)
<i>Epidendrum difforme</i>	16 (---)	16 (---)	20 (---)	20 (---)
<i>Epidendrum nocturnum</i>	12 (12)	11 (10)	12 (11)	12 (12)
<i>Epidendrum secundum</i>	12 (11)	12 (11)	12 (11)	12 (11)
<i>Epidendrum wrightii</i>	--- (---)	--- (---)	--- (---)	--- (---)
<i>Oncidium luridum</i>	12 (---)	10 (---)	12 (---)	11 (---)
<i>Phaius tancarvilleae</i>	40 (---)	32 (---)	--- (---)	--- (---)
<i>Phydinga polygonatum</i>				
<i>Polystachia concreta</i>				
<i>Polystachia foliosa</i>	12 (---)	--- (---)	--- (---)	12 (---)
<i>Schomburgkia lyonsii</i>	--- (---)	24 (---)	--- (---)	24 (---)
<i>Campylocentrum micranthum</i>	10 (---)	10 (---)	10 (---)	10 (---)
<i>Oeceoclades maculata</i>	32 (---)	32 (---)	32 (---)	32 (---)
<i>Eulophia alta</i>	--- (---)	40 (---)	--- (---)	--- (---)

Leyenda

^a : Lo que se indica dentro de paréntesis representa la respuesta sin carbón activado, y fuera de ello con carbón activado.

^b : En donde hay espacios en blanco es porque no se observó ninguna respuesta durante el período evaluado.

...: Fenolización de los explantes.

Tabla 2: Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea* expresada en días.

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

Leyenda

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

Tabla 3. Contrastes polinomiales para la comparación entre los niveles de los factores evaluados en la germinación de *Encyclia oxypetala*.

Comparación	Contraste	Significación
Semisólido vs Líquido	36,8 vs 29,8	**
Estado I vs Estado II	40,2 vs 26,5	**
A vs B,C	37,8 vs 31,1	**
B vs C	33,2 vs 29,0	**

SE ± 0,15

Tabla 4. Contrastes polinomiales para la comparación entre los niveles de los factores evaluados en la germinación de *Encyclia phoenicea*.

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

SE ± 0,14

Tabla 5: Comparación de dos métodos de cultivo en la multiplicación in vitro de protocormos de *Encyclia oxypetala* y *Encyclia phoenicea*

Especies	Días	<u>Medias del número de protocormos^a</u>	
		Cultivo Líquido	Cultivo Semisólido
<i>Encyclia phoenicea</i>	0	50 (1.0)	50 (1.0)
	10	115 (2.30±0.6)	96 (1.92±0.6) * ^a
	20	297 (5.94±0.73)	217 (4.34±0.73) *
	30	511 (10.22±0.55)	341 (6.82±0.55) *
<i>Encyclia oxypetala</i>	0	50 (1.0)	50 (1.0)
	10	98 (1.96±0.63)	83 (1.66±0.63) *
	20	220 (4.4±0.67)	177 (3.54±0.67) *
	30	437 (8.74±0.59)	336 (6.72±0.59) *

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

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

Tabla 6: Comportamiento de la supervivencia expresada en porcentaje, tomando como criterio el sustrato, longitud de las vitroplantas y número de hojas y raíces en *Oncidium luridum* y *Encyclea phoenicea*.

		<i>Oncidium luridum</i>	<i>Encyclea phoenicea</i>
Sustratos	Fibra coco	86 (1)	99 (1)
	Carbón vegetal	54 (4)	83 (3)
	Algarrobo	49 (5)	63 (5)
	Zeolita	60 (2)	97 (2)
	M. Orgánica	55 (3)	78 (4)
	Musgo	0	0
Significación		***	***
Rangos de	0.5-1.5	53	81
Longitud	1.5-2.0	62	78
Planta (cm)	2.0-3.5	63	85
	>3.5		94
Significación		NS	*
Número de	1-2	37	69

hojas	3-4	57	84
	>5	81	87
Significación		**	NS
Número de	1-2	52	79
raíces	3-4	75	87
	>5	67	89
Significación		*	NS

NS: no existe diferencia significativa

Tabla 7. Influencia del tipo de sustrato en la adaptación de *Prosthechea cochleata*^a.

Sustratos	Altura (cm)	Nro de hojas	Diámetro del tallo (cm)
Fibra de coco	4,96 ± 0,20	3,9 ± 0,3	0,38 ± 0,05
Aserrín	4,12 ± 0,19	3,7 ± 0,3	0,35 ± 0,04
Pergamino de café	3,19 ± 0,15	3,2 ± 0,3	0,33 ± 0,06
Significación	ns	ns	ns

^a: las cifras a la izquierda del signo ± representan las medias de los tratamientos, y a la derecha el error estándar

ns: no existe diferencias significativas entre los tratamientos para un nivel de probabilidad de 0,05.