

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN- León

Facultad de Ciencias y Tecnología

Departamento de Biología



Tema: Micropropagación de Orquídeas (*Encycliaadenocarpon*), del bosque seco del pacífico de Nicaragua.

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADA EN BIOLOGIA

Tutora: MSc. Rebeca Pastora.

Asesora: MSc. María Inés Dávila.

Asesor Estadístico: MSc. Milton Carvajal.

Autoras: Br. Eva Carolina Luna Valladares.

Br. RossieEllieth Zelaya Herrera.

León, Septiembre. 2012

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios todo poderoso, sin ti no hubiésemos hecho este trabajo monográfico, por habernos permitido que saliéramos adelante en los momentos difíciles y de prueba. No tenemos palabras para agradecer lo mucho que nos has dado, lo único que podemos decir es que te necesitaremos en cada proyecto que emprendamos de nuestras vidas y que nunca nos apartaremos de ti.

Son muchas las personas especiales a las que nos gustaría agradecer, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de nuestras vidas, algunas están aquí con nosotras y otras las recordamos con mucho amor... Gracias por todo lo que nos han brindado y por sus bendiciones.

A nuestros padres gracias por su apoyo incondicional que nos han brindado desde la infancia hasta ahora, por darnos su mano y decir sigue adelante tú puedes, aunque muchas veces estemos a punto de flaquear están dispuestos ayudarnos a levantar, gracias por confiar, los amamos.

A todos nuestros profesores no solo de la carrera, sino de toda la vida, mil gracias porque de alguna manera forman parte de lo que ahora somos; especialmente a:

MSc. Rebeca pastora, MSc. Maria Inés Dávila y MSc. Milton Carvajal, los cuales fueron un gran apoyo al culminar la carrera universitaria.

DEDICATORIA

A Dios porque es el que nos brinda los más bellos conocimientos y la dicha de vivir, tener la naturaleza en el cual encontramos tanta bondad en regalarnos alimentos, aire y vida...gracias Señor Jesús por ser quien soy.

A mi madre que es el ser que me ha brindado sus mas sabios consejos y esfuerzos para lograr llegar a esta etapa de mi vida.

A mis hijos que son la luz que Dios ha puesto en mi vida para salir adelante, mis estudios, trabajo y en mi vida...

A mis profesoras MSc. Rebeca Pastora y MSc. Maria Inés Dávila por estar apoyándome día a día en esta investigación.

(Br. Eva Luna Valladares.)

A Dios creador por darnos la vida, sabiduría, protección y perseverancia para concluir esta investigación. Dios mi amigo fiel te AMO!!!!

A mis padres, quienes me enseñaron desde mi infancia a luchar para alcanzar mis metas... Mi triunfo es para ustedes, los amo...

A mi esposo, quien me brindo su amor, su estimulo, paciencia, comprensión y su apoyo constante para que pudiera terminar esta investigación. Son evidencias de su amor...

A todos mis profesores en especial a MSc. Rebeca Pastora y MSc. Maria Inés Dávila por estar siempre dispuestas para ayudarme en la realización de esta tesis.

A mis verdaderos amigos los que nunca dudaron que lograría este triunfo. Realmente los aprecio.

(Br. RossieElieth Zelaya Herrera)

RESUMEN

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. UNAN-León, localizado en la finca el Ojoche ubicado a 1km al oeste del Politécnico La Salle, en el periodo comprendido de Febrero del 2007 a Julio del 2008. El material vegetal que se utilizó en el trabajo para la multiplicación in Vitro fue a partir de semillas de capsulas maduras de *Encycliaadenocarpon* obtenidas del bosque tropical seco de la región del pacífico de Nicaragua para lograr la conservación de las orquídeas.

Las orquídeas es uno de los grupos mas diversos y extensos de plantas con flores; esto las convierte en un atractivo como plantas ornamentales aunque también se han utilizado como comestible, aromatizantes y medicinales. Actualmente las orquídeas son motivos de cultivos por particulares e industriales con uso de híbridos para desarrollar plantas y a la venta de flor cortada lo que tiene una gran importancia económica a nivel mundial.

Es importante dar alternativas positivas de preservación y propagación de las orquídeas, en el cultivo in vitro se perfila la reproducción de Orquídeas bajo condiciones asépticas controladas y la propagación masiva in vitro de orquídeas ya sea por medios de semillas o tejidos, produce altos niveles de multiplicación en periodos de tiempos cortos, además asegura la sanidad del material en multiplicación por lo tanto, el cultivo in vitro de perfila como una respuesta alternativa para el problema de las especies en peligros de extinción y en el mantenimiento de híbridos de gran valor.

Una de las alternativas adecuadas es por el aporte adicional de minerales, vitaminas e hidratos de carbono que contiene dicho compuesto orgánico, Obtenidos del agua de coco, como se realizó en este trabajo y se lograron los parámetros establecidos, se logró identificar cada función de aditivos en el medio de cultivos, Tanto para la multiplicación de protocormos como para la biomasa y enraizamiento, el agua de coco resulta ser un buen aditivo y se ha utilizado ampliamente en cultivos in vitro de Orquídeas, ya que aumenta la proliferación de brotes y protocormos, lo cual es claramente visible en los resultados obtenidos en este trabajo investigativo en especial en protocormos enteros y en las siguientes fases de desarrollo. Cuando se agrega pulpa de plátano se adiciona al medio principalmente calcio, hierro, fósforo y potasio; además contiene vitamina A, Tiamina y riboflavina, siendo un buen estimulante para el elongamiento de la planta.

INDICE

CONTENIDO	Páginas
AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN.....	III
INDICE.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo General y específicos.....	3
3 HIPOTESIS.....	3
4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
4.1. Generalidades de las Orquídeas.....	4
4.2. Descripción botánica y anatómica de la familia Orchidaceae....	5
4.2.1. Tipos de crecimientos.....	5
4.2.2. Estructuras vegetativas.....	5
4.2.3. Flores.....	7
4.2.4. Frutos y semillas.....	9
4.3. Distribución y Ecología.....	9
4.4. Estado de conservación.....	10
4.5. Importancia.....	11
4.6. Micropropagación de Orquídeas.....	12
4.6.1. Germinación de Semillas.....	14
4.6.2. Control de organismos patógenos durante la Micropropagación.	16
4.6.3. Organismos patógenos externos.....	16
4.6.4. Organismos patógenos internos.....	18
4.6.5. Virus.....	18
4.6.6. Contaminantes bacteriológicos y fungos.....	18

4.6.7.	Factores que afectan a la germinación.....	19
4.7	Reguladores de crecimiento.....	19
4.7.1	Auxinas.....	20
4.7.2	Giberalinas.....	21
4.7.3	Citoquininas.....	22
4.7.4	Agua de coco.....	23
4.7.5	Plátano.....	24
4.7.6	Vitaminas.....	24
4.7.7	Azúcares.....	25
4.7.8	Aminoácidos.....	25
4.8	Trabajos realizados de Orquídeas.....	25
4.8.3	Trabajos sobre Orquídeas de Nicaragua.....	31
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1	Germinación asimbiótica.....	34
5.1.1	Multiplicación de brotes.....	36
5.1.2	Tratamientos que se utilizaron.....	36
6	RESULTADOS Y DISCUSION.....	37
6.1	Germinación in vitro.....	37
6.2	Germinación en medios M Suplementado con agua de coco...	39
7	CONCLUSIONES.....	52
8	RECOMENDACIONES.....	53
9	BIBLIOGRAFÍA.....	54
10.	ANEXOS.....	58



1. INTRODUCCIÓN

En Nicaragua se han realizado diversas investigaciones sobre Orquídeas en taxonomía y anatomía; en 1982 Fritz Hamer elaboró para el Selby Botanical Gardens, el único listado sobre orquídeas de Nicaragua con el que se cuenta. En este se registran 146 géneros, con 678 especies, entre ellas se encuentra el género *Epidendrum* L. (1737), conteniendo 1000 especies de orquídeas en su mayoría de hábitat epifitas, de la subtribu *Laeliinae* de la familia (*Orchidaceae*). Se encuentran por todo el mundo pero particularmente abundantes en la zonas tropicales.

A mediados de 1995, en el Departamento de Biología de la UNAN - Managua; se han Realizado colectas en: Especies de orquídeas con la colaboración y asesoría de la Lic. Teresa Zúñiga, Entre algunos lugares que se han venido realizando expediciones podemos mencionar:

Finca Funde verde en Rio San Juan, volcán Mombacho, (Granada 6 explantes) volcán Masaya, (11 explantes) finca los papales (Jinotega 2 explantes) finca Jesús María (Jinotega 2 explantes) Chacocente, (Rivas 2 explantes) Miraflores, (Estelí 1 explantes) El Zacaton, (Estelí 1 explantes) finca San José, (Sacacoli 1 explantes) Acoyapa, (Chontales 1 explantes) El chocoyero, (Managua 1 explantes), volcán Maderas (Ometepe 3 explantes).

En total se han colectado 255 plantas las que han sido clasificadas y registradas con sus datos, actualmente se cuenta con una colección de 195 plantas vivas, las cuales están en períodos de adaptación (Orquídeas de Nicaragua, 2004).

En la UNAN-León del Departamento de Biología tienen inventarios de orquídeas. Quiroz y Mendoza (2001) realizaron un trabajo de investigación sobre Propagación y aclimatación de *Epidendrum*, en donde se utilizó medios Knudson para la propagación in Vitro, se utilizaron medios con las concentraciones mas adecuadas para que las plantas crecieran y a su vez aclimatarlas en sustratos de fibra de coco, trozos de Jícara y helecho arborescentes, probando cual de los sustratos será mas eficaz para su crecimiento y aclimatación. El sustrato mas adecuado en la aclimatación de las plantas fue



el utilizar fibra de coco, siendo el resultado mayor adaptación y crecimiento de las plantas in Vitro (Quiroz, N y Mendoza, K, 2001)

Las orquídeas del bosque seco del Pacífico de Nicaragua han sido seriamente afectados por la sobreexplotación y el avance de la frontera agrícola cuya diversidad se ha reducido, los reductos que aún quedan deben ser inventariados y realizar acciones tendientes a la conservación y poder identificar especies con algún potencial económico que puedan contribuir a la economía de las comunidades rurales.

En Nicaragua se conocen de algunas experiencias sobre propagación por métodos tradicionales y muy poco sobre propagación in Vitro solo se tiene reporte del trabajo realizado por Quiroz, 2001.

En otros países la propagación in vitro de orquídeas ha dado muy buenos resultados para fines económicos y de conservación. Por lo que con esta investigación se pretende determinar un método de propagación in Vitro de *Encycliaadenocarpon*. Especie propia de nuestros bosques y que el protocolo utilizado luego pueda ser aplicable a otras especies para obtener suficiente material vegetal de las especies de orquídeas en peligro de extinción.

En el futuro se pueda utilizar esta forma de propagación en programas de conservación para la repoblación en el campo así como la propagación de especies con potencial de comercialización.

En Nicaragua es reciente la comercialización de las orquídeas nativas en el mercado interno, las cuales se extraen directamente del bosque, por lo que utilizando esta técnica la obtención de plantas es mayor y se elimina la presión sobre el bosque, además se puede aprovechar de forma racional y sostenible.



2. OBJETIVOS

2.1 General:

Establecer una metodología de Micropropagación de *Encyclia adenocarpon* especie nativa del Bosque Tropical Seco de la Región del Pacífico de Nicaragua que permita su conservación y pueda ser aplicada a otras especies.

2.2 Específicos:

1. Desarrollar un método de desinfección de semilla y germinación asimbiótica de orquídeas en las condiciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNAN León.
2. Evaluar el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS 1960) suplementado con plátano y agua de coco a diferentes concentraciones para la multiplicación de *Encyclia adenocarpon*.

3. HIPOTESIS

El desarrollo de un protocolo, utilizando fuentes orgánicas de vitaminas y hormonas como la pulpa de plátano y agua de coco permitiendo la mayor obtención de plantas in vitro de orquídeas del bosque seco de Nicaragua.



4. REVISION BIBLIOGRAFICA

4.1 Generalidades de las orquídeas

Se cree que las Orquídeas están desde hace unos 200 millones de años en el jurásico, Son originarias de las zonas tropicales y subtropicales, son plantas monocotiledóneas herbáceas que pertenecen al orden Orquidales. Las Orquídeas son la familia más numerosa de los vegetales superiores, debido a su gran capacidad adaptativa; *Orchistomado* del griego que significa testículo, por la apariencia de los tubérculos subterráneos en algunas especies terrestres, del cual se deriva el término Orquídea. En distintas condiciones han evolucionado hasta formar nuevas especies, se estima que pueden existir unas 35,000 especies naturales y unos 15,000 híbridos (Martínez, C M. 2004).

Por más de 3000 años las orquídeas han sido apreciadas en el Lejano Oriente, y su popularización como objeto de cultivo tiene ya mucho tiempo, Chao Shih-Keng publicó un libro dedicado enteramente a esas plantas.

