UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Desarrollo in vitro de *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. (Orchidaceae), Panamá, 2001.

Por:
Pablo Antonio Acosta A.

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas como requisito parcial para optar por el título de licenciado en Biología con especialización en Botánica

Provincia de Chiriquí, República de Panamá

- 2004 -

DEDICATORIA

A Dios por regalarme la vida

A mis padres Pablo y Luz por su guía

A mis hermanos Paúl y Elvia a quienes aprecio

A mis amigos por su apoyo y

A mi novia Cindy por su amor.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a Dios todo poderoso por haberme guiado, orientado, dado fortaleza y voluntad para culminar exitosamente mis estudios.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas por permitirme utilizar sus instalaciones y brindarme facilidades para realizar este proyecto.

A mis profesores asesores Ivonne del C. Oviedo, Rafael Rincón y Pedro Caballero, quienes colaboraron con mi curiosidad científica.

Quiero hacer un reconocimiento especial a Janet Samudio y Daira Icaza quienes me brindaron su ayuda en este proyecto.

Agradezco al Ing. Azael Caballero y a su esposa Lic. Carmen de Caballero por brindarme el material vegetal para hacer este proyecto.

Desde lo más profundo de mi corazón, agradezco a mis padres el haberme dado la vida, cuidarme, educarme, apoyarme, amarme y por brindarme la oportunidad de ser alguien en la vida, un profesional.

A mis hermanos por comprenderme y darme apoyo cuando los necesité.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí que de una u otra forma han contribuido a mi desarrollo profesional.

A todos mis amigos y personas más allegadas, por recordarme el valor de las cosas, que no hay nada más importante que ser un profesional y que las metas en la vida se pueden lograr.

A Cindy por enseñarme a caminar por la vida con la vista al frente porque somos únicos e importantes, por quererme incondicionalmente y sobre todo por tenerme paciencia y apoyarme cuando la necesité.

INDICE GENERAL

Página

DEDICATORIA.....ii

AGRADECIMIENTO.....iii

INDICE GENERAL.....v

INDICE DE CUADROS.....viii

INDICE DE FIGURAS.....xi

INDICE DE ANEXOS.....xvi

RESUMEN.....xvii

I. INTRODUCCIÓN.....1

II. REVISIÓN DE LITERATURA.....3

A. EL CULTIVO IN VITRO EN LA MICROPROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS.....3

1. Técnicas de esterilización y manipulaciones asépticas.....3

2. Medios de cultivo para la germinación de orquídeas.....7

2.1. Sales inorgánicas.....7

2.1.1. Macro-elementos.....8

2.1.2. Micro-elementos.....11

2.2. Compuestos orgánicos.....14

2.2.1. Carbohidratos.....14

2.2.2. Sustancias hormonales.....15

2.2.3. Vitaminas....16
2.3. Complejos naturales....16
2.4. Materiales inertes y de soporte....17
2.4.1. Agar....17
3. Requerimientos ambientales....17
3.1. Temperatura....17
3.2. Luz....18
B. ALGUNOS ASPECTOS DE LA MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE *Brassavola nodosa* 20
1. Morfología....20
1.1. Clasificación botánica....20
1.2. Descripción botánica....21
2. Fisiología....24
2.1. La biología de la germinación de semillas de orquídeas....24
III. METODOLOGÍA....25
A. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL DE TRABAJO Y DEL ÁREA DE SIEMBRA Y CRECIMIENTO....26
B. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE SIEMBRA....26
C. SELECCIÓN Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL....27
D. SIEMBRA DE LOS EXPLANTES....30
E. EVALUACIÓN....32
F. PROCESAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS....35

INDICE DE CUADROS

Nº y Nombre de cuadros Página

Cuadro 1 Crecimiento (cm) en longitud y grosor de explantes de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 15 días después de la siembra.(n=25).....66

Cuadro 2. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de protocormos de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 30 días después de la siembra.(n=25).....67

Cuadro 3. Crecimiento (cm) en longitud y grosor del protocormo y del vástago de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 60 días después de la siembra.(n=25).....68

Cuadro 4. Longitud de hojas (cm) de protocormo y plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 60 días después de la siembra.(n=25).....69

Cuadro 5. Raíces adventicias en protocormo y plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 60 días después de la siembra.(n=25).....70

Cuadro 6. Crecimiento (cm) en longitud del vástago y grosor del pseudobuldo de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 90 días después de la siembra.(n=25).....71

Cuadro 7. Crecimiento (cm) en longitud del vástago y grosor del pseudobulbo de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 120 días después de la siembra.(n=25).....72

Cuadro 8. Longitud del sistema radical en (cm) de plántulas de *B, nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 120 días después de la siembra.(n=25).....73

Cuadro 9. Crecimiento (cm) en longitud del vástago y grosor del pseudobulbo de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 150 días después de la siembra.(n=25).....74

Cuadro 10. Longitud del sistema radical en (cm) de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 150 días después de la siembra.(n=25).....75

Cuadro 11. Crecimiento (cm) longitud y grosor del vástago de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, desde la germinación hasta los 150 días después de la siembra (d.d..s.) (Datos utilizados = $\bar{x}$).....76

INDICE DE FIGURAS

Nº y Nombre de figuras Página

Fig. 1. *Brassavola nodosa* (L.) Lindl.....22

Fig. 2. Cápsula de *B. nodosa* (L.) Lindl.....23

Fig. 3. Apertura de Cápsula de *B. nodosa*, en la cámara de flujo laminar.....28

Fig. 4. Cápsula abierta de *B. nodosa*, en la cámara de flujo laminar.....28

Fig. 5. A. Cápsula y semillas expuestas de *B. nodosa*, B. Semillas en solución de cloro (hipoclorito de sodio 5,25%) al 10%.....29

Fig. 6. Separación de semillas viables y no viables de *B. nodosa*.....29

Fig. 7. Lavado de semillas de *B. nodosa*, con agua destilada estéril.....30

Fig. 8. Siembra de semillas de *B. nodosa*, en medios de germinación (Knudson C Modificado, 1946).....31

Fig. 9. Explantes de *B. nodosa* , en medio de germinación
(Knudson C Modificado, 1946).....31

Fig. 10. Explantes de *B. nodosa* , en medio de crecimiento
(Knudson C Modificado, 1946).....33

Fig. 11. Semilla de *B. nodosa*, 400X. A. Embrión sin germinar, B. Cubierta seminal..... 36

Fig. 12. Medio de germinación, Knudson C Modificado (1946).....38

Fig. 13. Medio de crecimiento, Knudson C Modificado (1946).....38

Fig. 14. Explantes de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado
(1946), 15 d.d.s. 400X. A. Embrión germinado, B. Radícula.....39

Fig. 15. Explantes de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar)
y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 15 d.d.s.
A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.....40

Fig. 16 . Crecimiento (cm) en longitud y grosor de explantes de *B. nodosa* in vitro
en medio Knudson C modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar)
en tres concentraciones diferentes, 15 d.d.s.....41

Fig. 17. Protocormos de *B. nodosa*, en medio Knudson C Modificado (1946), 30 d.d.s. A.Embrión germinado, B. Crecimiento apical y C. Restos de la cubierta seminal..... 42

Fig. 18. Explantes de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 30 d.d.s. A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.....42

Fig. 19. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de protocormos de *B. nodosa* in vitro en Knudson C modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 30 d.d.s.....43

Fig. 20. Plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones, 60 d.d.s. A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.....45

Fig. 21. Crecimiento (cm) en longitud y grosor protocormo y plántulas de *B. nodosa* in vitro en Knudson C modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 60 d.d.s.....46

Fig. 22. Plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 90 d.d.s.

A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.....47

Fig. 23 . Crecimiento (cm) en longitud y grosor de protocormo y plántulas de *B. nodosa* in vitro en medio Knudson C modificado (1946,)líquido (sin agar) y sólido (con agar)con tres diferentes concentraciones de agar, 90 d.d.s.....48

Fig. 24. Plántulas de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes 120 d.d.s.
A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.....50

Fig. 25. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de plántulas de *B. nodosa* in vitro en Knudson C modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 120 d.d.s.....51

Fig. 26. Plántulas de *B. nodosa* en Knudson C modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 150 d.d.s.
A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.....53

Fig. 27. Crecimiento (cm)en longitud y grosor de plántulas de *B. nodosa* in vitro en medio Knudson C modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 150 d.d.s.....54

Fig. 28. Crecimiento en longitud del pseudobulbo de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, desde la germinación hasta los 150 días después de la siembra.....55

Fig. 29. Crecimiento en grosor del pseudobulbo de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, desde la germinación hasta los 150 días después de la siembra.....57

INDICE DE ANEXOS

Nº y Nombre de Anexo Página

Anexo 1. Cuadros de datos.....65

Anexo 2. Análisis estadístico.....77

RESUMEN

Se investigó la fisiología del desarrollo de *Brassavola nodosa* (L.) Lindl., in vitro para establecer una biotécnica apropiada y de bajo costo con fines comerciales y de conservación de la especie.

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas en la Universidad Autónoma de Chiriquí. Se evaluó el desarrollo in vitro de *B. nodosa* durante 150 días en medio Knudson C Modificado (1946) líquido y sólido (tres diferentes concentraciones de agar), en condiciones ambientales controladas, una temperatura de 22 ±1°C, una intensidad lumínica de 2675 lux y un fotoperiodo de 12 horas. Se determinó el porcentaje de viabilidad y de germinacíon de la semilla a la siembra, la morfología de la semilla y del embrión. Además, se evaluó el crecimiento y el desarrollo del embrión hasta los 150 días de edad; para ello se midió el tamaño promedio de las plántulas, el número de primordios foliares, número y tamaño promedio de las hojas, el número de raíces y la longitud total de las mismas.

