



Protocolo para el
cultivo in vitro de orquídeas
con distribución en Guatemala

Protocolo para el cultivo in vitro de orquídeas con distribución en Guatemala

Guatemala, abril de 2018

CRÉDITOS DE LA PUBLICACIÓN

Textos

Mgtr. María Mercedes López-Selva

Revisión de textos

Dr. Ottoniel Monterroso

Edición y diagramación

Mgtr. Cecilia Cleaves

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Las orquídeas en Guatemala | 1 |
| 2.1 Número estimado de especies y su estatus en territorio nacional | 1 |
| 2.2 Importancia de las orquídeas en los ecosistemas | 2 |
| 3. Metodología para la reproducción <i>in vitro</i> de orquídeas | 3 |
| 3.1 Obtención de cápsulas o semillas | 3 |
| 3.2 Protocolo de desinfección de cápsulas cerradas | 3 |
| 3.3 Protocolo de desinfección de cápsulas abiertas | 4 |
| 3.4 Preparación de medios de cultivo | 5 |
| 3.4.1 Medio MS | 7 |
| 3.4.2 ½ Medio MS | 7 |
| 3.4.3 Medio MS modificado con ANA y GA ₃ | 7 |
| 3.4.4 Medio para crecimiento de orquídeas de Coco-tiamina | 7 |
| 3.4.5 Medio Knudson C1 | 8 |
| 3.4.6 Medio Knudson C2 | 8 |
| 3.4.7 Medio Knudson C3 | 8 |
| 4. Cuidado de orquídeas <i>in vitro</i> y traslado al invernadero | 8 |
| 5. Resultados de la germinación y desarrollo de crecimiento de algunas especies de orquídeas | 9 |
| 6. Importancia de la promoción del cultivo <i>in vitro</i> de las especies nativas de Guatemala | 12 |
| Glosario | 13 |
| Referencias | 14 |

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de orquídeas *in vitro* ha sido objeto de amplios esfuerzos de investigación sobre especies de interés comercial. La germinación de embriones de orquídea en medios preparados con sales de nutrientes, micronutrientes, hormonas y gelificantes ha sido la solución para que la industria propague masivamente a estas plantas que, en la naturaleza, requieren de tiempo y condiciones muy particulares para crecer.

Sin embargo, existe un vacío en la investigación y documentación de técnicas que sean efectivas para el crecimiento de orquídeas nativas de Centroamérica que, en muchos casos, se les considera raras y que son menos conocidas que las tradicionales orquídeas asiáticas que se comercializan. El crecimiento óptimo de tejidos en medios de cultivo varía según la especie y según la etapa de desarrollo en la que se encuentre la orquídea.

Este documento presenta los resultados de investigación realizada en el Instituto de Investigación y Proyección sobre Ambiente Natural y Sociedad (Iarna) de la Universidad Rafael Landívar, referentes al cultivo *in vitro* de orquídeas de la región centroamericana. La investigación es resultado de observaciones sobre el desarrollo de plantas a partir de embriones (semillas) sembrados mediante técnicas convencionales de laboratorios de cultivo de tejidos en diferentes medios de crecimiento.

Los hallazgos corresponden a la investigación denominada *Conservación de Orquídeas Amenazadas de Guatemala*, que inició en el 2013, y que sigue desarrollándose dentro del marco del Subprograma Conocimiento de la Diversidad y Riqueza Natural de Guatemala y Mesoamérica del Iarna. El objetivo de esta línea de investigación es desarrollar conocimientos que apoyen a la conservación de flora nativa, endémica y/o amenazada de Guatemala.

El documento continúa con una sección donde se sintetiza a importancia de las orquídeas en los ecosistemas, para después presentar la metodología de cultivo *in vitro* de orquídeas nativas. Posteriormente se presenta el cuidado

de las orquídeas *in vitro* (sección 3) y el paso a condiciones de invernadero (sección 4). Se finaliza con resultados del cultivo de algunas especies de orquídeas realizada por el Iarna.

2. LAS ORQUÍDEAS EN GUATEMALA

2.1 Número estimado de especies y su estatus en territorio nacional

La familia Orchidaceae es la más grande de las monocotiledóneas a nivel mundial, con más de 800 géneros y 20,000 especies descritas; es de distribución mundial y puede encontrarse en casi todos los hábitats con excepción de los desiertos más extremos y los de agua salada (Dix & Dix, 2006).

Es la familia más diversa en Guatemala, y los autores que la han descrito no concuerdan con el número de especies identificadas y el número de especies endémicas. De acuerdo con Veliz (2008) existen 796 especies descritas y 200 de ellas son endémicas. Sin embargo, conforme la más reciente publicación de Dix y Dix (2006), se reportaban 770 especies documentadas, 41 de ellas endémicas.