En Occidente, cuando las primeras plantas tropicales fueron importadas a Europa, en el siglo XVIII, cientos de miles de plantas aparecieron en el tránsito de los trópicos americanos a Europa y muchas miles más crecieron en los invernaderos ingleses y los del continente, por ignorancia de sus dueños. Los jardineros exitosos guardaron celosamente sus procedimientos de cómo hacer prosperar aquellas extrañas plantas y llevarlas hasta la floración. Las dificultades de aquellos primeros intentos de cultivo se debieron, principalmente a la idea errónea de que las orquídeas sólo crecían en la oscuridad húmeda y opresivamente cálida de las junglas tropicales, con lo cual las orquídeas obtuvieron la reputación de ser “frágiles parásitas”, poseedoras de casi mágicas propiedades y ser en extremo delicadas (Alvarado, C. 2000).



Existen varios estudios y clasificaciones realizadas en el mundo; sin embargo, en países de América Latina aún se descubren nuevas variedades debido a las variaciones de suelos, climas y alturas. Aunque otros países como Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Países Bajos y Tailandia se dedican a la producción masiva de estas plantas por su alto valor comercial. Los especialistas en esta familia no se ponen de acuerdo en cuanto al número de especies existentes hoy en el planeta, a ellas se suman unas 100 mil variedades creadas por el hombre a partir de interesantes sistemas de micropropagación. (Subgerencia de Desarrollo. A. 2005)

4.2 Descripción botánica y anatómica de la Familia Orchidaceae

4.2.1 Tipos de crecimiento

La familia Orchidaceae se divide en dos grupos, dependiendo del tipo de crecimiento básico que presenten: simpodialy monopodial.

Tipos de crecimiento de Orquideas	
Simpodiales:	Monopodiales:
Origina tallos múltiples.	Origina un solo tallo (principal).
Es de crecimiento más común en la familia.	La planta conforme va creciendo hacia arriba, origina raíces en los nudos, las cuales crecen hacia abajo.
La mayoría pseudobulbos funcionan como reservorios de aguas y nutrientes.	Las plantas conformen van creciendo pierden las hojas inferiores, a medida que se forman nuevas hojas en el extremo superior.
El desarrollo y crecimiento de nuevos tallos se Produce Horizontalmente.	
Ej.: de Orquideas con este tipo de crecimiento Están los géneros Catleya, Dendrobium y Oncidium.	Ej. De Orquideas con este tipo de crecimiento están lo géneros: Ascocentrum, Phalaenopsis y Vanda.



4.2.2 Estructuras vegetativas

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

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

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

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

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



Las hojas de las orquídeas siempre son simples, sus márgenes son enteros (no tienen espinas, ni son aserrados), y por lo general son angostas y alargadas. Las hojas pueden ser basales o caulinares, persistentes o deciduas, varían de una vaina foliácea a una lámina ancha o angosta con o sin pecíolo. Lámina filiforme u orbicular, de membranácea carnososa o coriácea, plegada, convoluta, conduplicada o equitante. En las epifitas, la regla general es la de tener hojas gruesas, con una cutícula de cierto espesor y encerada, que les permite resistir no sólo la depredación por insectos, sino también los fuertes vientos secos de los trópicos y subtrópicos.

Muchas orquídeas poseen hojas muy gruesas que sirven para almacenar agua y por tanto funcionan como tallos. Numerosas especies que habitan lugares muy calientes e insolados, tienen hojas casi cilíndricas para reducir la relación superficie/volumen y evitar así el sobrecalentamiento y la deshidratación. Algunas autótroficas carecen de hojas y las saprofitas normalmente a veces presentan pequeñas brácteas no funcionales para la fotosíntesis (Alvarado, C. 2000).

4.2.3 Flores

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

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



Los pétalos laterales usualmente son estructuras vistosas aunque de menor tamaño que el tercer pétalo (central), modificado para formar el labelo, labio o corneta de la flor. Como los sépalos, los pétalos sirven para atraer polinizadores a la planta, especialmente el labelo, que funciona como plataforma para el aterrizaje de los insectos, por lo cual difiere en forma, tamaño, color y fragancia de los otros pétalos. El labelo da al estereotipo de la flor de orquídea su forma y simetría bilateral. El labelo siempre se sitúa opuesto a la columna, aunque en orquídeas muy evolucionadas, la antera fértil se recurva hacia abajo hasta quedar frontal al labelo.

Las flores de las orquídeas son bisexuales o perfectas. Son notables las excepciones en que las flores son unisexuales (Ej. *Catasetum* y *Cynoches*).

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

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



se adhiere al insecto que, al dejar la flor, arrastra el polinio atado al otro extremo de este sistema (es característico de orquídeas más evolucionadas).

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

4.2.4 Frutos y semillas

Luego de la polinización, los granos de polen germinan sobre la superficie estigmática y los tubos polínicos se extienden hasta el ovario. Si la fertilización no ocurre la cápsula o el fruto detiene su desarrollo y muere, de lo contrario, se desarrollan los embriones. El embrión está rodeado por una cubierta o testa, por lo que necesitan fuentes de nutrición externas hasta desarrollarse lo suficiente como para sobrevivir de una forma autótrofa. En condiciones naturales, estas fuentes de alimento las obtienen de la asociación con hongos (Alvarado, C. 2000).

4.3 Distribución y Ecología

Las orquídeas están distribuidas en todo el planeta, desde la Siberia hasta la Tierra del Fuego, con excepción de los polos y lugares con alturas superiores a los 4,500 metros sobre el nivel del mar (Canelas, 2007).

Muchas son epifitas (crecen sobre otras plantas), se les ve creciendo en bosques tropicales húmedos o en bosques secos o semi-desérticos del planeta. Muchas viven adheridas a las rocas de las laderas de montañas (litofitas) y una buena parte son terrestres, habiéndose adaptado a vivir tanto en los desiertos como en las sabanas inundadas, en campos rupestres o en los valles montañosos. Se les puede encontrar entre las ruinas arqueológicas de Roma, Tiwanaku o Samaipata; a la vera de modernas carreteras o en un rincón poco visitado de algún parque urbano; las hay acuáticas y hasta existe una especie que prefiere vivir bajo la tierra y sólo aparece en la superficie cuando llega el momento de floración. Las orquídeas epifitas son más diversas y abundantes en bosques húmedos pero se encuentran algunas especies en bosques secos y estacionales (Canelas, 2007).



El epifitismo es un fenómeno básicamente tropical. Por ejemplo, en los Estados Unidos de Norteamérica hay muy pocas orquídeas epifitas y las que existen están restringidas a la zona tropical de la Florida. Por el contrario, casi un 90% de las especies tropicales de América son epifitas y sólo el 10% restante son terrestres(Alvarado, C. 2000)

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

4.4 Estado de conservación

Lamentablemente existen pocas medidas para su preservación. Las orquídeas se hallan propagadas por diversas regiones y al alcance de depredadores que merman su existencia, poniendo en riesgo a variedades que aún no han sido registradas ni conocidas por la comunidad científica.

El saqueo indiscriminado, la constante tala de árboles en el trópico para el desmonte, la construcción de caminos, la explotación de pozos petroleros y yacimientos gasíferos, junto a la expansión de cultivos desordenados y la mano de coleccionistas o comerciantes interesados en adquirir ejemplares silvestres, son algunos de los factores que contribuyen al despoblamiento de estas plantas.

Las orquídeas es una planta sobreexplotada y extraída de su hábitat por el valor ornamental, además su hábitat esta cada vez más destruido y degradado.

Ante estos riesgos surgen algunas alternativas de preservación como la propagación de viveros, y la alternativa de la reproducción de orquídeas in vitro, para protegerlas de la devastación y devolverlas en buen número a su hábitat para que sigan su proceso natural de multiplicación.



Mientras que en los viveros, la afición por propagarlas y reproducirlas es comparada con el afán de las abejas por polinizar, los horticultores se hallan estudiando y aplicando diversos sistemas de fecundación y logrando interesantes hibridaciones (Canelas, 2007).

4.5 Importancia

La familia de las orquídeas es el grupo más diverso y extenso de plantas con flores que existe sobre el planeta. La diversidad en tamaño, forma y colores, especialmente de sus flores, las convierte en un atractivo como plantas ornamentales, aunque también se han utilizado como comestibles, aromatizantes y medicinales (Alvarado, C. 2000).

En todo el mundo se usan también diversas especies como ornamentales, de los géneros *Stanhopea* y *Laelia*, debido a la belleza y a los altos costos que alcanzan estas orquídeas. Actualmente las orquídeas, son motivo de cultivo por particulares e industriales con usos de híbridos para que desarrollen plantas ornamentales y la venta de flor cortada, lo que tiene una gran importancia económica a nivel mundial (Asociación Costarricense, 2001).

En muchos países se utiliza la *Vanillaplaniformis* la cual se utiliza para aromatizar bebidas y algunos postres, también se utilizan especies como plantas medicinales por ejemplo, *Arpophyllumspicatum* y *Encyclia citrina* para curar heridas infectadas, ya que tiene un valor médico inestimable o actúan como narcotizantes. La importancia que poseen las orquídeas tiene un enorme valor biológico, estas plantas son parte de una cadena importante de reproducción, además existen otras especies que sirven para la extracción de gomas y mucílagos, hacer adhesivos, aglutinantes para guitarras, algunas de ellas son comestibles, sirven para proporcionar néctar, casa y aroma a insectos polinizadores (Museo Virtual, 2002).

Muchas de las especies que existen en el mundo están en peligro de extinción, el gran valor comercial que poseen ciertas especies de orquídeas han provocado la extracción de individuos silvestres y el mal manejo, y la falta de conocimientos en el cultivo de estas plantas provoca grandes pérdidas de material valioso, con la consecuente erosión genética (Alvarado, C. 2000).



Es importante dar alternativas positivas para propagar las orquídeas, utilizando el cultivo *in vitro* se perfila la reproducción de orquídeas bajo condiciones asépticas controladas. La propagación masiva *in vitro* de orquídeas, ya sea por medio de semillas o tejidos, produce altos niveles de multiplicación en períodos de tiempo cortos, además de que asegura la sanidad del material en multiplicación. Por lo tanto, el cultivo *in vitro* se perfila como una respuesta alternativa para el problema de las especies en peligro de extinción y en el mantenimiento de híbridos de valor (Carrasco, 2007).

4.6 Micropropagación de Orquídeas

La micropropagación es la multiplicación vegetativa *in vitro*; es decir, la obtención de descendencia uniforme (clon) a partir de un fragmento (explante) de la planta madre en condiciones de asepsia (Martínez y Cañamera, 2004).

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en el que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y la nutrición. La capacidad de ciertos tejidos vegetales, como el callo y las suspensiones de células, así como aquellas de varios órganos de plantas tales como tallos, flores raíces y embriones que crecen de manera más o menos indefinida, se han utilizado durante muchas décadas en los laboratorios científicos como un instrumento de investigación.

A estos métodos se les ha llamado colectivamente cultivo de tejidos, una expresión que en ocasiones se usa como sinónimo de micropropagación.

El término cultivo de tejidos vegetales (CTV) se utiliza comúnmente para describir el cultivo *in vitro* de cualquier parte viva de la planta colocada sobre un medio de cultivo artificial, bajo condiciones ambientales controladas.

El cultivo de tejidos vegetales es sencillo de describir. Es necesario de colocar el material vegetal libre de microorganismos en un ambiente que éste y pueda ser mantenido en condiciones estériles, y proveerlo tanto de sustancias químicas



como de regímenes y condiciones de temperatura, presión, atmósfera e iluminación apropiadas para el crecimiento y desarrollo de este material.

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos a la regeneración y propagación comercial de plantas enteras de orquídea es un desarrollo más reciente que se ha convertido en una alternativa importante de los métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies (Hudson, H. y Dale, K. 1997).

El descubrimiento de micropropagación mediante el cultivo de puntas de tallo resultó de los intentos de obtener plantas libres de virus a través de aislamiento de meristemas no infectados. Usando este procedimiento para las Orquídeas *Cymbidium*, Morell 1955 descubrió que las puntas del tallo proliferaban para formar masas de protocormo, los cuales podían ser divididos y vueltos a cultivar para producir nuevas plantas. Como la multiplicación tradicional de clones de orquídeas por división es muy lento, el potencial de la propagación vegetativa se aumentó grandemente. A partir de entonces, los procedimientos de Morell se han aplicado a muchas especies vegetativas.

A grandes rasgos, la micropropagación implica la selección de semillas y el aislamiento de una parte de ella ya germinada, el cual después de someterse a una desinfección se coloca en un medio de cultivo en donde dará origen a embriones o brotes y finalmente a plantas completas (Barba, A. et al. 2001).

La multiplicación in Vitro de orquídeas a través de los métodos convencionales de propagación asexual, ha sido rápida. Esto ha motivado que aumenten las investigaciones sobre factibilidad de usar el cultivo in Vitro, tanto para especies difíciles de propagar, como en aquellas que tienen un bajo porcentaje de éxito por métodos tradicionales (León Martínez, M. 1995).