La viabilidad de la semilla de *B. nodosa*, al momento de la siembra, fue de 34,6%; la germinación ocurrió a los 15 días después de la siembra (d.d.s.), la formación de los primordios foliares a los 90 d.d.s. y primordios radicales a los 120 d.d.s. A los 150 días se

observaron las plantas con 3 hojas y con longitudes promedio de 0,24cm (0g de agar); 0,93cm (7g de agar); 0, 98cm (10g de agar) y 0,74cm (13 g de agar); los primordios radicales, alcanzaron longitudes promedio de 0,02cm (0g de agar); 0,108cm (7 g de agar); 0,112cm (10g de agar) y 0,78cm (13 g de agar).

Durante el desarrollo in vitro de *B. nodosa* se puede establecer que es una planta de germinación y crecimiento rápido, que no requiere de la ayuda de reguladores de crecimiento exógenos para la formación de hojas ni de raíces. Los sustratos más favorables para el crecimiento y desarrollo de *B. nodosa* fue el Knudson C Modificado (1946) con 10g y 7g de agar, y el sustrato menos favorable fue el de 0g de agar.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo in vitro de tejidos vegetales es una técnica empleada hace un par de décadas. Ésta consiste en propagar una célula o grupos de células totipotenciales, llamados explantes, a las cuales se les proporciona los requerimientos esenciales para su eficiente crecimiento y desarrollo (Hartmann et al, 1990; Rivera, 1998).

El cultivo in vitro es muy valioso para reproducir un gran número de plantas, en poco espacio y conservando las características genéticas de la planta de la cual se extrae el explante, ya sea con fines comerciales o para su conservación (Hurtado y Merino, 1998).

En el cultivo in vitro de orquídeas se usan varias modalidades de cultivo, tales como: cultivo de semillas, meristemos y protoplastos. En cualquiera de las formas antes mencionadas, se requiere de un sustrato o medio de cultivo, a partir del cual los tejidos en desarrollo se nutran y obtengan un soporte físico (Hartmann et al, 1990; Mudge y Chu, 1992).

Actualmente existe mucha literatura sobre la propagación in vitro de orquídeas en el mundo, pero sobre especies del género *Brassavola* es muy escasa según lo investigado.

Vidoz, 2002 realizó estudios in vitro sobre el género *Brassavola*, las semillas de *B. perrinii* fueron sembradas en medio Murashige y Skoog 1962, y a los 120 días después de la siembra, los protocormos obtenidos medían entre 0,1-0,3cm de diámetro.

Las orquídeas tienen bajas probabilidades de reproducción en la naturaleza y además son muy cotizadas por coleccionistas actualmente, por lo que se requiere de una biotécnica que permita la germinación in vitro, asegurando un gran número de plantas. Esta investigación tiene como objetivo estudiar la fisiología del desarrollo de *Brassavola nodosa* (L.)Lindl., en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar), en tres concentraciones diferentes; se determinará el mejor sustrato para la propagación in vitro de *B. nodosa*, todo esto con el fin de desarrollar una biotécnica apropiada, de bajo costo, para el cultivo in vitro de *B. nodosa* con fines comerciales y de conservación de la especie.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. EL CULTIVO IN VITRO EN LA MICROPROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS.

1. Técnicas de esterilización y manipulaciones asépticas

Las condiciones de esterilidad en el cultivo in vitro son fundamentales porque los medios de cultivo utilizados contienen nutrientes, los cuales pueden facilitar el crecimiento de muchas bacterias y hongos. El crecimiento abundante y en corto tiempo de ellos provocaría el crecimiento más lento de los tejidos vegetales; aún los organismos contaminantes con crecimiento lento son indeseables, debido a que pueden producir toxinas que afectan el crecimiento de las células vegetales. Por estas razones el material vegetativo se desinfecta superficialmente antes de iniciar un cultivo in vitro, y todo el manejo de los tejidos se hace en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar de aire, en áreas específicas para este propósito (George y Sherrington, 1984; Kyte, 1987; Mudge y Chu,1992).

Todos los medios, instrumentos y envases de cultivo deben esterilizarse para matar las células vegetativas, esporas y otras estructuras reproductivas de los microorganismos que

causan contaminación de los cultivos (Rivera, 1998).

El método más común de esterilización es el de vapor húmedo, empleando autoclaves que actúan con vapor a presión. En los laboratorios grandes los autoclaves son automáticos o semiautomáticos, eléctricos o de gas; los hay de tipo horizontal y vertical. Cuando se esterilizan volúmenes pequeños de medios de cultivo o material de trabajo se puede utilizar una olla de presión casera (Mudge y Chu 1992; Sevillano, 2002).

Casi siempre el tiempo empleado para una buena esterilización es de 15 minutos a una presión de 15 lbs/pulg^2 y a una temperatura de 120-121°C, sin dejar de tomar en cuenta que cuando se esteriliza un volumen mayor, se debe esterilizar por un tiempo mayor. Algo que debe evitarse es sobrepasarse en la esterilización, puesto que trae como consecuencia la degradación de los componentes del medio nutritivo, así como la caramelización de los azúcares. Los instrumentos como pinzas, tijeras, bisturíes, etc., se envuelven en papel aluminio o papel manila para su buena esterilización con el fin de no contaminarlos al salir luego de esterilizarlos (Kyte, 1987; Mudge y Chu,1992; Hurtado y Merino, 1997; Rivera,1998).

Las espátulas, pinzas y bisturíes se mantienen sumergidos en alcohol al 96 % hasta el momento de su uso, y se esterilizan conforme se van empleando, por medio de frecuentes inmersiones en alcohol, seguidas por flameo (Mudge y Chu, 1992).

El material vegetativo, debe desinfectarse, ya sea una cápsula o semillas, siguiendo patrones de esterilización muy diferentes. Podemos indicar que casi siempre se utilizan soluciones de hipoclorito de sodio (blanqueador casero), los cuales liberan el cloro como agente desinfectante activo. Las concentraciones utilizadas van desde 0,1 a 10 %. También puede ser empleado el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), agua de bromo, nitrato de plata y cloruro mercúrico (Kyte, 1987; Mudge y Chu,1992; Hurtado y Merino, 1997; Rivera,1998).

Por lo general, antes de poner el material vegetativo en contacto con el agente desinfectante, se sumerge en alcohol etílico al 70%, con lo cual se eliminan las grasas y se permite una mejor penetración del agente desinfectante en el material (Rivera, 1998).

El trabajo que se realiza en la sala de siembra puede hacerse en una mesa de laboratorio, creando un área estéril con unos mecheros de Bunsen; pero para reducir la posibilidad de contaminación el trabajo debe realizarse en un área estéril, proporcionada por la cámara de flujo laminar al aire. Lo ideal es tener estas cámaras en un lugar que se pueda esterilizar por medio de luz ultra violeta. Estos cuartos, además de la cámara, deben tener filtro de aire o unidad de ventana (Mudge y Chu,1992; Rivera,1998; Sevillano, 2002; Bartina, 2002).

Según Hurtado y Merino (1997), en una cámara de flujo laminar de aire, esté es forzado bajo presión a través de un filtro por la parte trasera de la cámara y fluye sobre el

área de trabajo a una velocidad uniforme. La velocidad del flujo de aire evita que las partículas se depositen en el área de trabajo.

Rivera (1998), señala que en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, la limpieza y una organización eficiente del trabajo, contribuyen a reducir el riesgo de contaminación .

2. Medios de Cultivo para la germinación de orquídeas

El medio de mayor aplicación en la germinación de semillas de orquídeas es el Knudson (1946). En las fases de transplante se puede utilizar el mismo medio de germinación, adicionándole ciertos suplementos. El medio básico Knudson puede ser modificado para lograr mejor germinación en ciertas especies. Arditti (1967) modificó la fórmula de Knudson agregando extracto de banano, con lo cual logró aumentar la tasa de crecimiento de las plántulas (Rivera, 1998).

Todos los medios de cultivo contienen ingredientes que se pueden clasificar en:

a) Sales inorgánicas

b) Compuestos orgánicos

c) Complejos naturales

d) Materiales inertes de soporte

2.1. Sales inorgánicas

Se ha llevado a cabo muchas investigaciones con el fin de optimizar las necesidades de las plantas, lo cual ha traído como consecuencia la formulación de varias mezclas salinas, que incluyen macronutrientes y micronutrientes.

Los elementos esenciales para las plantas se adicionan en los medios de cultivo de tejidos. Siete de estos son los constituyentes principales de fertilizantes comunes: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe). Los tres elementos principales restantes son carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), y serán analizados como elementos químicos con un papel principal (Miller, 1967; Devlin, 1980; Fernández y Jhonston, 1986; Lira, 1994; Salisbury y Ross, 1994).

2.1.1. Macroelementos

Nitrógeno (N): influye en la proporción de crecimiento de la planta. Es un elemento esencial en la producción de moléculas de clorofila, alcaloides, ácidos nucleicos, algunas hormonas vegetales y aminoácidos. La carencia de nitrógeno esta caracterizada por las hojas amarillas y un retraso de crecimiento. El exceso de nitrógeno promueve el crecimiento vigoroso pero suprime el desarrollo del fruto. Las fuentes de nitrógeno para medio de cultivo de tejido son: amonio $(NH_4)^+$ y nitrato $(NO_3)^-$ (Kyte, 1987).