La mayor diversidad de orquídeas en el país se encuentra entre un rango altitudinal entre 800 a 1600 msnm, y la mayor riqueza de especies ocurre en el departamento de Alta Verapaz, en donde se encuentra el 60% de todas las especies registradas para Guatemala. Los departamentos de Baja Verapaz y Zacapa, Izabal y Huehuetenango, Guatemala, Chimaltenango, Suchitepéquez y Petén representan, después de Alta Verapaz, los más diversos en orden descendente en cuanto al grupo de las orquídeas se refiere (Dix & Dix 2006).

Con relación al estatus de las orquídeas en la naturaleza, todas las especies se consideran amenazadas y están incluidas en los apéndices de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (Cites).

De las aproximadamente 1,000 especies distribuidas en Guatemala, 125 están dentro de la Lista de Especies de Flora Amenazada (lista roja) que publica el Consejo Nacional de Áreas Protegidas; ocho de ellas, incluyendo a la

flor nacional Monja Blanca (*Lycaste skinneri* var *alba*), son parte de la categoría 1 que contiene especies con mayor grado de amenaza de extinción.

2.2 Importancia de las orquídeas en los ecosistemas

Las orquídeas juegan diferentes roles dentro de los ecosistemas, entre ellos el de proveedoras de néctar y aceites esenciales para colibríes, murciélagos, mariposas, palomillas, abejas, abejorros y otros polinizadores. Sus hojas y pseudobulbos también proveen alimento para insectos y algunos mamíferos.

Agregan estructura a los troncos de árboles y sustratos en donde crecen y, por lo tanto, son importante fuente de refugios para insectos, arañas y aves.

Tienen un rol dentro del ciclo de vitaminas y otros elementos nutritivos que son importantes en el metabolismo de diferentes organismos y que pueden ser limitantes. En los trópicos, estos micronutrientes están la mayor parte del tiempo como parte de la biomasa y su ciclo se desarrolla dentro de organismos como las orquídeas.

La mayoría de orquídeas requiere de polinizadores debido a que su polen no es un polvo suelto que pueda dispersarse por viento o agua, sino es una masa pegajosa, llamada polinia, que se adhiere al insecto, ave o mamífero que la visite y se desprende cuando el animal se posa en otra flor, dejando la polinia lista para fecundarla.

Debido a este requerimiento para su fecundación, las flores de orquídeas son estructuras que evolucionaron con la finalidad de atraer polinizadores mediante diferentes tácticas. Una de ellas es la habilidad de mimetizar insectos y aromas fuertes. Las flores que semejan ser insectos atraen a especies específicas que se posan en la flor con la intención de aparearse o pelear.

La especialización de las estructuras florales para atraer polinizadores ha resultado en flores que también el ser humano considera hermosas, principalmente por sus variadas

formas y colores. Las orquídeas tienen un amplio mercado con coleccionistas y aficionados que pagan precios elevados por los ejemplares. De esta inclinación a coleccionarlas y al uso que se les da para decoración se deriva su importancia económica, que ha conducido a la creación de híbridos que no existen de forma natural en los ecosistemas.

En el ámbito de la evaluación del estado del subsistema natural, las orquídeas son utilizadas como especies indicadoras debido a su relación y dependencia con otros organismos: su relación con el sustrato puede determinar el crecimiento de plantas debido a la presencia de micorrizas; su relación con polinizadores puede indicar la calidad para la reproducción de especies; y su presencia en el ecosistema puede utilizarse para identificar la calidad de los microclimas. La presencia o ausencia de orquídeas en las áreas silvestres contribuye a inferir la salud del ecosistema (Akhalkatsi *et al.*, 2014).

La desaparición de una especie de orquídea puede tener un impacto negativo en el futuro de los polinizadores específicos, ya que las relaciones de dependencia entre las dos especies son, en muchos casos, exclusivas (Dressler, R. 1991).

En estos casos, es válido argumentar que la desaparición de una especie de orquídea puede tener implicaciones en todo el ecosistema, si consideramos que su polinizador específico también se verá afectado, así como los otros organismos con quien este tenga relación. ¿Qué sucede con ellos si desaparece la orquídea? ¿Cómo afecta la desaparición a otras especies relacionadas al polinizador? Estas preguntas merecen atención inmediata considerando la alta tasa de desaparición de bosques naturales.

El valor biológico, material y cultural de la diversidad biológica para la presente y las futuras generaciones son razones suficientes para enfocar nuestros esfuerzos en la conservación. La diversidad constituye una riqueza, muchas veces aún por descubrir, debido al potencial que representa como fuente de alimento, medicina y recreación.

3. METODOLOGÍA PARA LA REPRODUCCIÓN *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS

En esta sección se presenta la metodología específica para la reproducción *in vitro* de orquídeas nativas de Guatemala. La metodología consta de procedimientos de obtención, desinfección y siembra de semillas en medios preparados a partir de sales y compuestos que contienen los elementos esenciales para lograr el crecimiento.