La reproducción artificial de las Orquídeas es el único método apropiado para la explotación a grandes escalas. Estos métodos son practicados en muchos países dejando grandes beneficios. Los métodos de reproducción pueden ser por germinación de embriones in Vitro o por desarrollo de meristemas, ambos métodos



son practicados en el desarrollo de investigaciones. Debido al prolongado tiempo que demandan estas pruebas es necesario implementar estas prácticas, su largo y frágil período reproductivo, logra que de un millón de semillas solamente germinen 10 a 20 y alcancen a ser adultas 1 o 2, todo este ciclo puede durar hasta dos o tres años, lo que nos indica que una población de Orquídeas afectadas dentro de un bosque, puede durar mucho tiempo en restablecerse, por lo que con un mal manejo este recurso se vería afectado rápida e irreversiblemente (León Martínez, M. 1995).

4.6.1 Germinación de Semillas

Las Orquídeas conforme han ido evolucionando y modificado enormemente las características de su flor, estas han adquirido distintas formas y aspectos para atraer a la más variada gama de polinizadores. Una vez que el fruto es fecundado, comienza a desarrollarse hasta madurar meses después, posteriormente su capsula se abre dejando en libertad millares de pequeñísimas semillas, estas se dispersan por el viento por centenares de kilómetros, en busca de un sustrato adecuado en donde puedan formar una relación simbiótica con un hongosimbiótico: *Rhizoctonia* sp para realizar intercambio de sustancias nutritivas durante varios meses; Sin esta relación simbiótica la germinación de una nueva plántula no sería posible (Carrasco, et al. 2007).

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas. Se producen en cantidades elevadas por cápsula 1,300 – 4,000 semillas. Constan de una testa gruesa, que encierra un embrión de alrededor de 200 células. La cubierta tiene un aspecto exterior característico, en forma de red, que es diferente para cada especie. La testa está formada por un tejido muerto, compuesto hasta en un 96% de aire, de tal forma que cada semilla puede ser considerada como un auténtico globo (Pahl, Jan. 2000).

La germinación de las semillas de orquídeas, según se puede describir de la siguiente forma:



El embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen. Después se inicia la división celular, rompiendo el embrión de la cubierta seminal. A continuación se forma una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células, y sobre aquel se puede distinguir un meristemo del vástago. Luego se diferencia los órganos (meristemo del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comienza un período de crecimiento intenso.

Si el protocormo está expuesto a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo se desarrolla hojas. Como resultado de la formación de la clorofila de planta se hace autótrofo. Luego se forman las raíces verdaderas en forma endógena. Posteriormente el protocormo y los rizoides pierden su misión nutritiva y desaparecen (Adricana, M. etal. 2007).

El uso del cultivo *in vitro* para hacer germinar semillas enteras puede ser prácticos con semillas muy pequeñas. En las orquídeas los sistemas de cultivo aséptico se han usado comercialmente desde hace años como un procedimiento de propagación estándar. En 1962 Murashige y Skoog reportó que estos organismos podían ser reemplazados por un sistema de cultivo *in vitro* utilizando un medio simple de sales minerales y sacarosa, revolucionando así la producción de orquídeas, ya que se han cultivado semillas de bromeliáceas con medio (MS), excepto que las semillas se colocan en un medio de cultivo líquido en un agitador, cambiando el medio cada 7 días, hasta que germinan (Carrasco, S. etal. 2007).

La siembra *in Vitro* permite germinar embriones inmaduros de orquídea, la germinación y el desarrollo es más eficiente, ya que se realiza en un ambiente acondicionado, y sin competencia con hongos y bacterias. Se reproducen semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de gel nutritivo, azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan (Epidendrum. 2005).

4.6.2 Control de Organismos Patógenos durante la micropropagación



Un aspecto principal de la micropropagación es el control de los organismos patógenos. Para obtener un cultivo completamente estéril se deben eliminar los organismos patógenos presentes en el explante.

También se deben eliminar los organismos patógenos internos endógenos en la fuente específica de material, pero es posible que estos no se detecten mientras el explante y los propágulos subsiguientes estén creciendo en los medios de cultivo (Hudson, H y Dale K. 1997).

4.6.3 Organismos patógenos externos

Los contaminadores externos incluyen hongos, mohos, bacterias, levaduras y otros microorganismos, que se encuentran presentes literalmente en todas partes: en el aire en la superficie de las plantas, mesas, manos y demás.

Las esporas de estos organismos se mueven en las corrientes de aire, en particular sobre las partículas de polvo. Para controlar esos organismos, se deben desinfectar los explantes, las herramientas y las áreas de trabajo para remover tales contaminantes de sus superficies. Todo este trabajo debe hacerse en áreas especiales de transferencia en las cuales se eliminen todos esos contaminantes y se hayan tomado precauciones para prevenir la recontaminación.

La reducción de los contaminantes superficiales comienza con el control de las plantas madres utilizadas como fuentes de explantes. De ordinario los contaminantes están presentes solo en la superficie de las partes de plantas, aunque puedan estar alojados en grietas, entre las escamas de las yemas o en otras partes y a veces resulta bastante difícil eliminarlos.

Las estructuras internas, como los puntos de crecimiento de las yemas y el interior de las semillas, tienden a estar relativamente libres de organismos patógenos. Sin embargo, si la planta está creciendo en una atmósfera húmeda, los micelios pueden invadir el interior de la misma y convertirse en un sistema persistente.



El interior de las cápsulas de orquídeas se mantiene estéril si las cápsulas están intactas. Entonces, si se esteriliza la parte exterior de las mismas, donde hongos y bacterias pueden desarrollarse, y se abre las cápsulas bajo condiciones de esterilización las semillas podrán mantenerse desinfectadas. La ventaja de este método es que no se requiere de la esterilización de las semillas, lo que podría provocar su deterioro. Además, algunas semillas tomadas de cápsulas casi maduras podrían germinar más rápido que las provenientes de cápsulas maduras a causa de los mecanismos de dormancia (Hudson, H y Dale K. 1997).

La desinfección requiere el empleo de materiales químicos que son tóxicos para los microorganismos pero relativamente inocuos para el material vegetal. El cultivo de tejidos se volvió posible con el descubrimiento de desinfectantes efectivos y de empleo cómodo, tales como los hipocloritos de calcio y de sodio. Tanto la efectividad del tratamiento como el daño de tejido viviente aumentan como respuesta al tiempo – dosis, de manera que se debe buscar un equilibrio efectivo de esos factores.

Algunos alcoholes (etílicos, metílico, o isopropílico) en concentraciones del 70 al 75% se emplean ampliamente como desinfectantes, pero son muy tóxicos para el material vegetal, de manera que su empleo está restringido a enjuagues de corta duración y a la esterilización de superficies externas de donde se obtienen los explantes y semillas (Norca, L y Gil, S. 2003).

4.6.4 Organismos patógenos internos

Los organismos que están presentes en el interior del tejido del explante en la época en que se va a cultivar presentan un problema más serio. Una de las razones primordiales para el empleo de procedimientos de micropropagación es la posibilidad de producir materiales libres de organismos patógenos. Sin embargo, diversos investigadores de este campo han prevenido que no se debe dar por descontado que los materiales están exentos de organismos patógenos a menos que se utilice un procedimiento específico de



catalogación o de otro tipo de detección como parte del procedimiento (Hudson, H y Dale K. 1997).

4.6.5 Virus

Los virus y los organismos de tipo virus pueden estar presentes en los tejidos de las plantas, sin que se muestren síntomas específicos. Algunos virus han inhibido fuertemente su crecimiento en medios de cultivo. Para separar los explantes de los virus que haya en el resto de la planta, se toman las puntas meristemáticas de los brotes. Este procedimiento se puede combinar con calor y otros procedimientos de descontaminación.

4.6.6 Contaminantes bacteriológicos y fungosos

Ciertos contaminantes bacterianos, como *Bacillus subtilis*, *Erwinia* o *Pseudomonas*, algunas veces están presentes en el interior de la plantita pero no crecen con facilidad en el medio de cultivo, ya sea porque este se encuentra más ácido o porque a veces hay presencia de la hormona citokinina y reduce su crecimiento. Estos contaminantes pueden inhibir grandemente su crecimiento y enraizar o pueden permanecer suprimidos sin efecto hasta que el explante es transferido a un nuevo medio de cultivo.

Un procedimiento útil es efectuar cultivos de catalogación de porciones de plantitas individuales y eliminar aquellas cuyos recipientes muestran resultados positivos para la presencia de organismos patógenos. Sin embargo, aplicando este procedimiento en la etapa inicial de explante, no siempre se logra identificar todos los contaminantes potenciales (Hudson, H y Dale K. 1997).

4.6.7 Factores que afectan la germinación y al crecimiento en el laboratorio:

Los factores complejos que influyen la germinación y el crecimiento de orquídeas, además dependen en gran medida de la especie:

1 -La temperatura: Las semillas germinan a 20- 25°C.



2 -Luz: La duración del día es de 12-16 horas (tubos fluorescentes) se aconseja una irradiación baja de 2.5-10 w/m².

3 - Gel Rait.: La concentración recomendada es de 0.6 - 0.8 % (Bacto-Agar-Difco).

4 - Minerales: Es recomendable utilizar un medio que contenga micro-macro nutrientes.

Las orquídeas generalmente necesitan hierro para germinar y es muy probable que necesite Magnesio. Las orquídeas terrestres requieren un medio, pobre en sales, mientras las epifitas necesitan un medio más rico en sales.

5 - Azúcares: Es importantes como fuente de energía, especialmente para las semillas que germinan en la oscuridad. Por lo general se emplea sacarosa, a veces se utiliza una mezcla de glucosa y fructosa.

6 - ph: Debe situarse entre 4.8-5.7. Un pH más bajo de 4 o más alto de 7 resulta muy desfavorable.

7 - Vitaminas: Es necesario añadir las siguientes vitaminas: biotina, ácido Nicotínico, vitamina C, piridoxina, ácido pantoténico.

4.7 Reguladores de crecimiento

Generalmente los reguladores no son necesarios para la germinación de las semillas, ya que pueden producir efectos no deseados (formación de callos, o vástago adventicio). Concentraciones bajas de IBA y NAA, a veces estimulan el crecimiento de las plántulas de *Epidendrum*, *Catleya* y otras especies.

Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de las plantas actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales (reguladores endógenos) existen numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo "in vitro". Para la multiplicación vegetativa se puede utilizar el homogenizado de agua de coco. Los efectos estimuladores de estas mezclas se explican por su contenido, ya que estos



ayudan a la multiplicación y crecimiento de plantas proporcionando vitaminas, azúcares y aminoácidos (García, M. et al, 2006).

4.7.1 Auxinas:

Son compuestos que tienen un núcleo indólico, éste se sintetiza a partir del aminoácido Triptófano que se sintetiza por la vía Shikímica, la principal auxina es el ácido 3-indolacético (AIA), pero también se pueden emplear el ácido 3 – indolpropiónico (AIP) y el ácido 3- indol butírico (AIB), aunque son auxinas relativamente débiles. Otros compuestos sintéticos pueden comportarse como auxinas muy débiles (ácido fenilacético) o fuertes: ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), etc. El 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) es una auxina muy fuerte.

El ácido picolínico (picloram), aunque con una estructura química diferente, produce en ocasiones efectos morfogenéticos comparables a los del 2,4-D; se emplea a concentraciones muy bajas.

Las propiedades de las distintas auxinas son diferentes. El AIA es la auxina natural más difundida en las plantas, es ampliamente utilizado en los medios de cultivo pero es sensible a la degradación enzimática (AIA-oxidasa) y a la fotooxidación. El ANA es una auxina fuerte que se utiliza para inducir la rizogénesis, a veces en asociación con el AIB.

El 2,4-D es una auxina muy fuerte, tóxica a concentraciones elevadas, que es un fuerte activador de la actividad meristemática; su empleo es amplio, muchas veces ligado a citoquininas, en trabajos de cultivos celulares, cultivos de tejidos, embriogénesis somática, etc.



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

Otros efectos auxínicos son: inducen la rizogénesis, pero a su vez indirectamente “inhiben” el crecimiento de las raíces; intervienen en la dominancia apical de las yemas, en el desarrollo del fruto (transformación de las paredes del ovario para formar las paredes del fruto). También inducen la floración de la orquídea y son responsables de los tropismos de las plantas.

Por otra parte, se ha descrito que las auxinas tienen un efecto marcado sobre la actividad enzimática, por ejemplo: incrementan los niveles de la enzima que condensa el citrato, inhibe la decarboxilación del piruvato y del α -cetoglutarato; tienen un efecto indirecto sobre la RNA – polimerasa; inhibe la enzima indol–etanol-oxidasa que ejerce un control feedback de la síntesis de AIA (García, M. et al. 2006).