La concentración de sales puede tener efectos negativos profundos sobre el cultivo, particularmente el nivel de iones de amonio. La reducción del nitrato de amonio fórmula MS (NH_4NO_3) y el nitrato de potasio (KNO_3) diluido a 1/4 fue encontrado esencial en un informe sobre la inducción de botones del *Pinus* (abeto) de Douglas. Los estudios de otros

géneros (*Rhododendron, Lycopersicum, Arabidopsis* y *Torenia)* para mencionar unos pocos se ha notado efectos similares (Kyte, 1987).

Fósforo (P): es abundante en tejidos meristemáticos y algunos de crecimiento rápido, estimula la floración. Su función principal parece ser de un activador de enzimas. La deficiencia de fósforo causa que las plantas sean anormales y enfermas. El fosfato de potasio (KH_2PO_4) y el fosfato se sodio ($Na_2H_2PO_4 * H_2O$) son incluidos rutinariamente en los medios de cultivo de tejidos (Bhojwanis, 1983; Kyte, 1987; Mudge y Chu, 1992).

Potasio (K): es necesario para la división celular normal, para la síntesis de carbohidratos, proteínas, clorofila, y para la reducción de nitrato. La insuficiencia de potasio genera plantas débiles y anormales. El nitrato de potasio (KNO_3) y el fosfato de potasio (KH_2PO_4) son fuentes comunes de potasio en medios de cultivo de tejido, el cloruro de potasio (KCl) es usado ocasionalmente (Kyte, 1987; Hurtado y Merino, 1997; Rivera, 1998).

Azufre (S): está presente en algunas moléculas de proteínas. Promueve el desarrollo de la raíz y el follaje verde oscuro. Es suministrado al medio de cultivo de tejido en forma de sulfato (SO_4^-) (Kyte, 1987).

Calcio (Ca): el compuesto pectato de calcio, es una parte integral de todas las paredes de células vegetales donde juega un papel importante en la permeabilidad. Facilita el movimiento de carbohidratos y aminoácidos a través de la planta y promueve el desarrollo de la raíz. Como oxalato de calcio se une al ácido oxálico, un subproducto del metabolismo proteico. El calcio es usualmente incluido en el medio de cultivo de tejidos como cloruro de calcio ($CaCl_2 \bullet 2H_2O$) o como nitrato de calcio $Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$ (Bhojwanis, 1983; Kyte, 1987).

Magnesio (Mg): es el elemento central en las moléculas de clorofila y es también importante como activador enzimático. La deficiencia de magnesio causa un follaje amarillento o pálido y débil. La mayoría de las fórmulas de cultivo usan sulfato de magnesio ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$) también conocido como sales de EPSOM (Kyte, 1987; Mudge y Chu, 1992; Hurtado y Merino, 1997; Rivera, 1998).

Hierro (Fe): participa en la síntesis de la clorofila y en la conversión energética de la fotosíntesis y la respiración. La deficiencia en hierro causa clorosis en las hojas de las plantas. En medios de cultivo el sulfato de hierro ($FeSO_4 \bullet 7H_2O$) es mezclado con la solución salina del ácido etilendiamino-tetra acético de disodio, (EDTA Na_2), que deja al hierro mas fácilmente disponible para las plantas (Kyte, 1987; Hurtado y Merino, 1997).

2.1.2. Microelementos

Además de los macroelementos requeridos por las plantas existe un número de otros elementos esenciales para el buen desarrollo y crecimiento los cuales son necesarios solamente en cantidades extremadamente pequeñas. Son los llamados elementos menores, elementos trazas o micronutrientes. Sus funciones no son bien comprendidas. De hecho los microelemnentos son recientemente identificados como esenciales, algunos reconocidos con los síntomas de sus deficiencias.

Las técnicas actuales han permitido alcanzar una gran pureza del agua y los químicos utilizados en los medios de cultivo de tejidos; así mismo, a través de estos métodos se descubrió que los elementos trazas fueron previamente identificados como impurezas no detectables tanto en agua como en los químicos presumiblemente puros. Los elementos trazas están presentes en el suelo, agua y aún en partículas de polvo, en cantidades adecuadas para el crecimiento de la planta. Algunos compuestos "químicamente puros" utilizados en la producción del medio podrían contener trazas de estos elementos, por lo que deben considerarse en las concentraciones de las soluciones. Los excesos de elementos trazas son tóxicos a las plantas (Fernández y Johnston, 1986; Kyte, 1987).

Boro (B): es un elemento que se presume juega un papel importante en el movimiento del azúcar. La escasez o carencia de este elemento produce interesantes síntomas de deficiencias, usualmente daño en las plantas de olivas. Cantidades excesivas

de boro causan daño a la planta o la muerte, por lo que ciertos herbicidas son boratos. El boro es añadido a los medios de cultivos de tejido en cantidades pequeñas como ácido bórico (H_3BO_3) (Kyte, 1987; Mudge y Chu, 1992).

Molibdeno (Mo): se cree que participa en la conversión del nitrógeno a la amonia, este también ayuda a la fijación del nitrógeno (la conversión del nitrógeno atmosférico a nitrato por las bacterias fijadoras). Es requerido para el crecimiento normal y es añadido a medios de cultivo de tejido como molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \bullet 2H_2O$); cantidades excedentes a diez partes por millón pueden ser perjudiciales para las plantas (Bhojwanis, 1983; Kyte, 1987).

Manganeso (Mn): la deficiencia de este elemento esta caracterizada por varios síntomas cloróticos a menudo un moteado amarillento de las hojas. Es un elemento esencial en la membrana cloroplasmática. El sulfato de manganeso ($MnSO_4 \bullet H_2O$) suministra el manganeso necesario en medios de cultivo de tejido (Hurtado y Merino, 1997).

Cobalto (Co): es un elemento en la molécula del complejo de vitamina B - 12 ($C_{63}H_{90}N_{14}O_{14}PCo$), el cual es esencial para la fijación de nitrógeno. El cloruro de cobalto ($CoCl_2 \bullet 6H_2O$) es añadido a la mayoría de los medios en 0,25mg por litro (Kyte, 1987).

Zinc (Zn): es un elemento vital en muchas enzimas; esta involucrado en la formación de la clorofila así como también en la producción de la auxina ácido indolacético (IAA); una traza de zinc como el sulfato se zinc ($ZnSO_4 7H_2O$) se añade a los medios para cultivo de tejidos; las cantidades en exceso son tóxicas a las plantas (Kyte, 1987; Mudge y Chu, 1992).

Cobre (Cu): la deficiencia de este microelemento causa crecimiento retardado, malformaciones, hojas manchadas o dobladas o muerte de vástagos jóvenes. Se creía que el cobre era necesario en la conversión de la energía debido a su oxido-reducción entre el estado cuproso y cúprico. Solamente 0,025mg de sulfato cúprico ($CuSO_4 \bullet 5H_2O$) por litro de medio es requerido para suplir las necesidades en el cultivo de tejido de la mayoría de las plantas (Kyte, 1987; Mudge y Chu, 1992; Rivera, 1998).

Cloro (Cl): es esencial para ayudar a estimular la fotosíntesis. No es comprendida la forma en que trabaja. Los síntomas de deficiencia se observan en las hojas, las cuales llegan a ser amarillentas o bronceadas y mueren. Las plantas requieren cloro en cantidades mínimas, pero éste está incluido en algunos medios de cultivo en grandes cantidades como cloruro de calcio ($CaCl_2 \bullet 2H_2O$) (Kyte, 1987; Hurtado y Merino, 1997).

Yodo (I): es añadido al medio como yodo - yoduro de potasio (IKI). No es considerado usualmente como elemento esencial aunque este es un componente de algunos

aminoácidos. Algunos trabajos omiten el yodo del medio de *Rododendron* (Bhojwanis, 1983; Kyte, 1987).

2.2.Compuestos orgánicos

Podemos clasificarlos en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales (reguladores de crecimiento) y vitaminas (Mudge y Chu, 1992).

2.2.1. Carbohidratos

Son compuestos químicos orgánicos tales como azúcares, almidones y celulosas. En cantidades variadas, carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) son los principales que constituyen las moléculas de estos compuestos. Estos elementos son generosamente suministrados por el aire y el agua principalmente como dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O). Sin embargo, como las plantas en cultivo son demasiado pequeñas o demasiado incompletas para sintetizar todas de los compuestos orgánicos que ellas necesitan, entonces requieren que se les agreguen las sustancias orgánicas al medio de cultivo (Kyte, 1987).

El crecimiento de las plantas, cultivadas in *vitro* no pueden producir todos los azúcares que ellas requieren; por lo que una concentración alta de sacarosa (30g/L), es

recomendada en la mayoría de los medios. La sacarosa pura, el azúcar de mesa, de la caña de azúcar, puede ser utilizado con este fin (Mudge y Chu, 1992).

2.2.2 Sustancias hormonales

Se sabe que una fuente de carbono y una o dos vitaminas no son suficientes para algunas plantas y requieren que se les adicione alguna sustancia reguladora del crecimiento. Estas se pueden suministrar de compuestos químicos definidos, que se han producido sintéticamente como el ácido naftalen ácetico (ANA), el ácido indol butírico (IBA), el 2,4 D que pertenecen al grupo de las auxinas o de sustancias naturales como el agua de coco que contiene citocininas y estimula el crecimiento in vitro de algunas plantas, por ejemplo, las orquídeas. Estas sustancias se han encontrado que son útiles para el establecimiento y mantenimiento de cultivo de tejidos (Roca, 1991); las más utilizadas son las auxinas, citocininas y giberelinas.