3.1 Obtención de cápsulas o semillas

Las orquídeas tienen estructuras conocidas como cápsulas que son contenedores de miles de embriones desnudos o sin endospermo, es decir, sin alimento que los sustente. Estos embriones o semillas son tan pequeños que con frecuencia se les describe con apariencia de polvo. La cápsula que los contiene se forma a partir de la columna ensanchada de la flor e inmediatamente después de que la flor ha sido polinizada.

El grado de madurez de la cápsula es de especial importancia para su cultivo *in vitro*. Las cápsulas muy verdes pueden tener embriones muy inmaduros que tardan mucho tiempo en madurar *in vitro* o que pueden no desarrollarse del todo. Las cápsulas demasiado maduras se abren y son propensas a la contaminación por

hongos y microorganismos.

El momento exacto para sembrar los embriones que se encuentran dentro de la cápsula es cuando esta ha empezado a cambiar de color verde a amarillo/naranja/café, y antes de que se vean grietas en su exterior. La figura 1 muestra cápsulas en estado apropiado para su siembra.

Las cápsulas pueden obtenerse de colecciones privadas o del medio silvestre. Las primeras tienden a estar en mejores condiciones debido a que no están tan expuestas al deterioro que causan los insectos en el medio silvestre.

En caso de obtener las cápsulas del medio silvestre, debe procurarse coleccionar las que no presenten daño en la corteza externa. Si solo hubiera disponibles cápsulas sin madurar, se debe tomar en cuenta que la germinación podrá demorar incluso hasta un año, dependiendo del grado de madurez del embrión y de su respuesta al medio de cultivo.

3.2 Protocolo de desinfección de cápsulas cerradas

Antes de abrir las cápsulas para sembrar a los embriones, estas tienen que pasar por un proceso de desinfección que limpia la corteza exterior y evita que se contaminen los medios de cultivo. Las técnicas de desinfección que se aplican deben ser administradas con cuidado para evitar la muerte de los embriones.

Figura 1. Cápsulas maduras



Fuente: Laboratorio de Biotecnología del IARNA/URL

Tal como se mencionó anteriormente, el momento ideal para sembrar las semillas es cuando las cápsulas empiezan a madurar y antes de que muestren grietas en la corteza exterior (ver figura 2). Sin embargo, también pueden aplicarse técnicas específicas de desinfección cuando las cápsulas muestren apertura de la corteza para lograr la germinación de embriones *in vitro* (véase sección 3.3).

El equipo y los reactivos utilizados en la desinfección de cápsulas cerradas son los siguientes:

- Jabón líquido
- Hipoclorito de sodio 5.25% (Cloro comercial)
- Etanol al 70%
- *Tween 20*
- Agua destilada estéril
- Vasos de precipitar (*beakers*)
- Pinzas estériles
- Papel estéril

Se debe determinar el estado de la cápsula haciendo una revisión detallada de la superficie, utilizando para ello un estereoscopio. De no observarse grietas ni aberturas, se prosigue con el protocolo de desinfección siguiente:

1. Quitar el residuo floral de la parte basal de la cápsula.
2. Lavar con agua y jabón para eliminar esporas.
3. Sumergir cápsula en cloro comercial al 5.25% con una gota de *Tween 20* durante 5-15 minutos (dependiendo del tamaño y textura de la cápsula, para cápsulas lisas y pequeñas sumergir por 5 min y para cápsulas rugosas y grandes sumergir hasta 15 min).
4. Ingresar a la cámara de flujo laminar el recipiente con la cápsula y el cloro para descartarlo.
5. Realizar tres lavados con agua destilada, previamente esterilizada, durante tres minutos cada uno.
6. Sumergir la cápsula en alcohol al 70% durante cinco a diez minutos (dependiendo del tamaño y textura de la cápsula).
7. Realizar tres lavados más con agua estéril durante tres minutos cada uno.
8. Dejar secar por completo en papel estéril antes de realizar el corte.

Figura 2. Cápsulas maduras y abiertas de *Guarianthe aurantiaca*



Fuente: Laboratorio de Biotecnología del Iarna/URL

3.3 Protocolo de desinfección de cápsulas abiertas

Para la desinfección de cápsulas que ya están abiertas es necesario aplicar la técnica que se describe a continuación. Se debe tomar en cuenta que en este caso las probabilidades de contaminación del medio de cultivo son más altas que cuando las cápsulas se encuentran aún cerradas.

El equipo y reactivos utilizados en la desinfección de cápsulas abiertas es el siguiente:

- Hipoclorito de sodio al 0.5%
- *Tween 20*
- Agua destilada estéril
- Vasos de precipitar (*beakers*)
- Embudo estéril
- Pinzas estériles
- Papel para filtrar

El protocolo de desinfección para cápsulas abiertas es el siguiente:

1. En un *beaker* con cloro comercial al 0.5% y una gota de *Tween 20*, verter los embriones de la cápsula.

2. Dejarlos durante 15 minutos en cloro (0.5%) revolviendo cada minuto.
3. Ingresar a la cámara de flujo laminar con el *beaker* que contiene a los embriones y filtrar utilizando papel filtro previamente tratado en autoclave y un embudo desinfectado.
4. Realizar cinco lavados con agua destilada previamente esterilizada, agregando el agua al papel filtro.
5. Dejar secar el papel filtro por completo antes de sembrar.