4.7.2 Giberelinas:

Las giberelinas son dipertenos (con C_{20} ó C_{19}), derivados de la vía isoprenoide, con una estructura básica denominada esqueleto gibánico o giberelano; la giberalina más difundida es el AG_3 – o ácido giberélico. Se denominan con las letras AG_n y un subíndice que indica el orden de su descubrimiento, dado por las moléculas con sus radicales sustituidos (H^+ , CH_3^+ , OH^- , etc); en la actualidad se conocen más de 90 giberelinas diferentes, aunque en una misma planta pueden encontrarse solo algunas de ellas.

Estas fitohormonas endógenas se emplean poco en cultivo “in vitro” ya que hay numerosas experiencias que indican un efecto inhibitorio sobre la organogénesis y, particularmente, la rizogénesis. Sus efectos varían según su concentración y el material



vegetal. Se han reportado efectos sinérgicos entre las giberelinas, con las auxinas y citoquininas en trabajos "in vitro".

Las giberelinas provocan el alargamiento celular; eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla de cereales mediante la inducción de la producción de la α -amilasa; inducen la floración de plantas de días largos; eliminan la dormancia de las yemas y semillas; intervienen en la tuberización (García, M. et al, 2006).

4.7.3 Citoquininas:

Las citoquininas son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, que se han reportado en pequeñas cantidades en el agua de coco, jugo de tomate, extractos de flores, tubérculos y nódulos radicales, en frutos y semillas inmaduras de maíz (zeatina) hidrolizadas de tRNA de plantas o microorganismos (Hormonas de las plantas. 1999).

Entre las citoquininas naturales tenemos la zeatina, la isopentenil-adenina (IPA), la dimetil amino-purina, la dihidroxizeatina, la metilzeatina. Son citoquininas sintéticas la kinetina (KIN: 6-furfunil aminopurina) el BAP o BA (N-6- bencilaminopurina o N6-benciladenina). Recientemente se ha descrito que la N-6- bencilaminopurina (BAP) o N6-benciladenina (BA) ha sido aislada de plantas y constituye también una citoquinina natural.

Además de esas citoquininas derivadas de las purinas, han sido descritas otras citoquininas no purínicas como el thidiazuron (TDZ) y el CPPU (N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenil urea. Estos compuestos tienen una actividad histoquímica muy alta y son muy eficientes en las plantas maderables.

En cultivos de tejidos, el BAP y las citokininas sintéticas Kinetina y TDZ (thidiazuron) son las más frecuentemente usadas.



Estimulan la división celular (cariocinesis) en cultivo de tejidos vegetales y tienen un efecto sinérgico en este sentido con las auxinas. Por esta razón, una forma de evaluar un efecto citokinina es mediante el estudio del incremento en peso seco.

Se han reportado otros efectos de las citoquininas, por ejemplo: estimulan el alargamiento celular de discos de hojas etioladas; inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos "in vitro" (morfogénesis); controlan la formación de proplastidios en cloroplastos; mantienen la maquinaria de síntesis de proteínas mediante la regulación de la síntesis del RNA; retrasan la senescencia.

Las citoquininas que se usan con mayor frecuencia en los medios de cultivo son: la kinetina (KIN), la 6-bencilaminopurina (BAP), la 2-isopenteniladenina (IP) y la zeatina. El BAP se emplea con frecuencia debido a su gran actividad y su bajo costo. Generalmente las citoquininas se evitan o se emplean en dosis muy débiles en los medios de enraizamiento porque presentan un efecto inhibitor sobre la rizogénesis(García, M. et al, 2006).

Otras:

4.7.4 Agua de coco

Es el líquido que se halla en el interior de la pulpa; cuanto menos maduro esté el fruto más abundante será y también más rico en nutrientes.



Contenido nutricional del agua de coco (Martínez, C. M. 2004).

Elemento	Contenido	Elemento	Contenido
Energía (Kcal.)	20	Cloro (mg)	20
Proteínas (g)	0.1	Calcio (g)	5
Carbohidratos (g)	5.5	Fósforo (mg)	0.4
Lípidos (gr.)	0.05	Magnesio (mg)	0.45
Sodio (mg)	25	Vitamina E (mg)	0,7
Potasio (mg)	160	Acido fólico (mg)	26

4.7.5 Plátano

El plátano constituye una de los alimentos más milagrosos que nos ofrece la naturaleza, riquísimo en nutrientes, especialmente potasio, vitamina B6 y ácido fólico.

Contenido nutricional del plátano (Lezama, F. 2004).

Elemento	Contenido	Elemento	Contenido
Calorías	85 Kcal	Ac, nicotínico	0.6 mg
Agua	75.7 g	potasio	420.0 mg
Proteínas	1.1g	Calcio	8.0 mg
carbohidratos	22.0 g	magnesio	31.0 mg
Fibras	0.6 g	hierro	0.7 mg
Vitaminas A	190 UI	Cobre	0.2 mg
B1	0.05 mg	Fosforo	28.0 mg
B6	0.32 mg	Cloro	125.0 mg

4.7.6 Vitaminas:



Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos “in Vitro” y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

4.7.7 Azúcares:

Los tejidos y células cultivadas “in vitro” son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Luego, resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo, siendo los dos más utilizados la sacarosa y la glucosa.

La concentración óptima del azúcar en los medios de cultivo varía entre 20 – 80 g/L, en dependencia del tipo de cultivo, material vegetal, etc. Los azúcares presentan una acción metabólica y energética. Otros autores vinculan la necesidad de azúcares con problemas osmóticos o de un efecto indirecto sobre el metabolismo de los reguladores endógenos.

4.7.8 Aminoácidos:

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa “in Vitro”. Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general (Rodríguez, 2005).

4.8 Trabajos realizados en micropropagación de orquídeas

Mediante el cultivo de orquídeas se han utilizado especies silvestres Cubanas en el menor tiempo, para ello se utilizaron cápsulas de 21 especies. Para lograr el objetivo propuesto se evaluaron indistintamente los factores: medios de cultivo, estado de



madurez 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*, *Campylocentrummicranthum*, *Encycliagravida*, *Encycliaoxypetala*, *Encycliaphoenicea*, *Epidendrumdifforme*, *Epidendrumnocturnum*, *Epidendrumsecundum*, *Epidendrumwrigthii*, *Eulophia alta*, *Oeceocladesmaculata*, *Oncidiumluridum*, *Prosthecheacochleatay Schomburgkialyonsii*. 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 vitro plantas.

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 (Rojas, L. et al. 2005).

Se han elaborado investigaciones de orquídeas Mexicanas de la especie *Mormodesmaculata*, ya que esta especie está amenazada y es endémica de los estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz. Con esta especie se realizó la micropropagación a través de cultivo in vitro de protocormos, se establecieron seis tratamientos en el medio nutritivo Murashige y Skoog (1962), adicionado con concentraciones diferentes de 6-benzilaminapurina (6-BAP). La prueba de comparación de medias señaló que el medio de cultivo MS más BAP 5 MG/l presentó el mayor número de formación de Plúmulas, presentando leves diferencias significativas con el medio que contenía 2mg/l de BAP (Carrasco. S. et al. 2007).

Alvarado Ulloa hizo un estudio sobre Micropropagación de *Cattleyaskinneri* y *Cattleya máxima* por cultivo de ápices, en donde se inocularon ápices con 3 a 4 primordios foliares provenientes de brotes laterales de plantas de *Cattleyaskinneri* y *Cattleya máxima*. Previamente fueron sometidos a 4 tratamientos de desinfección, siendo el más efectivo el que consistió de una doble desinfección con NaOCl (al 3% y 1%, por 10 y 20 minutos, respectivamente) con una previa inmersión en alcohol 95% por 5 minutos.



Las soluciones de NaOCl se utilizaron con 0,5% de Physan 20; antes de la inoculación en medio aséptico se sumergieron en Ácido Cítrico (100 mg/l) sin resultados efectivos, produciéndose una gran mortalidad de explantes. El medio líquido resultó ser el más efectivo en las etapas de introducción y multiplicación, mientras que el medio semisólido en la etapa de enraizamiento. *C. skinneri* respondió mejor en medio MS (1962) complementado con 0,1 mg/l ANA, 0,2 mg/l KIN y 15% v/v Agua de Coco en la formación de cuerpos protocórmicos, comportamiento contrario a *C. skinneri* x *C. maxima* que mostró una mejor en medio Knudson C (1946) modificado.

La separación de brotes adventicios fue la forma más efectiva de propagación en medio de multiplicación suplementado con 0,18 mg/l ANA, 0,22 mg/l KIN y 15% v/v Agua de Coco). El mayor índice de brotación lo presentó *C. skinneri*. Tanto esta especie como el híbrido respondieron mejor en medio Knudson C (1946) modificado de acuerdo al índice de brotación. La etapa de enraizamiento sólo se realizó en vitroplantas de *C. skinneri*, las cuales se cultivaron en medio Knudson C (1946) con el 50% de la concentración de sales y sin reguladores de crecimiento.

Aunque el enraizamiento se dio tanto en medio líquido como semisólido, fue este último el que indujo mayor crecimiento vegetal y número de raíces (Alvarado, 2000).

4.8.1 Orquídeas de Nicaragua

Nicaragua se ubica en la parte central del istmo centroamericano, entre el Mar Caribe y el Océano Pacífico, limitando al norte con la República de Honduras y al sur con la República de Costa Rica. La posición geográfica de Nicaragua, hace que este territorio sea un área importante para el intercambio de biotas septentrionales. La familia Orchidaceae es el grupo vegetal que más especies aporta a la flora nicaragüense, a la vez, en el campo botánico, es uno de los taxones más conocidos en el país, sin embargo, no se encuentra suficientemente estudiado e inventariado. Hoy en día, en Nicaragua, es frecuente encontrar orquídeas creciendo sobre árboles a las orillas de caminos, pasando desapercibidas a la vista de muchos nicaragüenses (Rodríguez, O. 2001).



Las orquídeas se encuentran ampliamente distribuidas por todo el país, siendo más abundantes y diversas en los bosques húmedos. La distribución y dominancia de la especie está en dependencia principalmente de las condiciones climáticas y su distribución altitudinal.

4.8.2 Diversidad

En Nicaragua no podemos decir con precisión cuántas especies de Orquídeas existen, debido a que en gran parte del territorio no se habían podido realizar investigaciones. Se estima que más del 60% de las zonas montañosas del país se encuentran sin inventariar. Hasta el día de hoy, se contabilizan 146 géneros, con 678 especies. (Hace unos 30 o 40 millones de años, el Norte de Nicaragua era el límite más al sur de América, por lo que se considera una barrera física para la dispersión de los animales y las plantas de la época. Esta particularidad del territorio juega un papel muy importante en la distribución geográfica de las Orquídeas, A pesar de esto, Nicaragua es el único eslabón sin estudiar las Orquídeas de Centro América)

El género más numeroso de la Orquídeas en Nicaragua está representado por las *Pleurosthalis* con 54 especies de las formas mas variadas, estas las podemos encontrar distribuidas por todo el país principalmente en los bosques húmedos. El género que le sigue en cantidad, son los *Epidendrum* con 47 especies. La especie mas dominante en el pacifico es el *Epidendrumstanfordianum* y en el bosque húmedo es el *Epidendrum scriptum*. Las especiales *maxilarias* cuentan con 39 representantes, las *Encyclias* con 26 especies bien representadas por las *Encycliaadenocarpon* y las *Encycliaschacaoensis* y *cochleata*, los *Oncidium* son el quinto género más grande con 21 especies, entre los que destaca por su belleza el *Oncidiumampliatum*, *Oncidiumoligantum*, *splendidum* y el *Oncidium crista-galli*, entre otras más (Orquídeas de Nicaragua, 2004).

La diversidad de Orquídeas que se encuentra en Nicaragua, nos muestra plantas de distintos aspectos, las hay muy pequeñas o bien miniaturas como las *lepanthes*, *Dráculas* o *Pleurosthalis*. También existen plantas grandes con flores muy llamativas y exóticas como las *Stanhopea* la *Cattleya* o las distintas



Sobralias, Laelias, Myrmecophyla, Chysis y Lycastes entre muchas más; Tenemos también especies apreciadas por los más exquisitos coleccionistas: *Lonopsis, Cycnoches, Notylia, Trycophila*.

Las Orquídeas conforme han ido evolucionando han modificado enormemente las características de su flor, estas han adquirido distintas formas y aspectos para atraer a la más variada gama de polinizadores. Una vez que el fruto es fecundado, comienza a desarrollarse hasta madurar unos meses después, posteriormente su capsula se abre dejando en libertad millares de pequeñísimas semillas estas se dispersan por el viento por centenares de kilómetros, en busca de un sustrato adecuado en donde puedan formar una relación simbiótica con unos hongos micorrizas para realizar intercambio de sustancias nutritivas durante varios meses; sin esta relación simbiótica la germinación de una nueva plántula sería imposible.