Auxinas: La auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular. Sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Roca, 1991).

Citokininas: primeramente llamadas kininas, son reguladores de crecimiento que promueven la división celular, ayudan al control de la germinación de semilla, afecta la abscisión de la hoja, influyen en el transporte de la auxina, permite a las giberelinas trabajar superando a los inhibidores y retardando la senescencia (Kyte, 1987).

Giberelinas: son un grupo de sustancias que existen en forma natural que influyen en el alargamiento o incremento celular. El ácido giberélico es el más conocido; más de 100 giberelinas han sido químicamente identificadas. Algunas de ellas aparecen en embriones, donde inician la producción de la alfa-amilasa, la cual convierte el almidón en azúcar y estimula otras enzimas (Kyte, 1987).

2.2.3. Vitaminas

La única vitamina que ha demostrado tener importancia en cultivo de células y órganos es la tiamina; algunas otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos. (Hurtado y Merino, 1997).

2.3. Complejos naturales

Muchas preparaciones de composición indefinida han sido empleadas para enriquecer los medios de cultivo; frecuentemente se han empleado como última alternativa

después de que todos los ingredientes definidos del medio han fallado en el establecimiento de cultivos de células y órganos. El extracto de banano es un componente natural utilizado como suplemento vitamínico y como fuente de hierro (Mudge y Chu, 1992).

En los medios de cultivo en algunos casos se añade carbón activado o "charcoal" como un componente desintoxicante (Kyte, 1987).

2.4. Materiales inertes de soporte

2.4.1 Agar: el agar es una mezcla de polisacáridos derivados de extractos de diversas especies de algas rojas un agente gelificante, el agar en medios de cultivo de tejidos es suficientemente fuerte para soportar el cultivo (Mudge y Chu, 1992).

3. Requerimientos ambientales

3.1. Temperatura

Cuando se ajusta la temperatura para la germinación de semillas de orquídeas se deben seguir cuidadosamente las instrucciones. La temperatura apropiada en un cultivo

nuevo requiere ser determinada mediante varios ensayos. En algunos casos la reducción de la temperatura a 4° C por cortos períodos de tiempo puede inducir o modificar la germinación y el crecimiento de las plántulas. Se recomienda mantener una temperatura entre los 20°C y 35°C (Light, 1995; Hurtado y Merino, 1997).

3.2. Luz

Como el resto de las plantas que florecen las orquídeas necesitan absorber la mayor cantidad de luz que puedan tolerar. Si cultiva orquídeas dentro de la casa una ventana con vista al sur suele ser el lugar ideal ya que brinda luz indirecta a la planta aun en los meses de invierno, aunque en verano debe asegurarse de que no reciba luz de sol directa ya que podría quemarla por sobreexposición al sol. Se debe tener en cuenta que la duración de la luz es tan importante como la intensidad de la misma, además del color y textura de las paredes que puede influir sobre la cantidad de luz que la orquídea recibe. Usualmente la medida de referencia de la luz que recibe una orquídea se mide en bujía/pie. Una bujía/pie es equivalente a la cantidad de luz que baña un pie cuadrado de superficie a un pie de distancia de una vela encendida. Como referencia, un mediodía luminoso puede generar hasta 10000 bujías/pie, la luz que ingresa por una ventana en un día de verano se acerca a los 8000 bujías/pie cerca de la ventana y conforme se aleja cercana a los 4000. En la sombra de esa misma ventana se obtiene tan solo 600 bujías/pie. No es recomendable estimar la intensidad de luz a simple vista ya que nuestras pupilas se ajustan de manera muy eficiente a la luz. Para este caso es recomendable adquirir un medidor de bujías/pie o utilizar un fotómetro (Kyte, 1987; Lira, 1994; Hurtado y Merino, 1997; Uno et al, 2001).

Cuando vemos colores en nuestras orquídeas lo que vemos es en realidad las longitudes de onda electromagnéticas que no logran absorber. Los pigmentos (químicos coloreados) son simplemente el reflejo de estas ondas no absorbidas por la planta. Estos pigmentos son carotenoides (rojos, naranjas y amarillos)y clorofilas (verdes). Los primeros no son muy buenos capturando la energía lumínica, sino más bien las clorofilas las especialistas en convertir la luz en otras formas de energía química. Así las plantas absorben energía capturando las regiones azul, violeta y rojo del espectro mientras reflejan el verde, motivo por el cual la mayoría de hojas son de ese color (Salisbury y Ross, 1994; Uno et al, 2001).

B. ALGUNOS ASPECTOS DE LA MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE *Brassavola nodosa* (L.) Lindl.

1. Morfología

1.1. Clasificación botánica

Superreino: Eucariota

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Orchidioideae

Tribu: Epindendreae

Subtribu: Laeliinae

Genéro: Brassavola

Especie: B. nodosa

1.2. Descripción Botánica

Brassavola R. Br.

Plantas herbáceas epifitas más o menos engrosados, con 1 o 2 tallos, sépalos libres, iguales, extendidos, lineales a lanceolados a menudo largos y acuminados. Pétalos similares a sépalos. Labios sésiles, erectos mas o menos doblados en la columna, base corta o larga, y angosta, expandido en una lámina amplia la cual es plana, raramente cóncava o algo cuculadas. Columna erecta, usualmente mas corta que la del labio, mas o menos bilabiada, antera operculada, incumbente, cada célula con un séptum longitudinal oscuro, pollinios 8 - 4 en cada celda de la antera, ampliamente ovalados y lateralmente comprimido, ceríceo (Light, 1995; Pupulin, 1998; Rivera, 1998).

Brassavola nodosa (L.) Lindl. Gen & Sp. Orch. Pl 114. 1831 *In* Bot. Reg. 17: t. 1465.1832.

Epidendrum nodosum L. Sp. Pl. 953. 1753.

Brassavola venosa Lindl. *In* Bot. Reg. 26: Misc. p. 20. 1840.

Brassavola scaposa Schltr. *In* Orchis 13:77. 1919.

Plantas herbáceas epífitas, colgantes o erectas, mayores de 40 cm de longitud, usualmente menos de eso, flores a menudo vistosas y muy fragantes en la noche; tallos o pseudobulbos de 2 a 12 cm de longitud cilíndricos, delgados, 0,2 a 0,5 cm de diámetro, usualmente cubierta con una lámina pergaminosa. Hojas de 6 - 23 cm de longitud y 0,3

–2,5cm de ancho, aplanadas; si aplanadas entonces usualmente son lineales – elípticas, agudas. La inflorescencia nace al final del tallo, ya sea mas corta o mas larga que la hoja subtendida, y posee pocas a muchas flores. Sépalos de color verde-pálido, 4 – 9 cm de longitud y de 0,2 – 0,4 cm, lineales y agudos. Pétalos de color verde pálido, de 4 a 9 cm de longitud, 0,05 – 0,2 cm de amplitud, filiforme a lineal, aguda. Labio de color blanco con manchas chocolates en el centro, de 4,5 a 8,0 cm de longitud y 2.5 – 4 cm de ancho, base unguiculada y cuculada, envolviendo la columna, la porción anterior amplia, cordada a orbicular – cordada, acuminada o al menos apiculada, teniendo muchas venas prominentes (Jones 1987; Light, 1995; Pupulin, 1998) ver Fig. 1; la cápsula es globosa con líneas concentrícas que se abren para liberar las semillas (Fig. 2).

Nombre Común: dama de la noche.

Se encuentra desde México hasta Panamá, Indias Occidentales y el norte de América del Sur. Es común en las elevaciones mas bajas de América Central y en las costas del Caribe (Pupulin, 1998).

Fig. 1. *Brassavola nodosa* (L.) Lindl.

Fig 2. Cápsula de *B. nodosa* (L.) Lindl.

2. Fisiología

2.1. La biología de la germinación de semillas de orquídeas

Las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas de polvo porque son minúsculas y contienen pocas reservas de alimento. Usualmente estas semillas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorriza, el cual abastece a las plántulas con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento. Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo. Que en condiciones normales continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años, dependiendo de la especie, hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas. Los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento (McKendrick, 2000).

III. METODOLOGÍA

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí. Se estudió el desarrollo in vitro de *Brassavola nodosa (L.) Lindl.* desde su germinación hasta los 150 días después de la siembra. Se utilizó medio Knudson C Modificado (1946) líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, haciendo un total de cuatro tratamientos (0g, 7g, 10g, 13g de agar).

Se estudió la fisiología de la germinación y del desarrollo del embrión hasta los 150 días después de la siembra. Las variables observadas fueron: el color de los explantes, protocormos, plántulas y plantas; crecimiento de la parte aérea en (cm), número de primordios foliares, de hojas y tamaño promedio de estas en (cm) y crecimiento del sistema radical (cm).

Para lograr los objetivos de esta investigación se llevaron a cabo las siguientes etapas:

A. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO, DEL ÁREA DE SIEMBRA Y CRECIMIENTO

Se procedió a lavar la cristalería (probetas, pipetas, platos petri, erlenmeyer, envases de vidrio con capacidad de 150 ml, volumétricos, vasos químicos y tubos de ensayo) con liquinox al 2%. Luego se enjuagaron con agua del grifo tres veces, finalmente con agua destilada y se dejaron escurrir.