3.4 Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de soluciones *stock* prepare y tenga disponibles los siguientes **materiales y equipo**:

- Vasos de precipitar (*beakers*) de dos litros o más
- Probetas 1 litro y de 100 ml
- Espátulas
- Bandejas para pesar
- Papel o recipientes plásticos para pesar
- Goteros
- Plato agitador
- Agitadores magnéticos
- Balanza analítica 0.01mg (min)
- Autoclave

El cuadro 1 muestra los compuestos y las cantidades que requiere la preparación de los medios de cultivo Murishage & Skoog (MS); ½ MS; MS con hormonas; Knudson 1, 2 y 3 y Cocotiamina.



Cuadro 1. Componentes de los medios de cultivo

| Solución (g/l) | Compuesto | MS | MS + Hormonas | KC1 | KC2 | KC3 | Coco- Tiamina |
|-----------------|---|---------|------------------|---------|--------|--------|------------------|
| Macronutrientes | NH ₄ NO ₃ | 16.5000 | 16.5000 | | | | |
| | KNO ₃ | 19.0000 | 19.0000 | | | | |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 3.7000 | 3.7000 | 5.0000 | 0.2500 | 0.2500 | |
| | KH ₂ PO ₄ | 1.7000 | 1.7000 | 5.0000 | 0.2500 | 0.2500 | |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | 10.0000 | 0.5000 | 0.5000 | |
| Calcio | CaCl ₂ .2H ₂ O | 4.4000 | 4.4000 | | | | |
| | Ca(NO ₃) ₂ * H ₂ O | | | 20.0000 | | | |
| | Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O | | | | 1.0000 | 1.0000 | |
| Micronutrientes | H ₃ BO ₃ | 3.1000 | 3.1000 | | | | |
| | MnSO ₄ .4H ₂ O | 11.1500 | 11.1500 | 0.1500 | 0.0075 | 0.0057 | |
| | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 4.3000 | 4.3000 | | | | |
| | KI | 0.4150 | 0.4150 | | | | |
| | NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0.1250 | 0.1250 | | | | |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.0125 | 0.0125 | | | | |
| | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.0125 | 0.0125 | | | | |
| Hierro | Titriplex III (Na ₂ EDTA.2H ₂ O) | 3.7250 | 3.7250 | 3.7250 | | | |
| | FeSO ₄ .7H ₂ O | 2.7850 | 2.7850 | 2.7850 | 0.0250 | 0.0250 | |
| Vitaminas | Myo-inositol | 10.0000 | 10.0000 | 10.0000 | | | |
| | Glicina | 0.2000 | 0.2000 | 0.2000 | | | |
| | Ácido Nicotínico | 0.0500 | 0.0500 | 0.0500 | | | |
| | Piridoxina-HCl | 0.0500 | 0.0500 | 0.0500 | | | |
| | Tiamina-HCl | 0.0100 | 0.0100 | 0.0100 | | | |
| | Ácido 1-naftalenacético | | 0.0001 | | | | |
| | Ácido giberélico | | 0.0005 | | | | |
| Otros | sacarosa | 30 | 30 | 20 | 20 | 20 | |
| | Bayfolán | | | | | | 2.5 ml |
| | Agua de coco | | | | | | 250 ml |
| | Clorhidrato de tiamina | | | | | | 0.2 gr |
| | Carbón activado | | | | | | 2 gr |

Fuente: Elaboración propia.

El procedimiento usual para preparar medio de cultivo es hacer soluciones *stock* por separado, que después se agregan para hacer una solución final. Estas soluciones *stock* pueden almacenarse para utilizarse posteriormente en la preparación de más medio.

Para hacer los medios MS se hace una solución por macronutrientes: una solución de calcio, una de hierro, una solución de micronutrientes y una de vitaminas. A estas soluciones se les conoce como soluciones madre o *stock*. Verter la solución en un frasco con tapadera de rosca. Colocar el frasco con solución y tapadera de rosca solo sobrepuesta en autoclave por 20 minutos.

Más adelante se tomará solo una pequeña cantidad de estas para preparar el medio de cultivo en el que se harán las siembras.

Para preparar el medio Knudson C1 hacer soluciones madre por componente. Agregar la cantidad indicada del componente en el cuadro 1 y enrase con agua desmineralizada a 1 litro.

Para los medios Knudson C2 y C3 y el de Coco-tiamina agregar las cantidades detalladas en el cuadro a $\frac{3}{4}$ de litro de agua desmineralizada y finalmente enrasar a 1 litro.