Su largo y frágil período reproductivo de millones de semillas solamente germinan 10 o 15 y alcanzan a ser adultas 1 o 2, todo este ciclo puede durar hasta dos o tres años, lo que nos indica que una población de Orquídeas afectadas dentro de un bosque, puede durar mucho tiempo en restablecerse, por lo que con un mal manejo este recurso se vería afectado rápida e irreversiblemente. Sobre todo si incluimos efectos adversos como depredación natural, enfermedades por hongos o bacterias, sequías, incendios tala indiscriminada y contrabando de especies (Orquídeas de Nicaragua. 2004).

Encyclia:

Este es un género de 242 especies de orquídeas epífitas que se han reclasificado procedentes del género *Epidendrum* de las que difieren en los bulbos parecidos a las *Cattleya* y en la estructura de las flores. Se encuentran en Centroamérica, y Caribe, donde por las noches llena el aire con las fragancias de su perfume parecido a los cítricos.



Este género es de plantas epífitas. Está muy próximo a *Cattleya* con las que solo tienen de diferencia el número de polinia que en este género es de 4 que están fuertemente unidos a la caudícula. Los tallos son normalmente cortos.

Los pseudobulbos de unos 6 a 30 cm de longitud, son estrechos con forma de lapiceros, y están claramente separados. Cada pseudobulbo desarrolla una hoja cerea y aspecto de cuero de unos 20 cm de longitud.

La inflorescencia son flores pequeñas de menos de 4 cm. de diámetro. La columna no tiene pie, y no está adosada al Labelo en la mayor parte de su longitud. Con unos sépalos y pétalos largos y estrechos. El labelo de color blanco ó crema forma un tubo que abraza rodeando por la parte superior a la columna. El extremo del labelo con forma trapezoidal muy ancho. La *Encyclia* en distribución y hábitat es epífita y se encuentra en las tierras tropicales de Centroamérica, y en el Caribe en bosques de montaña (Orquídeas de Nicaragua, 2004).

En este trabajo se realizó con la especie siguiente la cual fue colectada en el Bosque seco de Nicaragua:

Encyclia adenocarpon (La llave & Lex) Schltr.

Epífitas; pseudobulbos ovoides o ligeramente piriformes, 3 cm de largo y 2.2 cm de ancho, revestidos con largas vainas blancas, 1- ó 2-foliados. Hojas 25 cm de largo y 0.9 cm de ancho, acuminadas, coriáceas, a veces rojizas. Inflorescencia una panícula de 30 cm de largo, con muchas flores amarillo-verdosas con nervios rojos, el labelo cremoso con 3 nervios violetas y cortos en el centro del lobo medio; sépalos 20 mm de largo y 6 mm de ancho, ápice verrugoso, eroso y apiculado; pétalos espatulados, 18 mm de largo y 5 mm de ancho, ápice verrugoso y apiculado, angostamente unguiculados; labelo 3-lobado, 15 mm de largo y 13 mm de ancho, los lobos laterales 8 mm de largo y 3 mm de ancho, oblicuamente patentes y apenas abrazando la columna, ápice redondeado, el lobo medio suborbicular, 9 mm de largo y 11 mm de ancho, con ápice retuso, borde ondeado, disco con un callo obovado grande que cubre todo el istmo y se extiende desde la base del



labelo hasta la base del lobo medio, ápice 3-denticulado y base con 4 dientes, disco del lobo medio con nervios radiantes; columna clavada, 8–10 mm de largo, gruesa, con 2 alas truncadas en la porción apical; ovario 3 cm de largo, densamente verrugoso, rojizo, pedicelado.

Muy común, en campos secos y abiertos, en todo el país; 15–1200m nsm; florece Abril–Junio, (Mayo) Agosto –Enero.

Esta especie se distingue por el ovario y el pedicelo verrugoso, el pedúnculo y el raquís papilosos, los lobos laterales del labelo redondeados y no triangulares y la columna conspicuamente alada sin proyecciones o puntas (Flora de Nicaragua, 2001).



Foto de plantas de *Encyclia adenocarpon* e inflorescencias creciendo en plantas de jicaro en el Bosque seco de Salinas Grandes, León, Nicaragua.

4.8.3 Trabajos sobre orquídeas de Nicaragua

En el país se han realizado diferentes tipos de investigaciones sobre las orquídeas del territorio nacional, como son los estudios realizados por la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León), titulado Plantas Epifitas de la Reserva Biológica Indio-Maíz (Rio San Juan), la cual consistía en agrupar las plantas Epifitas en la reserva, dichas plantas se agruparon en 29 familias, entre ellas se encuentran las orquídeas. Con este estudio se logró aumentar la colección de plantas Epifitas en el Herbario de la UNAN-León en base



ala observación de campo, se reportan especies de Orquídeas para ser explotadas económicamente, entre ellas se encuentran *Lephanthes*, *Pleursothalis*, las majestuosas *Estanhopeasy Sobralias*, que cubren la corteza de las ramas y los árboles que luchan entre sí por recibir un poco de luz.

Entre otras investigaciones realizadas en UNAN-León, se encuentran:

Orquideas más comunes de Rancho Grande realizada en Matagalpa, de Galeano R, (2000), Evaluación de la población de orquídeas en la Finca Funde Verde realizada en Rio San Juan (Baca, R y Velazquez.1995).

Se realizo una investigación sobre Micropropagación de Orquídeas del genero *Epidendrum* con material extraído de Honduras, esta tesis fue realizada en la UNAN-León, Con esta investigación se logró establecer un protocolo para micro propagación de Orquídeas, atreves de la evaluación de tres medios de cultivo:Medio Knudson, que contenía 2.00mg/ l de BAP y 20g de pulpa de plátano, manifestando este medio un mayor efecto en la tasa promedio de proliferación de 4:1.

Medio Orchimax conformado por sales minerales, vitaminas y hormonas reguladoras, diferenciado de los otros medios por la presencia de 2000ml/l del compuesto triptona, enriquecido con 20 g de pulpa de plátano. En este medio se obtuvo mayor crecimiento con un promedio de altura de 1.0625 cm.

Medio 10-56 al igual que los otros medios presenta sales minerales, vitaminas y hormonas reguladoras, diferenciándose por el contenido de 0.5mg/l de ANA la que permite el crecimiento de plantas cultivadas in vitro y asimilándose al cultivo por presentar 2000ml/l del compuesto carbón activado que ayuda al crecimiento de raíces. A diferencia del medio Orchimax, el medio 10-56 obtuvo menor crecimiento con un promedio de altura de 1.024 cm. Se logro aclimatar las plantas obtenidas in vitro de *Epidendrumsp* en el invernadero del laboratorio de cultivo de tejidos de la UNAN-León, en donde se demostró que el sustrato que contiene coco es el mas apto para aclimatar dichas plantas (Quiroz y Mendoza. 2001).



Alarcón, B2007, realizó una investigación de propagación artesanal de Orquídeas y bromelias en el área protegida de La Reserva Tisey-Estanzuela. Estelí, para optar al Título de Licenciada en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León).

En la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN- Managua), se estima que la familia Orchidaceae podría superar las 1000 especies, lo cual es justificado por que las expediciones orquidológicas solamente han explorado un 40% del territorio nacional, quedando una buena parte territorial sin inventariar, especialmente las pluviselvas de la zona atlántica y las nebliselvas de la zona norcentral, los cuales son biomas nacionales con alta diversidad de orquídeas. (Rodríguez, 2001).

Patrick Werner (2005), experto en Orquídeas, quien ha hecho estudios taxonómicos en el país durante 12 años, asegura que en Nicaragua hay 50 especies de gran valor comercial y que en 20 años no van a existir, según el ritmo que lleva la degradación de la tierra. En sus estudios Nicaragua posee cinco especies del género *Cattleya*, cuyo valor comercial es grande en el mundo de las plantas ornamentales. Sobre la variedad Stanhopea, asegura que hay 8 especies, la *Zygopetalum* ofrece 6 especies distintas, de la *Encyclia* y *Oncidium* hay 5 especies, así mismo mencionó la especie *Maxillaria* o Sobralias, de las que hay 14 especies. Entre otras, señaló dos clases de orquídeas tipo enanas, la *Dracula* y la *Masdealia*, de las que hay 5 especies.

En su largo recorrido por las montañas de la Cordillera de Dipilto, Estelí, el Mombacho, Ometepe, Managua, Las Segovias, entre otros, logró capturar con el lente de su cámara 1,000 flores. A criterio de Werner, Nicaragua posee mejores tierras y flores más lindas que en otros lugares del mundo, ya que existen en todo el país unas 800 especies, de las que ya identificó 600 (Orquídeas de Nicaragua 2002).



5. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León), localizado en la finca el Ojoche ubicado a 1km al oeste del Politécnico La Salle, en el periodo comprendido de Febrero del 2007 a Julio del 2008. El material vegetal que se utilizó para la multiplicación in Vitro fue a partir de semillas de capsulas maduras de *Encycliaadenocarpon* obtenidas a partir de semillas germinadas, las cuales fueron colectadas en el Bosque seco de Salinas Grandes (León) y en el bosque Seco en Teustepe, Boaco.

El trabajo se realizó en dos etapas:

5.1 Germinación asimbiótica.

Para lograr la germinación in vitro de la especie en estudio se ha realizado en un medio, Murashige y Skoog (1962) no necesita la presencia de un hongo, sino que se les da la germinación adecuada (germinación asimbiótica). En esta etapa de germinación se estableció el método de desinfección del material in vitro, luego se establecieron diferentes medios para la Micropropagación.

5.1.1 Desinfección del Material Vegetal.

Cápsulas maduras. Se utilizaron capsulas maduras las cuales se lavaron con agua y jabón utilizando una esponja, se enjuagan con agua corriente, se colocan en alcohol por 30 segundos, después se eliminó el alcohol y se colocaron en hipoclorito de sodio al 1,6 %, agregando dos gotas Tween 20 por cada 100 ml, luego se deja en agitación por 20min. Luego se transporta a la cámara de flujo laminar y se enjuagan tres veces con agua estéril.



Se hace una disección de la capsula utilizando un bisturí estéril para la extracción de las semillas. Luego se depositan en el medio para la germinación.

Semillas. Las cápsulas se lavan con agua y jabón utilizando una esponja, se enjuagan con agua corriente, se extraen las semillas de la capsula y se colocan en un beaker, se les agrega hipoclorito de sodio 1,6% con dos gotas de tween por cada 100 ml, se deja en agitación por 20 min. En la cámara de flujo laminar se enjuagaron 3 veces con agua estéril y se dejan las semillas en un volumen de 40 ml.

Para la siembra de las semillas se utilizó una jeringa de 5cc debidamente estéril, se extrae 0.5 cc y a medida que las semillas se depositan en los diferentes medios de cultivo, estas se agitan de tal forma que queden bien distribuidas. También se utilizó micro pipetas para depositar la semilla.

Luego se sellan con plástico adhesivo, se rotulan con la fecha, medio de cultivo y nombre. Los frascos se colocan en el cuarto de crecimiento durante una semana en oscuridad, luego pasan a un foto periodo de 16 horas de luz, a una temperatura de ± 25 °C.

Para evaluar la germinación se realizaron observaciones semanales en el microscopio y a las 4 semanas se cuantificó el número de frascos germinados.

A los dos meses se evaluó el crecimiento de las plántulas considerando el número de hojas formadas, la longitud de las plántulas, número de raíces

5.1.2 Medio para la germinación in Vitro

El medio de cultivo que se utilizó para la germinación de la semilla fue (MS) a la mitad de su concentración (MS/2) de sales a excepción del hierro, más sacarosa (30g/l), Inositol 100mg/l, vitaminas MS y como gelificante gel rait (2,4 g/l), a un pH 5.7. Los medios no contenían hormona y estaban suplementados con 1%, 3% y 5% de agua de coco.



Los medios de cultivo, se esterilizan en la autoclave a 120 °C de temperatura, con una presión de 20 PSI (1.5Kg/Cm²). Por 20 min. Se dejan incubar por 48 horas con la finalidad de eliminar cualquier frasco que resultase contaminado, esto previene pérdidas de material a cultivar.

5.2 Multiplicación de Brotes:

Las plántulas germinadas fueron utilizadas para la fase de multiplicación, donde se utilizó medio Murashige & Skoog (MS) a la mitad de su concentración de sales (MS/2), dejando la misma concentración en el caso del hierro, conteniendo sacarosa (30g/l), Inositol 100mg/l, vitaminas MS y se utilizó como gelificante gel rait (2,4 g/l), a un pH 5.7. Se sembró en medio conteniendo 1%, 3% y 5% de agua de coco y pulpa de plátano. (Hudson, H; y Dale K. 1997)

5.2.1 Tratamientos que se utilizaron

El material utilizado para iniciar la multiplicación se introdujo en la cámara de flujo laminar, la multiplicación se inicia a partir de brotes subcultivados en *Encyclia adenocarpus*, colocando 4 explantes por cada frasco (que contiene 12.5 ml de medio); Cada tratamiento con agua de coco y plátano consta de 3 porcentajes diferentes: 1%, 3%, 5% y un testigo; posteriormente la siembra es trasladada al cuarto de crecimiento donde los factores de luz y temperatura son totalmente regulados con un fotoperíodo de 16-8.