En el cuarto de siembra, se desinfectaron las superficies (mesas, sillas, anaqueles, tablillas, pisos y paredes) con clorox comercial (hipoclorito de sodio al 5,25%). Se limpió el filtro de aire mensualmente y todos los días se roció con aerosol antibacterial.

B. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE SIEMBRA

Se prepararon los medios Knudson C modificado (1946) siguiendo lo indicado por Bhojwani y Razdan (1983). El medio de germinación general contenía agua destilada, macronutrientes, micronutrientes y sacarosa; además se añadió agar en cuatro tratamientos. Sin agar, medio líquido (tratamiento 1), al cual se le colocó perlita y en la superficie de la

misma papel filtro donde se ubicaron las semillas a la hora de la siembra (Behar, 1998); tres medios sólidos: 7 gramos de agar (tratamiento 2), 10 gramos de agar (tratamiento 3) y 13 gramos de agar (tratamiento 4).

En los medios de crecimiento se adicionó, además de los componentes antes mencionados, colado de bananas con hierro y vitamina C, y carbón activado.

Los medio de cultivo fueron tapados con papel aluminio, autoclavados a 15 libras de presión y 121°C por 20 minutos.

C. SELECCIÓN Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La cápsula de *B. nodosa* fue seleccionada en el campo y llevada al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, colocada en un plato petri estéril para la extracción y desinfección de las semillas, etapa que fue efectuada en la cámara de flujo laminar marca Telstar.

Con un bisturí No. 11 se realizó un corte longitudinal a la cápsula de *B. nodosa* para extraer las semillas (Fig 3 y 4); estas fueron depositadas en el plato petri (Fig. 5). Para la desinfección de las semillas, éstas fueron colocadas en un frasco de 5 ml conteniendo una solución de cloro comercial (5,25% de hipoclorito de sodio) al 10% (Fig 5); luego se dejaron reposar por cuatro minutos (Fig. 6) con el objetivo de separar las semillas viables de las no viables. Con un gotero se procedió a retirar la solución de cloro para extraer las semillas sobrenadantes (no viables), las semillas del fondo del frasco (viables) se lavaron con 3ml de agua destilada estéril (fig. 7) y se dejaron reposar por 5 minutos. Estas se conservaron en agua destilada para su posterior siembra.

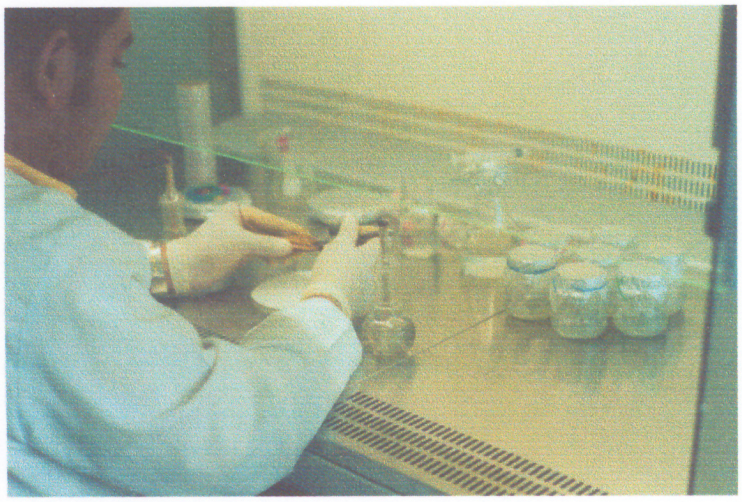

Fig. 3. Apertura de Cápsula de *B. nodosa*, en la cámara de flujo laminar.

Fig. 4. Cápsula abierta de *B. nodosa*, en la cámara de flujo laminar.

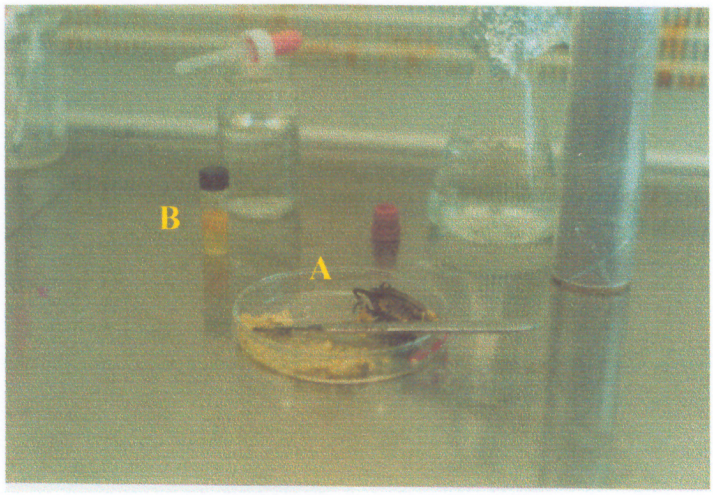

Fig. 5. A.Cápsula y semillas expuestas de *B. nodosa*, B. Semillas en solución de cloro (hipoclorito de sodio 5,25%) al 10%.

Fig. 6. Separación de semillas viables y no viables de *B. nodosa*.

Fig. 7. Lavado de semillas de *B. nodosa*, con agua destilada estéril.

D. SIEMBRA DE LOS EXPLANTES

La semillas de *B. nodosa* fueron tomadas con un gotero y sembradas (2 gotas por frasco) en medios de germinación a razón de seis frascos por tratamiento (Fig. 8). Estos fueron colocados en la cámara de crecimiento a una temperatura de 22± 1°C, una intensidad lumínica de 2675 lux, una humedad relativa de 80 % y con un fotoperiodo de 12 horas (Fig.9), condiciones ambientales también requeridas durante el crecimiento y desarrollo.

Fig. 8. Siembra de semillas de *B. nodosa*, en medios de germinación (Knudson C Modificado, 1946).

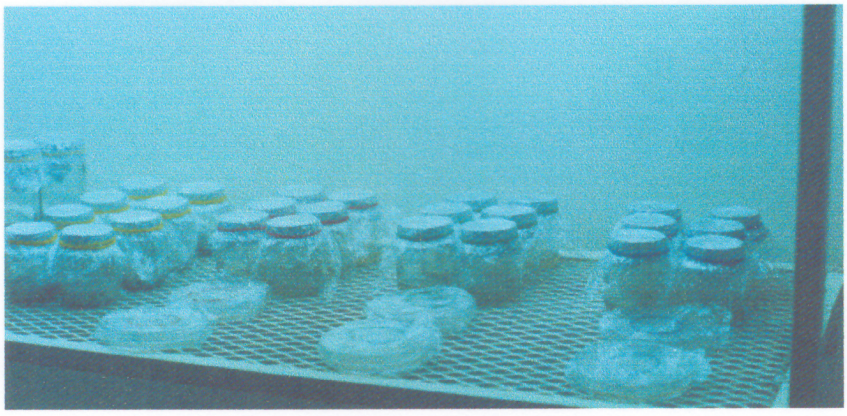

Fig. 9. Explantes de *B. nodosa* , en medio de germinación (Knudson C Modificado, 1946).

E. EVALUACIÓN

Las evaluaciones microscópicas fueron efectuadas con un microscopio Olympus y las medidas de los explantes o plántulas con una regla plástica transparente milimetrada. Se utilizó una unidad experimental de 25 por tratamiento. El material vegetal fue seleccionado al azar y las muestras antes de su observación y evaluación fueron lavadas con agua destilada.

Para verificar el buen estado del embrión se tomó una muestra de las semillas, se colocaron en un portaobjetos, se observaron al microscopio a un aumento de 400X y se tomaron datos como tamaño de la semilla, forma y color de la misma. También se determinó su viabilidad en porcentaje mediante la prueba de tetrazolio (Moreno, 1996).

Se hicieron observaciones diarias a simple vista para determinar el tiempo de germinación en cada uno de los tratamientos.

A los 15 días después de la siembra (evaluación 1), se tomó uno de los seis frascos de germinación y se extrajeron los explantes, se observó al microscopio a un aumento de 400X, el color de los explantes y se midió el crecimiento de los mismos, longitud total (incluyendo la radícula) y grosor (cm) en cada uno de los tratamientos. Se tomaron

fotografías y se hicieron esquemas en los respectivos tratamientos.

La segunda evaluación se efectuó a los 30 días después de la siembra, se tomó uno de los cinco frascos restantes, se evaluó al microscopio a un aumento de 400X el color y la forma de los explantes y se midió su longitud y grosor en (cm). Se tomaron microfotografías y se realizaron esquemas representativos en cada tratamiento.

Los cuatro frascos restantes se utilizaron para realizar el primer transplante a seis frascos con medio de crecimiento y se colocaron en la cámara de crecimiento en las mismas condiciones ambientales requeridas en la germinación (Fig. 10).

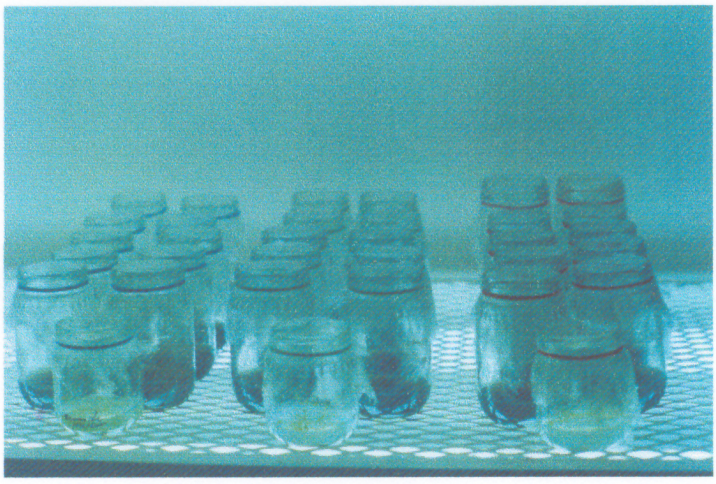

Fig. 10. Explantes de *B. nodosa* , en medio de crecimiento (Knudson C Modificado, 1946).