3.4.1 Medio MS (Murashige & Skoog, 1962)

Para preparar un litro de medio MS:

Colocar un *beaker* sobre una plancha agitadora y activar la agitación. Agregar las siguientes cantidades de soluciones:

1. 100 ml de solución de macronutrientes
2. 100 ml de solución de calcio
3. 2 ml de solución de micronutrientes
4. 10 ml de solución de hierro
5. 10 ml de solución de vitaminas
6. 30 g de sacarosa
7. Enrasar a 1 litro con agua destilada
8. Ajustar el pH y llévelo a 5.8 agregando hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4)
9. Agregar 7 g de agar, agitar y llevar a ebullición
10. Servir en recipientes a utilizar y poner en autoclave por 25-30 minutos

3.4.2 $\frac{1}{2}$ Medio MS (Murashige y Skoog, 1962):

Para preparar un litro de $\frac{1}{2}$ medio MS:

Colocar un *beaker* sobre una plancha agitadora y encender. Agregar las siguientes cantidades de soluciones:

1. 50 ml de solución de macronutrientes
2. 50 ml de solución de calcio
3. 1 ml de solución de micronutrientes
4. 5 ml de solución de hierro
5. 5 ml de solución de vitaminas
6. 15 g. de sacarosa
7. Enrasar a 1 litro con agua destilada
8. Llevar el pH de la solución a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4)
9. Agregar 7 g de agar, agitar y llevar a ebullición
10. Servir en recipientes a utilizar y poner en autoclave por 25-30 minutos

3.4.3 Medio MS modificado con ANA y GA₃ (Murashige y Skoog, 1962) (Ávila y Salgado-Garciglia, 2006):

Preparar un litro de solución siguiendo las instrucciones del inciso 3.5.1 Después de agregar las vitaminas, añadir 0.1 mg de ácido 1-naftalenacético y 0.5 mg de ácido giberélico. Proseguir con el mismo procedimiento de la preparación del MS.

3.4.4 Medio para crecimiento de orquídeas de Coco-tiamina (Archila, E. s.p.):

1. Colocar en un *beaker* de dos litros en una plancha agitadora y agregar:

1. 2.5 ml de bayfolan (bayer)
2. 250 ml de agua de coco filtrada
3. 1 cápsula de supertiamina (Laboratorios Ancalmo) o 0.2 de clorhidrato de tiamina
4. 2 g. de carbón activado
5. Enrasar a un litro con agua destilada
6. Ajustar el pH a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4)
7. Agregar 7 g. de agar, agitar y llevar a ebullición
8. Servir en recipientes a utilizar y poner en autoclave por 25-30 minutos

3.4.5 Medio Knudson C1 (Rizal Technological University, 2010):

Para preparar un litro de Medio Knudson C1:

Agregar las siguientes soluciones en *beaker* sobre plato agitador:

1. 50 ml de solución de sulfato de amonio
2. 50 ml de solución de nitrato de calcio monohidratado
3. 50 ml de solución de fosfato de potasio
4. 50 ml de solución de sulfato de magnesio heptahidratado
5. 50 ml de solución de sulfato de manganeso heptahidratado
6. 10 ml de solución de hierro
7. 10 ml de solución de vitaminas
8. Agregar 20 g de sacarosa
9. Enrazar a 1 litro con agua destilada
10. Ajustar pH a 5.6 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4)
11. Agregar 7 g de agar, agitar y llevar a ebullición
12. Servir en recipientes y poner en autoclave por 25-30 minutos

3.4.6 Medio Knudson C2 (Damon A. et al, 2004):

Para preparar un litro de Medio Knudson C2:

En 900 ml de agua destilada agregar cada uno de los siguientes reactivos y mantener una agitación constante:

1. 1 g de nitrato de calcio tetrahidratado
2. 0.25 g de sulfato de magnesio heptahidratado
3. 0.25 g de fosfato de potasio
4. 0.5 g de sulfato de amonio
5. 0.0075 g de sulfato de manganeso tetrahidratado
6. 0.025 g de sulfato de hierro heptahidratado
7. 20 g de sacarosa
8. Enrazar a 1 litro con agua destilada
9. Ajustar el pH a 5.6 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4)
10. Agregar 7 g de agar, agitar y calentar hasta ebullición
11. Servir en recipientes y colocar en el autoclave por 25-30 minutos

3.4.7 Medio Knudson C3 (Mayo A. et al., 2010):

Para preparar un Litro de medio Knudson C3, en 900 ml de agua destilada agregar cada uno de los siguientes reactivos y mantener en constante agitación:

1. 1 g de nitrato de calcio tetrahidratado
2. 0.25 g de sulfato de magnesio heptahidratado
3. 0.25 g de fosfato de potasio
4. 0.5 g de sulfato de amonio
5. 0.0057g de sulfato de manganeso tetrahidratado
6. 0.0250 g de sulfato de hierro heptahidratado
7. 20 g de sacarosa
8. Enrazar a 1 litro con agua destilada
9. Ajustar el pH a 5.6 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) ácido sulfúrico (H_2SO_4)
10. Agregar 7 g de agar, agitar y calentar hasta ebullición
11. Servir en recipientes y poner en autoclave por 25-30 minutos.