La Evaluación se realizó a los 30 días, llevando el control del número de brotes por explante, determinando la tasa de proliferación, luego se evalúa el crecimiento de los brotes a los 3 meses y la variable considerada fue número de raíces de la planta.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo son los siguientes.

6.1 Germinación in vitro

Las semillas de *Encycliaadenocarpon* germinadas in vitro; a los ocho días después de la siembra se observaron en el microscopio lográndose observar el proceso de la imbibición de la semilla, apreciándose como el embrión se hincha, en algunas semillas, se distingue el rompimiento de la testa y la formación de una estructura en forma de cono que son los primeros protocormos (Foto No. 1). A las dos semanas se logran observar los primeros pigmentos clorofílicos al notarse la coloración verde como se aprecia en la foto.

En condiciones naturales el embrión permanece como protocormo hasta que encuentran el hongo micorrítico apropiado. El hongo proporciona hidratos de carbono, aminoácidos (glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico), ácido nicotínico y otras vitaminas. En condiciones in Vitro los medios de cultivos son ricos en minerales, azúcares y vitaminas favorables para la germinación; las fitohormonas y los extractos de plátano y agua de coco estimulan la germinación y el crecimiento (Lezama, 2004)

Foto No. 1





- Semillas de *Encycliaadenocarpon* colectada en el Bosque Seco en Salinas Grandes en proceso de imbibición observado al microscopio en la primera semana, primeros protocormos en forma circular y el inicio de presencia de clorofila a las dos semanas.

Después de la 4 y 5 semanas, los protocormos, se hacen notorio, distinguiéndose cuerpos esféricos que van saliendo de la cubierta de la semilla, y comienza a observarse una coloración verde que indica la presencia de los primeros plastidios, Entre la semana 8 y 10 posteriores se observan primordios de hojas bien formadas que las convierte en autótrofas (Foto No.2) pero este proceso no es uniforme ya que a como se aprecia en la fotografía hay algunas que se encuentran todavía como protocormos pero con abundantes cloroplastos (cuerpos esféricos).

Foto No. 2





- Crecimiento de Vitro plantas con hojas diferenciadas con abundantes cloroplastos y protocormos como cuerpos esféricos de color verde de *Encycliaadenocarpon* germinadas in Vitro en el Laboratorio. De Cultivo de Tejidos de la UNAN León.

Foto No. 3



- Plantas in Vitro con las primeras hojas verdaderas y la formación de las primeras raíces.

Foto No. 4





- Vitro plantas de *Encycliaadenocarpon* germinadas in Vitro en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNAN León.

Aproximadamente los tres meses (Foto. No. 3) las plántulas se colocan en diferentes tratamientos para iniciar la fase de multiplicación y generación de brotes los cuales mostraron actividad después de un mes iniciada esta fase.

Tanto para la multiplicación de protocormos, producción de biomasa y enraizamiento, el agua de coco resulta ser un buen aditivo y se ha utilizado ampliamente en cultivos in vitro de Orquídeas, ya que aumenta la proliferación de brotes y protocormos, lo cual es claramente visible en los resultados obtenidos en este trabajo.

6.2 Germinación en medio MS suplementado con agua de coco.

En el proceso de germinación el embrión absorbe agua a través de la testa y aumenta de volumen. Se inicia la división celular y el embrión rompe la cubierta seminal. A partir de un agregado celular, aparece una estructura denominada protocormo, que dará lugar al vástago, la parte aérea.

Posteriormente, a partir de un meristemo, se diferencian los órganos verdaderos: El vástago, por un lado y el rizoide por otro. A partir de este momento comienza un periodo muy activo de crecimiento.

Si el protocormo está expuesto a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo se desarrollan las hojas y como consecuencia de la formación de la clorofila (pigmento fotosintético). Por último el protocormo y los rizoides pierden su misión nutritiva y desaparecen y se genera la planta (Asociación Costarricense de Orquideología. 2001)

Se muestran el porcentaje de germinación in Vitro de la germinación de semillas de *Encycliaadenocarpon* en diferentes tratamientos enriquecidos con agua de coco. El



porcentaje de germinación en el testigo es de 62,5 % mientras que en los medios enriquecidos con 1, 3 y 5% de agua de coco la germinación fue del 100%.

Los datos se analizaron utilizando la prueba de Chi –cuadrado (X^2) siendo el frasco como unidad experimental para determinar si:

- No hay independencia de la germinación en el número muestras experimentales, entre los tratamientos.

Se obtuvo una significancia '**p**' de 0.027, esto quiere decir que se rechaza la hipótesis por lo tanto hay asociación entre la germinación y el tratamiento.

Tabla 1: Resultados de prueba de Chi –cuadrado (X^2)

TRAT	OBS	ESP		
T0%	7.2	0.8	0.67	6.05
T1%	7.2	0.8	0.09	0.8
T3%	5.4	0.6	0.07	0.6
T5%	7.2	0.8	0.09	0.8
Chicuadrado =				9.17

- p valor = 0.027
- $0.027 < 0.500$, esto quiere decir que la hipótesis se rechaza. Por lo tanto hay asociación entre la germinación y los tratamientos.



En el testigo se observa que el medio MS conteniendo los minerales, vitaminas e hidratos de carbono permitió que la semilla tenga los suficientes nutrientes para poder germinar y desarrollar plantas, pero cuando se le agrega agua de coco la germinación se incrementa sustancialmente probablemente por el aporte adicional de minerales, vitaminas e hidratos de carbono que contiene dicho compuesto orgánico.

Según Arditti y Ghani 2000, mencionados por Tupac y Bayman, 2009 existe una dependencia del embrión del hongo micorrizico por las mínimas cantidades de nutrientes almacenado en las diminutas semillas de las orquídeas. En este estudio el medio MS con adición de nutrientes contenidos en el agua de coco se logra el incremento de la germinación de esta especie y no depende de la presencia del hongo.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Total de Brotes por frasco a 30 días. Tabla 1

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	919,550(a)	15	61,303	1,581	,104
Intersección	3781,250	1	3781,250	97,533	,000
medio.Cultivo	396,050	1	396,050	10,216	,002
PeriodoEvaluac	105,800	1	105,800	2,729	,103
Concen.Porcent	159,050	3	53,017	1,368	,261
medio.Cultivo * PeriodoEvaluac	88,200	1	88,200	2,275	,136
medio.Cultivo * Concen.Porcent	30,050	3	10,017	,258	,855
PeriodoEvaluac * Concen.Porcent	52,900	3	17,633	,455	,715
medio.Cultivo * PeriodoEvaluac * Concen.Porcent	87,500	3	29,167	,752	,525
Error	2481,200	64	38,769		



Total	7182,000	80			
Total corregida	3400,750	79			

a R cuadrado = ,270 (R cuadrado corregida = ,099)

- En el Análisis de Homogeneidad de Varianza tomando en cuenta al Medio de cultivo, Periodo de Evaluación y concentraciones; Se rechaza la Hipótesis de Homogeneidad de Varianza y La única variable |que presenta diferencia significativa es el Medio de cultivo.

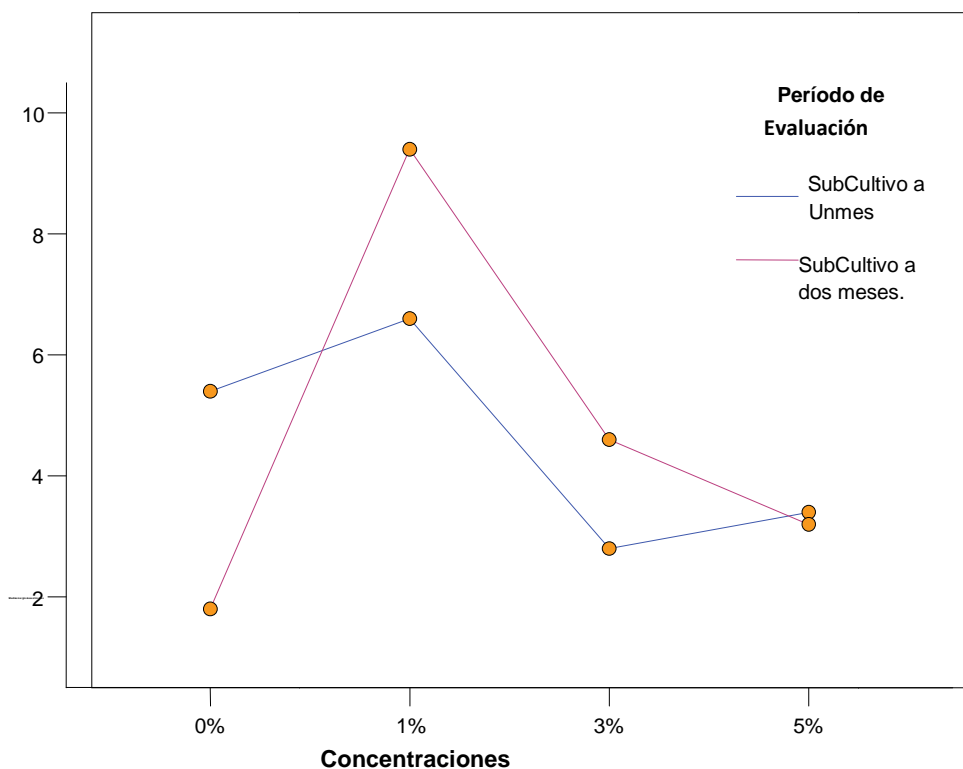
Al realizar el análisis de varianza incluyendo las interacciones de grupos o tratamientos considerando los períodos de evaluación, en el medio conteniendo agua de coco no se encontró diferencia significativa (sig. 0,476), y cuando se utiliza el medio de plátano no se encontraron diferencias significativas a un mes (sig. 0,592) y a dos meses el sub cultivo (sig. 0, 680). Se acepta la igualdad de varianza con respecto a los periodos de evaluación en cada tratamiento ya que su valor de significancia es mayor que 0,05.

Considerando los resultados anteriores se realizo una prueba de los efectos inter sujeto. En el análisis de homogeneidad de varianza tomando en cuenta al medio de cultivo, periodo de evaluación y concentraciones; se rechaza la hipótesis de homogeneidad de varianza y la única variable que presenta diferencia significativa es el medio de cultivo (sig. 0,002), (MSc. Carvajal).



Gráfico No 1: Promedio de brotes a los 30 días de cultivo.

Medio de cultivo con agua de coco



Producción total de brotes utilizando medio

MS suplementado con agua de coco

En el gráfico No.1 puede observarse que el promedio de brotes formados a los 30 días y 60 días son mayores cuando se utilizó el medio MS con 1% de agua de coco, con casi 7 brotes en el primer mes y casi 10 en el segundo mes; mientras que el testigo 2 brotes en el primer mes y casi 5 en el segundo mes. En las concentraciones más altas el número disminuyó sustancialmente siendo el de 5 % la concentración donde se formaron menor número de brotes.

Se observa que la mayor producción de brotes se obtiene cuando se utiliza el medio MS



suplementado con el 1% de agua de coco, en el Subcultivo a un mes y en el Subcultivo a los dos meses. La mayor producción de brotes observado en el tratamiento 1% de probablemente se debe a que el agua de coco además de minerales e hidratos de carbono contiene según el reporte de Espinosa algunas fitohormonas con diferentes concentraciones como: auxinas, 1,3 difenilurea, citoquininas y giberelina y, se ha usado rutinariamente en un sinnúmero de métodos de propagación.

La presencia de hormonas en el agua de coco tiene como efecto estimular la división celular, el alargamiento celular, mantienen la maquinaria de síntesis de proteína mediante la regulación de la síntesis de ARN.

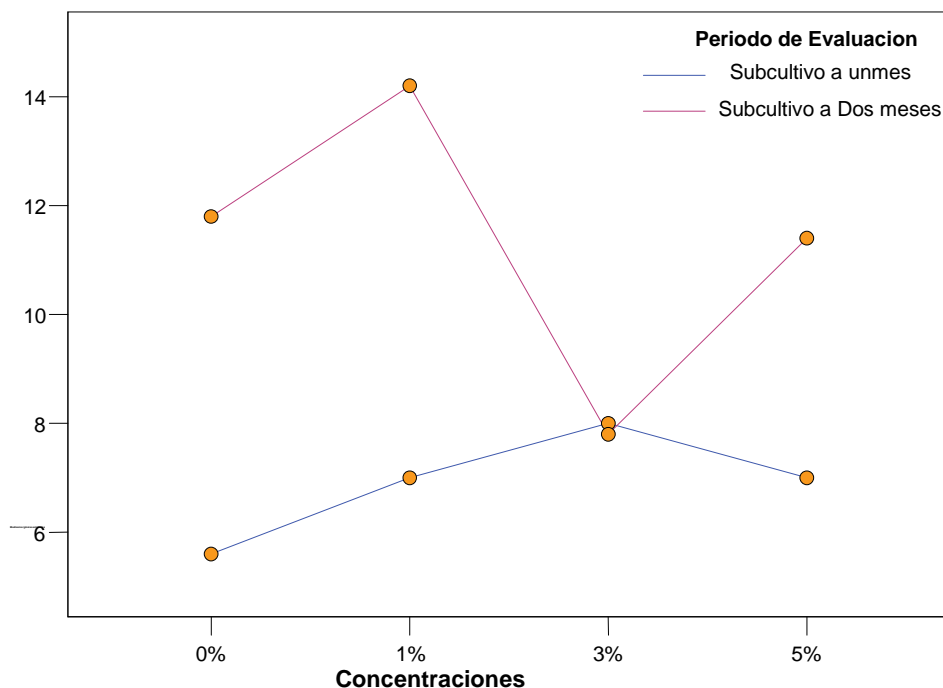
En los tratamientos con MS suplemento al 3% y 5% la producción es menor probablemente debido según la literatura (Hernández, 2006) a que las fitohormonas en altas concentraciones producen un efecto inhibitor. Para esta especie en este estudio las concentraciones de 3 y 5% de agua de coco son muy altas para la producción de brotes.