En la tercera evaluación, 60 días después de la siembra, se tomó uno de los seis frascos del primer trasplante, se evaluó al microscopio a un aumento de 40X, el color y la forma de las plántulas, el número de los primordios foliares, el número de las hojas y se midió el tamaño promedio de las plántulas en (cm), el tamaño promedio de los primordios foliares y de las hojas en (cm). Se realizaron esquemas representativos en cada tratamiento.

A los tres meses después de la siembra se realizó una cuarta evaluación. Se tomó uno de los cinco frascos restantes, se evaluó microscopicamente a 40X, el color y la forma de las plántulas, el número de primordios foliares, el número de hojas y se midió el tamaño promedio de las plántulas en (cm), el tamaño promedio de los primordios foliares y de las hojas en (cm). Se realizaron esquemas representativos en cada tratamiento.

Los cuatro frascos restantes de esta observación se utilizaron para realizar un segundo transplante a seis frascos con medios de crecimiento y se colocaron en la cámara de crecimiento.

Se realizó una quinta evaluación a los cuatro meses después de la siembra. Se tomó uno de los seis frascos del segundo trasplante, se evaluó macroscópicamente, el color y la forma de las plántulas, el número de primordios foliares, el número de hojas, se midió el tamaño promedio de las plántulas en (cm), el tamaño promedio de los primordios foliares, de las hojas en (cm) y la longitud del sistema radical (cm). Se realizaron esquemas

representativos en cada tratamiento.

La sexta y última evaluación se efectuó a los cinco meses después de la siembra. Se tomó uno de los cinco frascos restantes, se evaluó macroscópicamente, el color, la forma de las plántulas, el número de primordios foliares, el número de hojas, se midió el tamaño promedio de las plántulas en (cm), el tamaño promedio de los primordios foliares y de las hojas en (cm) y la longitud del sistema radical (cm). Se realizaron esquemas representativos en cada tratamiento.

F. PROCESAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas estadísticas de análisis de varianza utilizando los promedios por tratamiento en cada evaluación y luego se compararon los tratamientos y sus diferentes evaluaciones en pruebas utilizando el programa SYSTAT 10, en donde se determinó por evaluación cuales eran los tratamientos que presentaban mayor desarrollo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan a continuación corresponden al desarrollo in vitro, de *Brassavola nodosa* (L.) Lindl., desde la etapa de germinación hasta los 150 días de edad, seguidamente se analizan y discuten.

A. FISIOLOGÍA DE LA GERMINACIÓN

1. Viabilidad y Germinación

La semilla era de forma elipsoide y de color chocolate claro a crema, con una longitud promedio de 0,07cm y un grosor de 0,01cm. El embrión era de forma ovalada a rectangular ocupaba aproximadamente el 50% de la semilla, tenía 0,03cm de longitud y 0,01cm de grosor y era de color más claro que la semilla (Fig. 11).

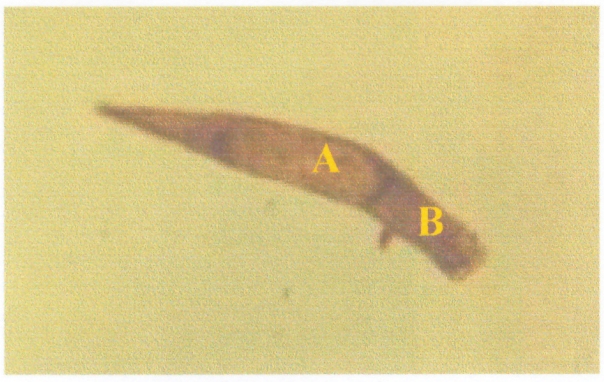

Fig. 11. Semilla de *B. nodosa*, 400X. A. Embrión sin germinar, B. Cubierta seminal

La viabilidad de la semilla en el momento de la siembra fue de 34,6%. Al microscopio las semillas viables presentaron el embrión de color rosado y las no viables de un color chocolate.

Observaciones a simple vista mostraron que la germinación de *B. nodosa* ocurrió a los 9 días después de la siembra en todos los tratamientos. Los embriones, en los primeros dos días, presentaron un color crema; tres días después, un color amarillo y finalmente un color verde claro, indicativo de semillas germinadas.

B. FISIOLOGÍA DEL DESARROLLO De *B. nodosa*

Los resultados del crecimiento y desarrollo del embrión, desde la siembra hasta los 150 días de edad, se describen, enfatizando primero las características morfológicas en cada una de las etapas y en todos los tratamientos, seguidas de los valores encontrados en cada evaluación y los cuales son discutidos seguidamente. En las edades de 15 y 30 días después de la siembra, los explantes se encontraban en medio de germinación (Knudson C Modificado, 1946), sin carbón activado y sin banano (Fig. 12) ; las edades de 60 días hasta los 150 días en medio de crecimiento (Knudson C Modificado, 1946) con carbón activado y con banano (Fig. 13).

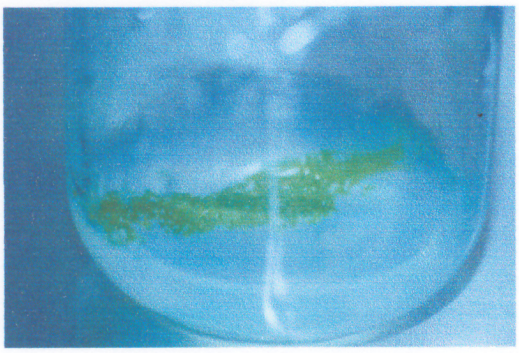

Fig. 12. Medio de germinación, Knudson C Modificado (1946).

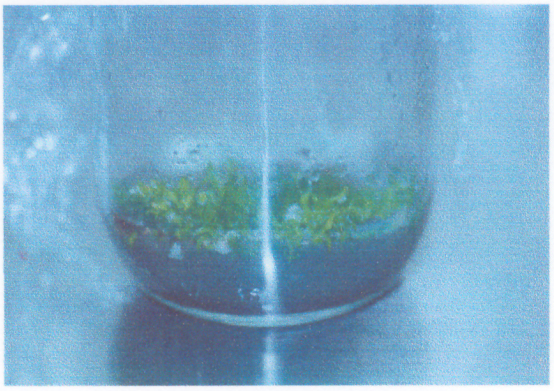

Fig. 13. Medio de crecimiento, Knudson C Modificado (1946).

1. 15 días después de la siembra

En esta etapa, los embriones germinados presentaban una coloración verde claro y estaban rodeados de restos de la cubierta seminal; además, se observó una linea de células en el extremo, la radícula, indicativo de la geminación en términos botánicos. En algunas semillas, el hinchamiento del embrión ocasionó la ruptura de la cubierta seminal (Fig. 14 y 15).

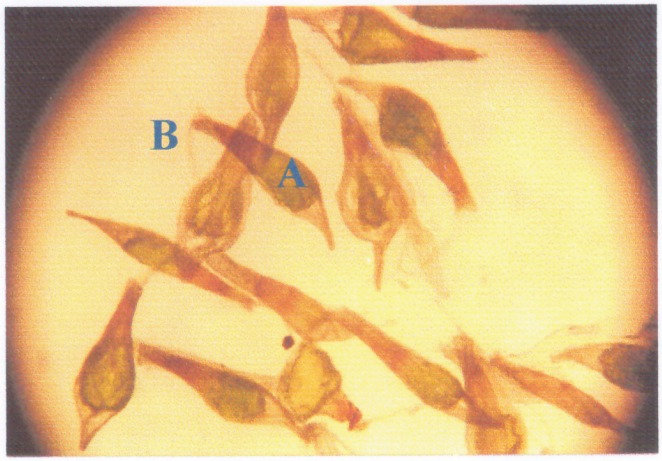

Fig. 14. Explantes de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), 15 d.d.s. 400X.
A. Embrión germinado, B. Radícula

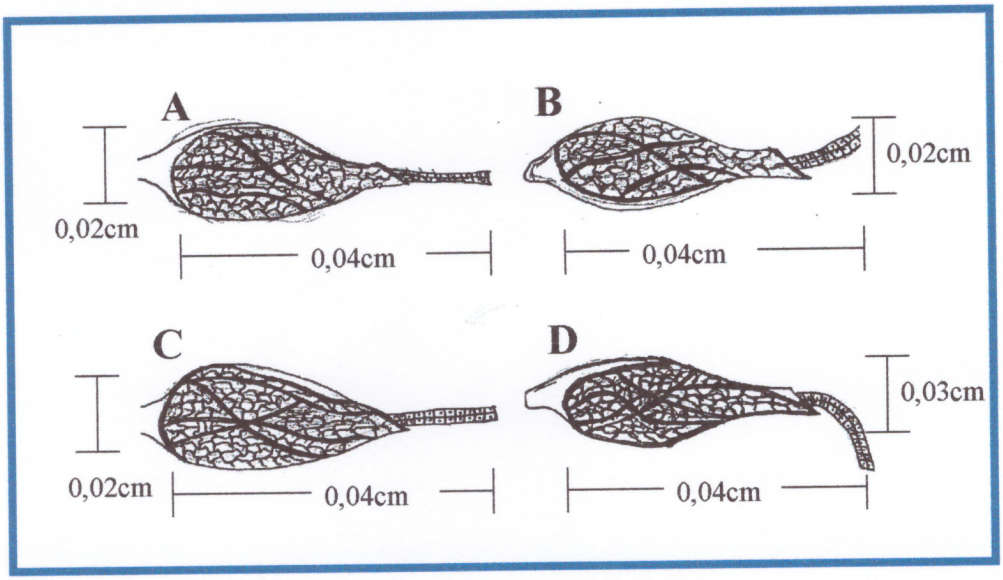

Fig 15. Explantes de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 15 d.d.s. A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.