4. CUIDADO DE ORQUÍDEAS *IN VITRO* Y TRASLADO AL INVERNADERO

Los recipientes con cultivo pueden permanecer en sitios sin luz directa hasta el momento de germinar. Al observar el primer indicio de germinación, deben tener acceso a luz directa 14 horas diarias. Colocar estos recipientes en áreas de acceso restringido para evitar su exposición a agentes contaminantes y de preferencia fumigar el ambiente cada seis meses contra ácaros.

Esta área de crecimiento debe permanecer a temperatura constante o con cambios de temperatura muy leves. La temperatura a la que se mantenga debe corresponder a la del hábitat de las plantas que se trabajan.

El primer crecimiento será abundante, por lo que necesitará reubicar a las plantas en otros recipientes. A este paso se le conoce como transferencia. Antes de sacar las plantas al aire libre, es necesario reemplazar el medio de cultivo una vez al mes o al menos una vez cada dos meses previo a su trasplante *ex vitro*.

Las plantas que presentan raíces, tallos, hojas y pseudobulbo, para ciertas especies, están listas para salir del vidrio y comenzar su aclimatación al medio natural. Para ello, se deben seguir los pasos siguientes:

1. Sacar a las plantas del recipiente y lavarlas con suficiente agua corriente para quitar todo el medio que pueda haber quedado adherido en las raíces. Sumergirlas completamente y sólo por unos segundos en una solución fungicida.
2. Transferir las plantas a medios con materiales que permitan buena filtración de agua y aireado de raíces. Piedra pómez, carbón, corteza de pino, cáscara de coco y pashte son algunos materiales recomendados para hacer los medios externos. Recordar que estos deben proporcionar principalmente soporte a la planta, y a la vez deben retener poca agua y permitir la aireación de las raíces.
3. Las primeras semanas después de haberlas extraído del vidrio, cubrirlas con una tela agrícola húmeda y/o rocíe las plantas con un aspersor de gota fina. Cada especie tiene preferencias de humedad, luz y temperatura. Informarse sobre las

condiciones climáticas de la región de donde proviene la especie y sobre su hábito (litófito, epífito o terrestre) para hacer su aclimatación.

5. RESULTADOS DE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE CRECIMIENTO DE ALGUNAS ESPECIES DE ORQUÍDEAS

El crecimiento de varias especies de orquídeas en diferentes medios de cultivo in vitro ha sido tema de investigación planteado dentro del marco de la línea de Biotecnología del IARN/URL. Dicha investigación está diseñada para cumplir con el objetivo de *Desarrollar conocimientos que apoyen a la conservación ex situ de especies de flora nativas, endémicas y/o amenazadas de Guatemala*, planteado dentro del Programa.

Los resultados obtenidos después de dos años de iniciada la investigación se comparten en el cuadro 2, con la finalidad de difundir información que contribuya a la propagación de 24 especies con distribución en el país.

Cuadro 2. Resultados de propagación de diferentes especies de orquídeas

| Especie | Crecimiento en diferentes medios de cultivo |
|--------------------------------|--|
| <i>Barkeria skinneri</i> | Prueba de siembras en dos concentraciones distintas del medio MS. Los resultados de la germinación son positivos en ambos medios, el promedio de germinación es de 25 días. El desarrollo después de la germinación es lento en ambos medios. El crecimiento reportado después de 18 meses de germinación es de dos centímetros. |
| <i>Catasetum intergerrinum</i> | Siembras en dos concentraciones diferentes del medio MS. La germinación se observó a los 7.5 meses de haberse sembrado. El crecimiento de las plantas es rápido en ½ MS. La aclimatación de las plantas se hizo seis meses después de observarse la germinación cuando las plantas alcanzaron un pseudobulbo de 1.5 centímetros. |
| <i>Comparettia falcata</i> | Siembras en dos concentraciones diferentes del medio MS. Se observa germinación mínima a los seis meses de siembra y muy bajo crecimiento de plantas al año y tres meses de haber germinado (menos de 1 centímetro). |
| <i>Epidendrum arbuscula</i> | Siembra en medio MS con hormonas adicionales. Presenta germinación después de dos meses de siembra. No se observa desarrollo después de siete meses de germinación. |
| <i>Epidendrum sp.</i> | Siembra en medio MS y ½ MS. Presenta germinación después de un mes de siembra. Germinación adecuada en MS y buen desarrollo en ½ MS. |
| <i>Epidendrum macdougalli</i> | Siembra en medio MS. Germina 12 días después de sembrarse y se observa buen desarrollo. Mejor desarrollo en 1/2MS. Se observa crecimiento de cuatro centímetros después de un año de haber germinado. La aclimatación se hizo con plantas de cuatro centímetros. |