En el medio de cultivo de coco al 1% es donde se obtiene el mayor número de brotes de Orquídeas del Genero *Encyclia* a los 30 y 60 días, mientras que en 5% es el tratamiento donde se producen la menor producción de brotes y en ambos periodos no hay diferencia.

El agua de coco se ha usado ampliamente en cultivos in vitro de orquídeas, ya que aumenta la proliferación de brotes y de protocormos (Arditti, 1993; Krikorian, et al., 1990; Lam, et al., 1991), lo cual es claramente visible en los resultados obtenidos en este trabajo, en especial en protocormos enteros y en las siguientes fases de desarrollo.



Gráfico № 2: Promedio de brotes en medio de cultivo suplementado con plátano.

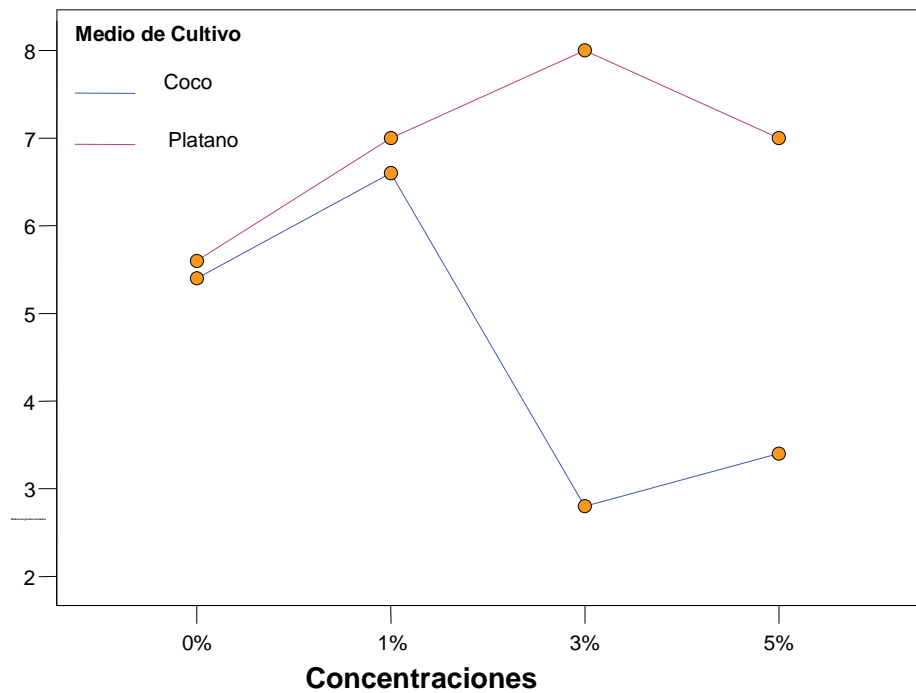


En el periodo de evaluación de dos meses el crecimiento de brotes de Orquídeas de *Encycliaadenocarpon* a los 30 días se forman mayor número de brotes en el tratamiento del 3% , pero a los 60 días el tratamiento con mayor número de brotes resultó ser el del 1%. Cabe destacar que en 3% en ambos períodos se forma igual número de brotes.

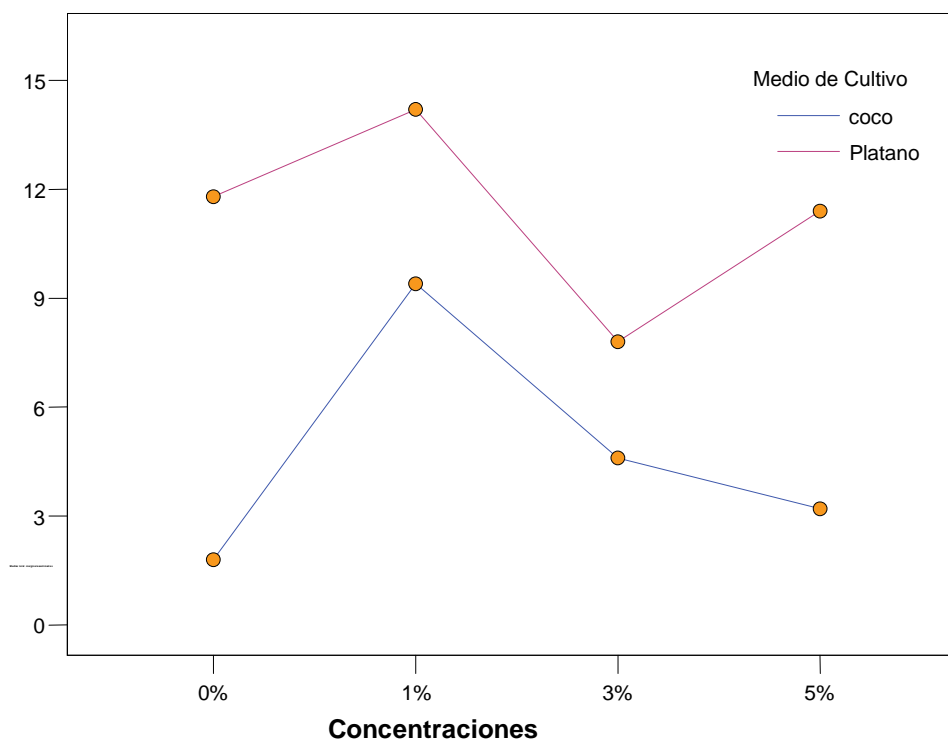
El plátano ha sido reportado como uno de los compuestos orgánicos que se agregan los medios de cultivo de orquídeas, cuando se agrega plátano se adiciona al medio principalmente calcio, hierro, fósforo y potasio; además contiene vitamina A, Tiamina y riboflavina; ya que Martínez, y Cañamera, 2004, reporta este contenido en su composición química.



Gráfico № 3: Crecimiento de brotes a los 30 días de evaluación.



Comparando los medios de Cultivo suplementados con plátano y agua de coco, la mayor producción de brotes de *Encycliaadenocarpense* obtiene cuando se utiliza un medio conteniendo el 3% de plátano a los 30 del subcultivo.



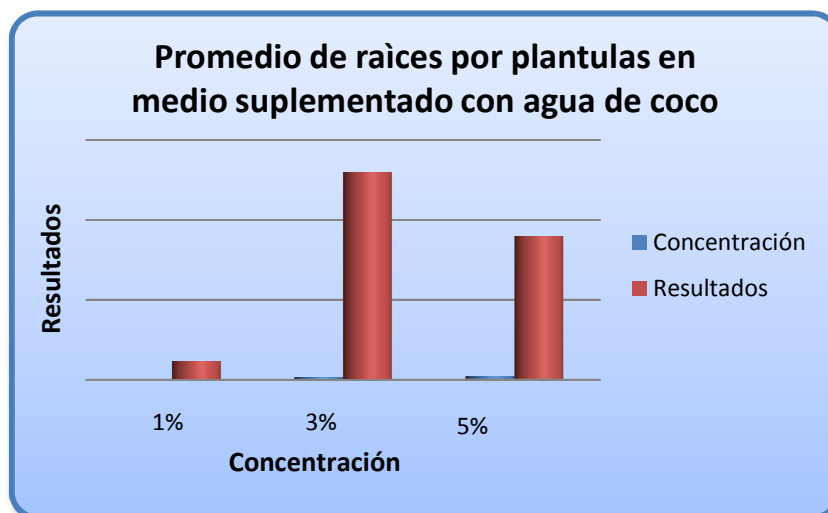
A los dos meses de subcultivo la mayor producción de brotes tanto conteniendo plátano y agua de coco ocurre en el medio con una concentración del 1%, siendo en esta concentración el plátano el que produce mayor número de brotes.

Al realizar el análisis de varianza incluyendo las interacciones de grupos o tratamientos considerando los periodos de evaluación, en el medio conteniendo agua de coco no se encontró diferencia significativa (sig. 0,476), y cuando se utiliza el medio de plátano no se encontraron diferencias significativas a un mes (sig. 0,592) y a dos meses de subcultivo (sig. 0,680). Se acepta la igualdad de varianza con respecto a los periodos de evaluación en cada tratamiento ya que su valor de significancia es mayor que 0,05.



Considerando los resultados anteriores se realizó una prueba de los efectos inter –sujeto. En el análisis de homogeneidad de varianza tomando en cuenta al medio de cultivo, periodo de evaluación y concentraciones; Se rechaza la Hipótesis de Homogeneidad de Varianza y la única variable que presenta diferencia significativa es el medio de cultivo (sig. 0,002).

Gráfico № 5: Número de Raíces promedio por plántulas.



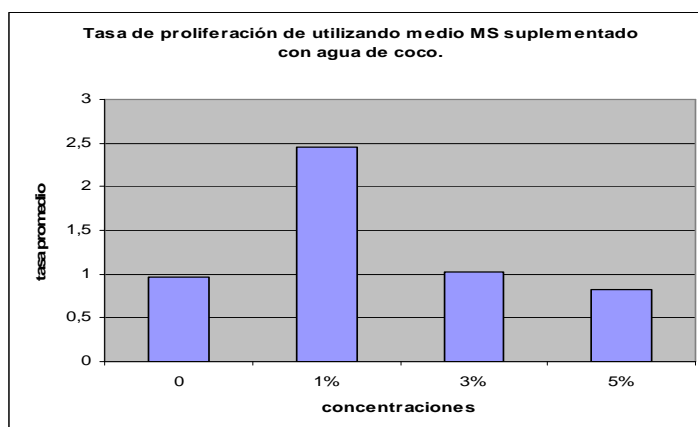
En el medio de cultivo suplementado con agua de coco al segundo mes de evaluación encontramos 85 plántulas de *Encyclia adenocarpus* con 29 raíces; esto indica el 2.9 promedio raíz por planta, y en el medio suplementado con plátano en el segundo



mes de evaluación presentó 170 plántulas con 106 raíces; reflejando 1.60 promedio de raíces por planta.

Esto nos indica que el medio suplementado con agua de coco es mejor estimulante para enraizamiento de las plántulas de *Encycliaadenocarpon* por el gran aporte nutricional y presencia de hormonas. Siendo el tratamiento que permite mayor enraizamiento el 3% con un promedio de 2.5 de raíz por plántula, el 1% permite el 0.24 promedio de raíces por plántulas y el 5% indica un 1.8 raíces por plántulas, estos valores nos indican que a diferencia de la elongación de las plántulas que es en proporciones menores en las que permite su crecimiento acá es un efecto contrario en los rangos de 3% y 5% están los valores propicios para el enraizamiento de *Encycliaadenocarpon*.

Gráfico Nº 6

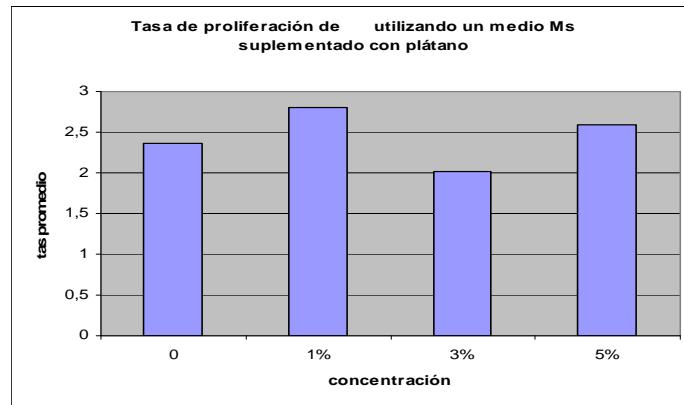


Tasa de proliferación

Cuando se utiliza agua de coco se observa la mayor proliferación en la concentración del 1% con una tasa de proliferación de 2,45, mientras que con 3 y 5% los resultados son similares a la del testigo con una tasa de 1.



Gráfico Nº 7



Con el uso de plátano la tasa mas alta ocurre en la concentración 1% con unata de 2,8. En ambos casos se observa que los dos compuestos orgánicos son efectivos y en la proliferación y desarrollo de las orquídeas *Encycliaadenocarpon*.