A los 15 días después de la siembra no hay diferencia en cuanto al crecimiento en longitud de los explantes en los diferentes sustratos y fue de 0,04cm en todos los tratamientos. En grosor, los embriones presentaron un mayor crecimiento en el sustrato con 13g de agar (0,03cm) y en los demás tratamientos fue de 0,02cm (Cuadro1 y Fig.16).

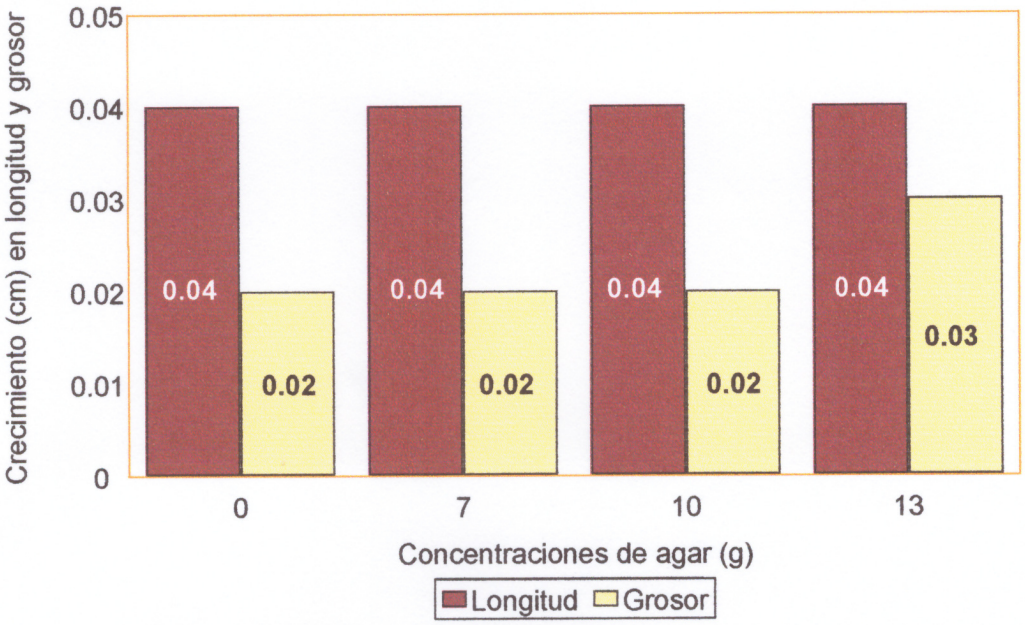

Fig. 16. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de explantes de *B. nodosa* in vitro en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 15 d.d.s.

* d.d.s. (Días después de la siembra)

2. 30 días después de la siembra

Los protocormos eran de color verde, en su mayoría presentaban una forma globosa y un crecimiento apical. En esta etapa aun había restos de la cubierta seminal (Fig. 17 y 18). Esta etapa de desarrollo recibe el nombre de protocormo.

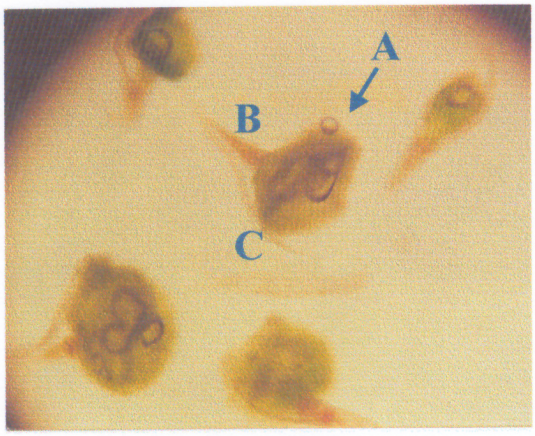

Fig.17. Protocormos de *B. nodosa*, en medio Knudson C Modificado (1946), 30 d.d.s. A. Embrión germinado, B.Crecimiento apical C. Restos de la cubierta seminal.

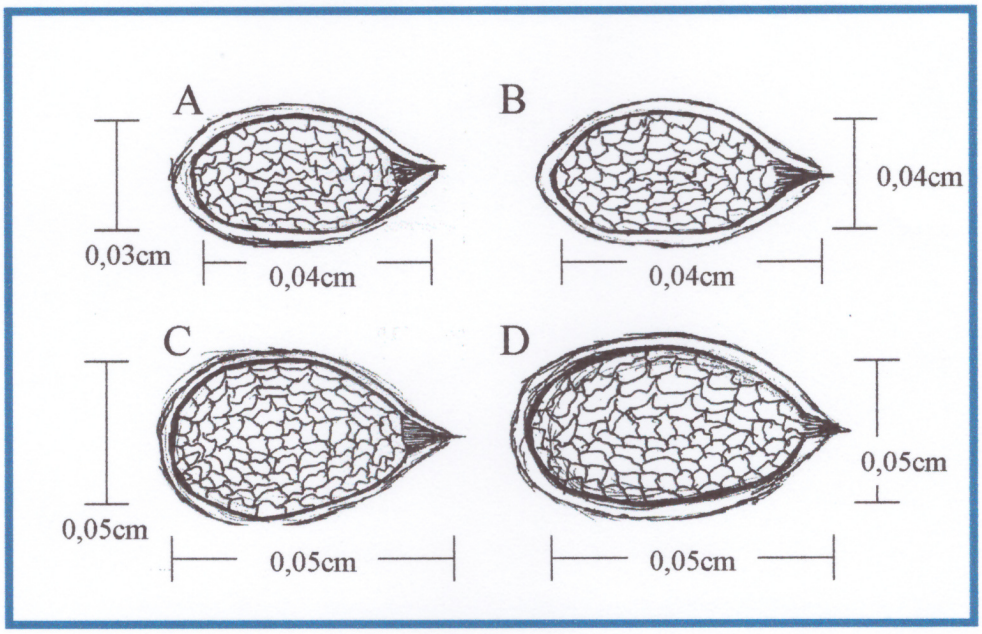

Fig.18. Explantes de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 30 d.d.s. A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13g de agar.

En esta etapa el crecimiento en longitud y grosor de los protocormos en los sustratos con 13g y 10g de agar presentaron mayor longitud (0,05cm) y grosor (0,05cm), seguido de los protocormos en el sustrato con 7g de agar con una longitud y grosor de 0,04cm, respectivamente. En el tratamiento con 0g de agar, la longitud de los protocormos fue de 0,04cm y grosor de 0,03cm, este último tratamiento presentó el menor grosor (Cuadro 2 y Fig. 19). A los 30 días después de la siembra el crecimiento de los protocormos no muestra un claro efecto de los tratamientos ni en longitud ni en grosor.

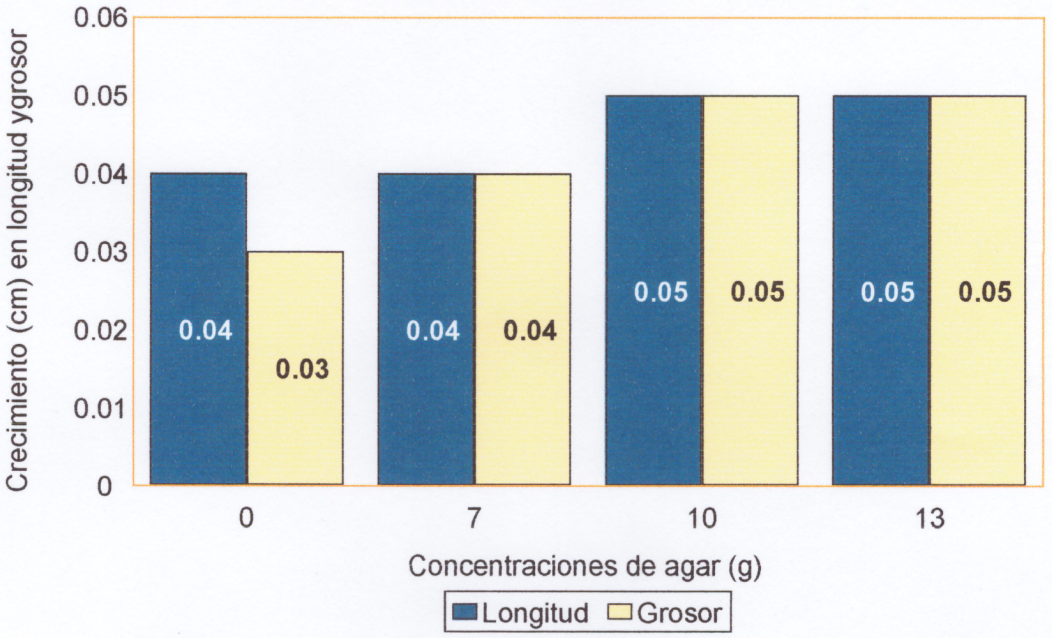

Fig.19. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de protocormos de *B. nodosa* in vitro en medio Knudson C modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes de agar, 30 d.d.s.