| Especie | Crecimiento en diferentes medios de cultivo |
|-----------------------------|---|
| <i>Epidendrum radicans</i> | Siembra en medio MS y ½ MS. Germinación se observa después de un mes de siembra. Buen desarrollo en MS y ½ MS. |
| <i>Epidendrum poliantum</i> | Siembra en MS. Germina 14 días después de la siembra. Pobre desarrollo en MS y en MS + hormonas. Buen desarrollo en Coco-Tiamina y en ½ MS. Alcanza cinco centímetros de altura después de dos años de haber germinado. |
| <i>Epidendrum ciliare</i> | Siembra en ½ MS. Germina dos meses y ocho días después de la siembra. Se observa 1 centímetro de crecimiento después de cinco meses de haber germinado. |
| <i>Encyclia cordigera</i> | Siembra en MS y ½ MS. Buena germinación en ambos medios y pobre desarrollo en MS. Pruebas de desarrollo en KC1, KC2, KC3 y Coco-tiamina negativos. Sólo se observa desarrollo en ½ MS. Alcanza talla de cinco centímetros después de diez meses de haber germinado. |
| <i>Encyclia cochleata</i> | Siembra en ½ MS. Germina 34 días después de la siembra. Diez meses después de la germinación se observan dos centímetros de crecimiento. |
| <i>Encyclia fragans</i> | Siembra en medio ½ MS. Se observa germinación después de 82 días a partir de la siembra. El crecimiento observado es de 0.5 centímetros después de diez meses a partir de la germinación. |

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro 3 presenta los resultados parciales obtenidos a la fecha de dicha investigación y puede usarse como guía para decidir en

qué medio sembrar semillas para obtener los mejores resultados.

Cuadro 3. Germinación y desarrollo de especies de orquídeas por medio de cultivo

| Género/Especie | MS | MS + H | ½ MS | K C1 | KC2 | K C3 | Coco-tiamina | Observaciones |
|--------------------------------|------|--------|------|------|-----|------|--------------|---|
| <i>Barkeria skinneri</i> | G,d | | G, d | | | | | Buena germinación en MS y ½ MS. Lento desarrollo en ambos |
| <i>Catasetum sp.</i> | G | | D | | | | | Buena germinación en MS y excelente desarrollo en ½ MS |
| <i>Comparettia falcata</i> | g | | g | | | | | Pobre germinación en ambos medios y desarrollo muy lento |
| <i>Epidendrum arbusculum</i> | | G | | | | | | Buena germinación en ½ MS |
| <i>Epidendrum sp.</i> | Gd | | D | | | | | Buena germinación en MS y buen desarrollo en ½ MS |
| <i>Epidendrum macdougallii</i> | G, d | | D | | | | | Buena germinación en MS. Buen desarrollo en MS y mejor desarrollo en ½ MS |
| <i>Epidendrum radicans</i> | G, D | | D | | | | | Buena germinación en MS y buen desarrollo en MS y en ½ MS |

Continúa

| Género/Especie | MS | MS + H | ½ MS | K C1 | KC2 | K C3 | Coco-tiamina | Observaciones |
|-------------------------------------|----|--------|------|------|-----|------|--------------|--|
| <i>Epidendrum polyanthum</i> | Gd | d | D | | | | D | Buena germinación en MS y pobre desarrollo en el mismo. Buen desarrollo en ½ MS y coco-tiamina |
| <i>Epidendrum ciliare</i> | | G | | | | | | Buena germinación en ½ MS |
| <i>Encyclia cordigera</i> | G | d | G,D | d | d | d | d | Buena germinación en MS y ½ MS. No hay desarrollo adecuado en medios MS, ½ MS, K1. Demás medios en evaluación |
| <i>Encyclia cochleata</i> | | | Gd | | | | | Buena terminación en ½ MS. Desarrollo lento en ½ MS |
| <i>Encyclia fragans</i> | | | G | | | | | |
| <i>Guarianthe aurantiaca</i> | G | d | G, d | | | | D | Buena germinación en MS y MS+H. Desarrollo en estos medios es lento y se marchitan hojas. El desarrollo más rápido se observa en Coco-tiamina. |
| <i>G. guatemalensis</i> | G | | GD | | | | | Buena germinación en ambos medios. Desarrollo más acelerado en ½ MS |
| <i>Laelia sp.</i> | | | G, D | | | | | Buena germinación y buen desarrollo en ½ MS |
| <i>Lycaste sp.</i> | G | | | | | | | |
| <i>Lycaste cochleata</i> | | | G | | | | | |
| <i>Lycaste ipala</i> | | | G,D | | | | | Buena germinación y desarrollo en ½ MS |
| <i>Oncidium sp.</i> | | | G | | | | | Buena germinación en ½ MS |
| <i>Prosthechea ochracea</i> | | | G, D | | | | | Buena germinación y buen desarrollo en ½ MS |
| <i>Ryincholaelia digbyana</i> | | | G | | | | | Germinación en ½ MS |
| <i>Sobralia macrantha</i> | | | G | | | | | Germinación en ½ MS |
| <i>Stanhopea sp.</i> | | | G, D | | | | | Buena germinación y buen desarrollo en ½ MS |
| <i>Trichocentrum cavendishianum</i> | | | G | | | | | Buena germinación en MS |

Fuente: Elaboración propia.