La tasa de proliferación es un dato importante porque permite hacer proyecciones de producción de plantas cuando se pasa a la etapa de productiva.



7. CONCLUSIONES.

Después de analizar los resultados expuestos en la investigación se llega a las siguientes conclusiones:

- Se logró la germinación in vitro de semillas de *Encycliaadenocarpon* en un medio MS enriquecido con agua de coco en período aproximado de un mes y quince días.
- En este estudio el agua de coco resultó en todas las concentraciones un buen estimulador para incrementar el porcentaje de germinación.
- La producción de raíces por plántulas en este medio suplementado con agua de coco indica mejores proyecciones y la concentración con mayor enraizamiento es el 3%.
- La producción de brotes de en la *Encycliaadenocarpon* etapa de multiplicación resulta mas adecuado el medio conteniendo plátano en un rango de 1 al 3% de concentración.
- La tasa de proliferación en medio de cultivos conteniendo agua de coco y plátano obtienen respectivamente 2,45 y 2,8 en concentraciones de 1% en ambos casos.



8. RECOMENDACIONES

- Continuar los estudios donde se utilicen medios conteniendo fitohormonas y componentes orgánicos a fin de obtener una mejor uniformidad en el desarrollo de las plántulas y producción de brotes.
- Establecer ensayos donde se puedan probar concentración de plátano en el rango de 1 a 3 % a fin de obtener la concentración óptima.
- Iniciar investigaciones del proceso de aclimatación de plantas de *Encycliaadenocarponya* que sus flores tienen un potencial económico.
- Continuar estos estudios en otras especies del bosque seco para contribuir a su conservación y poder explorar su potencial económico.



9. BIBLIOGRAFIA

- 1- Alarcón, M y Rivera. Propagación artesanal de orquídeas y *bromelias* en el área protegida Tisey- Estansuela, Estelí. 2007. 321p.
- 2- Alvarado, C. Micropropagación de *Cattleyaskinneri* y *Cattleyaskinneri* x *Cattleya máxima* por cultivo de ápices. Costa Rica, 2000. Disponible en:
<http://bibliodigital.itcr.ac.cr:8080/dspace/bitstream/2238/1318/1/BJFIB20016.pdf>
- 3- Asociación Costarricense de Orquídeología. Disponible en:
<http://www.ticorquideas.com/preguntas1.htm>. 2001
- 4- Barba, A. et al. Micropropagación de plantas. México. 2000: Trillas. 107p.
- 5- Baca, R y Velásquez. Evaluación de orquídeas en la finca: FUNDE VERDE, rio san juan, Managua Nicaragua, 1995.
- 6- Benneth, D. y Christenson. Cultivo de orquídeas. Caretas. 1988. Disponible en:
<http://www.rumbosperu.com/articles/13-06-orcchidses.html>.
- 7- Canelas, Luz M. Orquídeas en flor. Bolivia. 2007. Disponible en:
<http://www.rumbosbolivia.com/articles/13-07-orcchidses.htm>
- 8- Carrasco, S. et al. Cultivo de protocormos de *Mormodes Maculatavar*. Universidad Veracruzana., Xalapa, México. 2007. Pp. 55-59.
- 9- Epidendrum, Orquídeas estrella- *Epidendrum* sp- 2005. Disponible en:
<http://www.com/orquideas/Epidendrum-orquideas-estrella>.
<http://www.infojardin.com/orquideas/disa.htm>



- 10- Kadunic, St, Louis Missouri Botanical Garden Press, Flora de Nicaragua 2001.
- 11- Galiano, A. y Soza, R. Orquídeas más comunes de Rancho Grande. Monografía, Licenciatura. León- Nicaragua. 1999
- 12- Hernández, G. et al. Cultivo in vitro. 1 Dpto. Biología 2. Dpto. Agropecuario. Universidad "Hnos Saíz Montes de Oca" Pinar del Río. Cuba. 2006. Disponible en:
<http://emailmary@af.upr.edu>.
<http://cureneh@af.upr.edu.cu>. Artículo
- 13- Hormonas de las plantas. 1999. Disponible en :
<http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intribio/auxinas>. 1999
- 14- Hudson, H y Dale, K. Propagación de Plantas. Compañía Editorial, continental, S.A. 2da Edición. México. 1997. 760 p
- 15- León, Marcos. Conservación de especies Peruanas de Orquídeas Utilizando Técnicas de cultivos de tejidos in Vitro. 1995. Disponible en:
[http://www.lamolina.edu.pe/FACULTAD/agronomia/horticultura/propagacion/biotecnología/cuya.doc](http://www.lamolina.edu.pe/FACULTAD/agronomia/horticultura/propagacion/biotecnologia/cuya.doc).
- 16- Lezama, F. Germinación in Vitro de semillas de *Laeliaspeciosa*, orquídea en peligro de extinción. Tesis de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México. 2004.
- 17- Martínez, Carlos. Explosión Evolutiva de Orquídeas. Tesis. Asociación Guatemalteca de Orquideología, 2004. Disponible en:
<http://www.guatemalorchidsociety.org/boletines/Bole85.pdf>



- 18- Martínez, X. y Cañamera, N. El cultivo in Vitro y la Agricultura .Horticultura .53: Barcelona. 2004. 92-102 p.
- 19- Monserrat A, et al.Proliferación de *Rhynchosystelebictoniense* (Orchidaceae). A partir de semillas y explantes de material cultivado in Vitro. Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. UBIPRO. México.2004.
- 20- Museo Virtual: Historia Natural botánica/Orquídeas de Michoacán. México. 2002. Disponible en: [http:// www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/orquideas/importancia.html](http://www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/orquideas/importancia.html).
- 21- Norca, M y Gil, M. Tesis de grado. *Mussaendaerythrophylla*, flor de trapo, multiplicación In Vitro, explante. Primera parte. 2003. Disponible en: [http:// www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/Agronomia.htm](http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/Agronomia.htm).
- 22- Norvell, C. et al. Solubilización de fosfatos y micronutrientes para el crecimiento de la plantas promovida por diferentes especies de *Trichoderma*. 1999.
- 23- Orquídeas de Nicaragua. Disponible en: [http:// www.hayf.org/biblionet/orquideas/protocol.html](http://www.hayf.org/biblionet/orquideas/protocol.html). 2004
- 24- Orquídeas de Nicaragua. Disponible en: [www. mercanet.cnp.go.cr/Orquídeas_Oct02.pdf](http://www.mercanet.cnp.go.cr/Orquídeas_Oct02.pdf).2002
- 25- Pahl, J. 2000. Cultivo de Orquídeas: Consejos Prácticos para la Escogencia de jardines Tropicales. Costa Rica. Disponible en: [http://www. Cultivo/orqui-tips.html](http://www.Cultivo/orqui-tips.html).



- 26- Pierik, R. Cultivo In Vitro de las plantas superiores ex D. H. 2ª edición. 1989.
- 27- Otero, J y Bayman, P. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. Puerto Rico. 2009.
- 28- Quiroz, N y Mendoza, k. Micropropagación de orquídeas. Monografía, Licenciatura. León-Nicaragua. 2001
- 29- Rodríguez, L. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. Cuba. 2005. ISBN 959-250-156-4. Disponible en:
<http://www.dama.gov.co.Articulo>.
- 30- Rodríguez, O. Introducción a las orquídeas de Nicaragua. Disponible en:
www.orquideaskatia.com/orquideasexpovirtual.htm. 2001
- 31- Rojas, L. Et al. 2005. Producción de orquídeas silvestres cubanas. Cuba. Disponible en: [htt:// www.dama.gov.co.htm](http://www.dama.gov.co.htm)
- 32- Subgerencia de Desarrollo Agropecuario, et al. Disponible en:
http://www.mercanet.cnp.go.cr/SIM/Frutas_y_Vegetales/documentospdf/Orquídeas_Oct02.pdf .2005
- 33- Valderrama, Sh. et al. Desarrollo in vitro de plántulas de *Epidendrum* Sp. (Orchidaceae), utilizando Carbón activado y 6-bencil-amino purina (BAP). Laboratorio de fisiología y cultivos de tejidos vegetales Universidad Nacional de Trujillo. 2009. Disponible en:
www.facbio.unitru.org.co/scielo.phd



Anexos



1. Composición del medio de Cultivo Murashige y Skoog (MS)

1) Sales orgánicas.

Compuestos	Concentrac. mg/l	Solución Stock g/l
NITRATOS:		
NH ₄ NO ₃	1650	165
KNO ₃	1900	190
SULFATOS:		
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	370	37
Mn SO ₄ .H ₂ O	16.9	1.69 (= 1690mg/l)
Zn SO ₄ .7H ₂ O	8.6	0.86 (= 860 mg/l)
Cu SO ₄ .7H ₂ O	0.025	0.0025 (=2.5 mg/l)
HALOGENOS:		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	44
KI	0.83	0.083 (=83mg/l)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0025(=2.5mg/l)
P,B,Mo:		
KH ₂ PO ₄	170	17
H ₃ BO ₃	6.2	0.62 (=620mg/l)
Na ₂ Mo O ₄ .2H ₂ O	0.25	0.025 (=25mg/l)
Na Fe EDTA:		



Fe SO ₄ .7H ₂ O	27.8	2.784
Na ₂ EDTA	37.24	3.724

Compuestos orgánicos

Compuestos	Concentración	
Sacarosa	30.0g	
Inositol	100 mg	
Gel rite	2.4 g	



2. Prueba de homogeneidad de varianzas(a)

Medio de Cultivo = coco , Periodo de Evaluación = Sub Cultivo a Un mes

Total de Brotes por frasco a 30 días

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,128	3	16	,942

aMedio de Cultivo = coco , Periodo de Evaluación = Sub cultivo a Un mes

3- ANOVA(a)

Total de Brotes por frasco a 30 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	46,550	3	15,517	,925	,451
Intra-grupos	268,400	16	16,775		
Total	314,950	19			

a Medio de Cultivo = coco, Periodo de Evaluación = Sub cultivo a Un mes



Medio de Cultivo = coco , Periodo de Evaluación = Sub cultivo a Dos meses

4- Prueba de homogeneidad de varianzas(a)

Total de Brotes por frasco a 30 días

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,361	3	16	,290

a Medio de Cultivo = coco , Periodo de Evaluación = Sub cultivo a Dos meses

5- ANOVA(a)

Total de Brotes por frasco a 30 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	163,750	3	54,583	,872	,476
Intra-grupos	1002,000	16	62,625		
Total	1165,750	19			

a Medio de Cultivo = coco , Periodo de Evaluación = Sub cultivo a Dos mese



6- Medio de Cultivo = plátano, Sub cultivo a Un mes

Prueba de homogeneidad de varianzas(a)

Total de Brotes por frasco a 30 días

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,314	3	16	,115

7- ANOVA(a)

Total de Brotes por frasco a 30 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14,600	3	4,867	,653	,592
Intra-grupos	119,200	16	7,450		
Total	133,800	19			

a Medio de Cultivo = plátano, Periodo de Evaluación = Sub cultivo a Un mes



Medio de Cultivo = plátano, Sub cultivo a Dos meses

8- Prueba de homogeneidad de varianzas(a)

Total de Brotes por frasco a 30 días

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,677	3	16	,035

9- ANOVA(a)

Total de Brotes por frasco a 30 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	104,600	3	34,867	,511	,680
Intra-grupos	1091,600	16	68,225		
Total	1196,200	19			

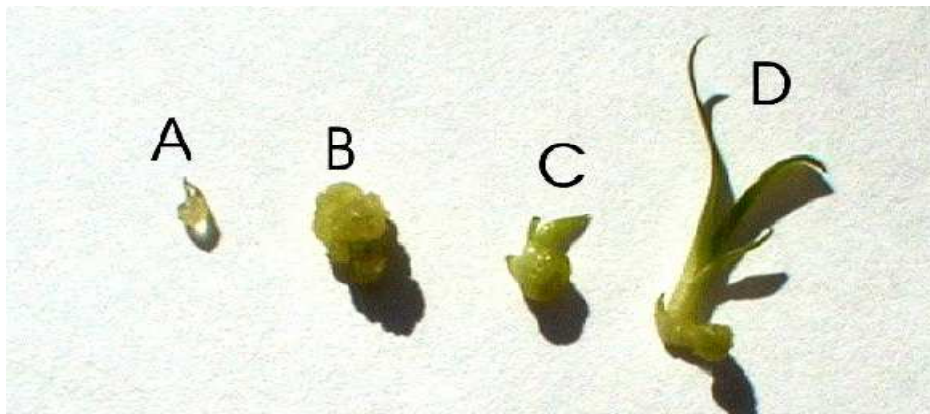


10- Fotos donde se trasladan brotes de orquídea de la especie *Encycliaadenocarpon* a los medios enriquecidos de plátano y coco.





Multiplicación de protocormos. Izquierda: medio líquido. Derecha: medio semisólido (Rojas, 2005).



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 Vitro planta (Rojas, 2005).