M: Murashige & Skoog; **½ MS** Mitad de Murashige & Skoog; **MS+H** Medio Murashige & Skoog con hormonas; **KC1** Medio Knudson receta 1; **KC2** Medio Knudson receta 2; **KC3** Medio Knudson receta 3.

G: Buena Germinación; **D:** Buen desarrollo de plántula; **G:** germinación pobre/lenta; **D:** desarrollo pobre/lento.

6. IMPORTANCIA DE LA PROMOCIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* DE LAS ESPECIES NATIVAS DE GUATEMALA

En esta época marcada por la extinción masiva de especies es válido incrementar los esfuerzos por promover la propagación, sobre todo de especies nuevas dentro del ámbito del cultivo de ornamentales.

GLOSARIO

| | |
|-------------------------|---|
| Agar | Polisacárido en polvo que proviene de algas y que se usa como gelificantes de medios de cultivo. Por lo general, se usa a concentraciones de 6-12g/L. |
| Autoclave | Máquina que alcanza elevada temperatura a alta presión y que se utiliza para esterilizar equipo y líquidos. |
| Auxinas | Grupo de reguladores del crecimiento de callos, división celular, alargamiento celular, iniciación de raíces adventicias, dominancia apical, mantenimiento de dicha dominancia y embriogénesis somática. |
| Cámara de flujo laminar | Área de trabajo que tiene un flujo de aire estéril circulando. El aire se mueve con velocidad uniforme y en flujos paralelos. La unidad tiene un filtro HEPA (alta eficiencia de partículas aéreas) que remueve partículas mínimas que vuelan en el aire. |
| Giberelina | Regulador del crecimiento que influye sobre el alargamiento de células, promueve el crecimiento intermodal y saca a algunas semillas de la dormancia. |
| Hormonas | Reguladores del crecimiento y desarrollo de plantas que ocurren naturalmente en concentraciones muy pequeñas (citoquininas, auxinas y giberelinas). Pueden producirse dentro de la planta o añadirse de forma exógena. |
| <i>In vitro</i> | Crece dentro de vidrio. Propagación de plantas en un ambiente artificial controlado usando recipientes de vidrio o plástico, técnicas asépticas y un medio de crecimiento. |
| Macronutrientes | Elementos que constituyen más del 90% de un medio de crecimiento de plantas. Dentro de éstos se incluyen el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K) y algunos secundarios como calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). |
| Micronutrientes | Elementos que son esenciales para el crecimiento de la planta y que se requieren en cantidades mínimas. Dentro de éstos se encuentran el boro (B), cloro (Cl), cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), yodo (I), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), sodio (Na) y zinc (Zn). |
| Soluciones <i>stock</i> | Composiciones concentradas de nutrientes formuladas por sales minerales, que se hacen anticipadamente para hacer varios lotes de medios. |

REFERENCIAS

1. Akhalkatsi, M; G. Arabuli & R. Lorenz. (2014). Orchids as indicator species of disturbances on limestone quarry in Georgia. *Journal Europaishcer Orchideen*: 46 (1): 123-160.
2. Dix, M.A & Dix M.W. (2006). Diversity, Distribution, Ecology and Economic Importance of Guatemalan Orchids. En: *Biodiversidad de Guatemala*. Cano, E (Ed). Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.
3. Macz, O.E. (1995). *Manual para la Propagación de Orquídeas in Vitro*. Guatemala: Universidad Rafael Landívar.
4. Maldonado, M.R. (1984). *El Cultivo y Propagación de Orquídeas en Guatemala: Cuidados Culturales*. Tesis para optar al título de Fitotecnista Especializado en Cultivos otorgado por la Universidad Rafael Landívar. Guatemala: URL.
5. Mayo, A. et al. (2010). *Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco*. Tabasco, México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
6. McKendrik, S. (2000). *Manual para la Germinación In Vitro de Orquídeas*. Ecuador: Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
7. Menchaca, R. (2011). *Manual para la Propagación de Orquídeas*. México: Comisión Nacional Forestal
8. Instituto de Agricultura Recursos Naturales y Ambiente/Universidad Rafael Landívar Iarna/URL. (2013). *Programa de Investigación: Biotecnología*. Serie Documentos de Trabajo 01/2013. Guatemala: autor.
9. Instituto de Agricultura Recursos Naturales y Ambiente/Universidad Rafael Landívar Iarna/URL. (2012). *Perfil Ambiental de Guatemala 2010-2012: Vulnerabilidad local y creciente construcción de riesgo*. Guatemala: autor.
10. The Plant Biotechnology Project. (2010). *A Guide Book in Orchid Micropropagation*. Philippines: Rizal Technology University.
11. Veliz, M. (2008). *Diversidad florística de Guatemala*. En: *Guatemala y su Biodiversidad: Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico*. Guatemala: Consejo Nacional de Áreas Protegidas.