* d.d.s. (Días después de la siembra)

3. 60 días después de la siembra

El tratamiento con 0g de agar presentaban una forma globosa con un crecimiento apical, con 0,1cm de longitud y 0,08cm de grosor y continúa en la etapa de protocormo.

Las plántulas en los tratamientos en medio sólido, mostraron una coloración verde intenso y se apreciaron raíces adventicias en número de 14 (7g); 13(10g) y 14 (13g) (Cuadro 5). Además se observan primordios foliares; éstos tenían una forma lanceolada con bordes enteros y levemente doblados hacia adentro; presentaban un primordio foliar y una hoja por plántula, tenían una longitud de 0,1cm (7g), 0,2cm (10g) y 0,16 cm (13 g), (Cuadro 4 y Fig. 20).

A los 60 días después de la siembra el crecimiento de la parte aérea en longitud fue mayor en el tratamiento con 10g de agar (0,28cm), seguido por el de 13g de agar (0,27cm) y 7g de agar (0,2cm) y el menor crecimiento en el tratamiento sin agar con 0,1cm; en esta edad se observa el pseudobulbo en todos los tratamientos y en cuanto al grosor se encontraron valores de 0,15cm (13 g de agar), 0,1cm (10g de agar), 0,1cm (7g de agar) y en 0g de agar no se observaron cambios evidentes y continuó presentando la morfología propia de un protocormo con grosor de 0,08cm. Las plántulas tienen un mejor crecimiento en los tratamientos con 10g y 13g de agar y en grosor en el tratamiento con 13g de agar, así como

un mejor desarrollo del pseudobulbo, órgano muy importante para el almacenamiento de reservas nutritivas y agua en este género de orquídeas y por el hábitat propio de esta especie (Fig. 20 y 21).

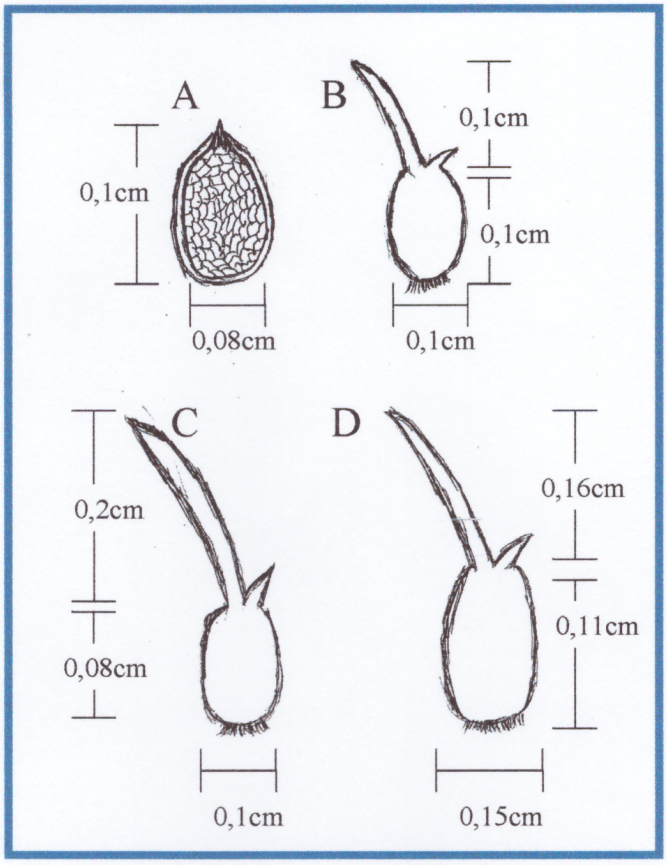

Fig. 20. Plántulas de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 60 d.d.s. A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13g de agar.

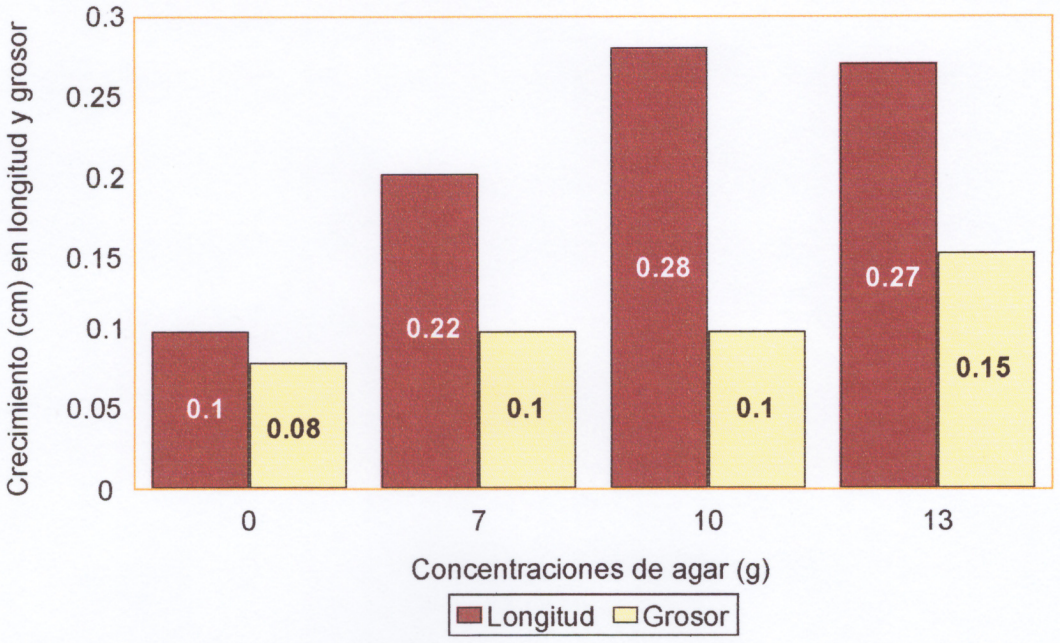

Fig. 21. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de protocormo y plántulas de *B. nodosa* in vitro en medio Knudson C modificado(1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 60 d.d.s.

* d.d.s. (Días después de la siembra)

4. 90 días después de la siembra

El tratamiento con 0g de agar, presentaba una forma globosa, con crecimiento apical; su morfogénesis se ha detenido. Quizás el medio líquido (sin agar) en que se encontraban ha afectado su desarollo ya que no ocurrió en los demás tratamientos.

Las plántulas en los tratamientos en medio sólido, a los 90 días eran de una coloración verde intenso, cada plántula presentaba tres hojas de forma lanceolada, con bordes enteros y levemente doblados hacia adentro. La longitud de la hoja más desarrollada es el valor que se presenta como crecimiento de la parte aérea en el Cuadro 6; exceptuando el sustrato con 0 g de agar que continúa en la etapa de protocormo (Fig. 22).

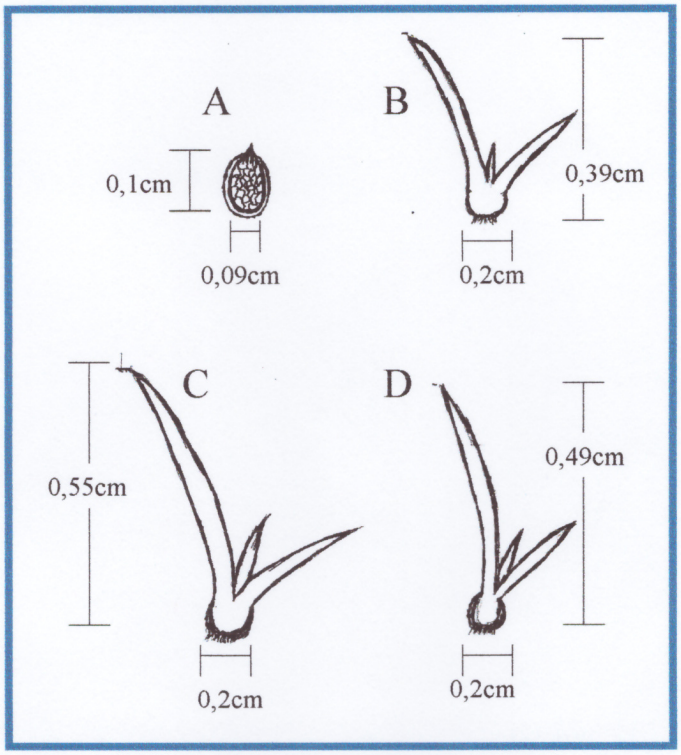

Fig. 22. Plántulas de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 90 d.d.s. A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.

A los 90 días después de la siembra el tratamiento de mayor crecimiento en longitud fue el de 10g de agar (0,55cm); seguido por el tratamiento con 13g de agar (0,49cm), luego el tratamiento con 7 g de agar (0,39cm); estos tres tratamientos presentaban igual grosor (0,2cm), y el tratamiento con menor crecimiento fue el de 0g de agar con 0,1cm y 0,09cm enlongitud y grosor respectivamente y continuaba en la etapa de protocormo (Cuadro 6 y Fig. 23). En esta edad el mejor resultado para el crecimiento de *B. nodosa* es el tratamiento de 10g de agar. El pseudobulbo detuvo su crecimiento en grosor en los tratamientos con agar, este órgano en esta especie es muy pequeño.

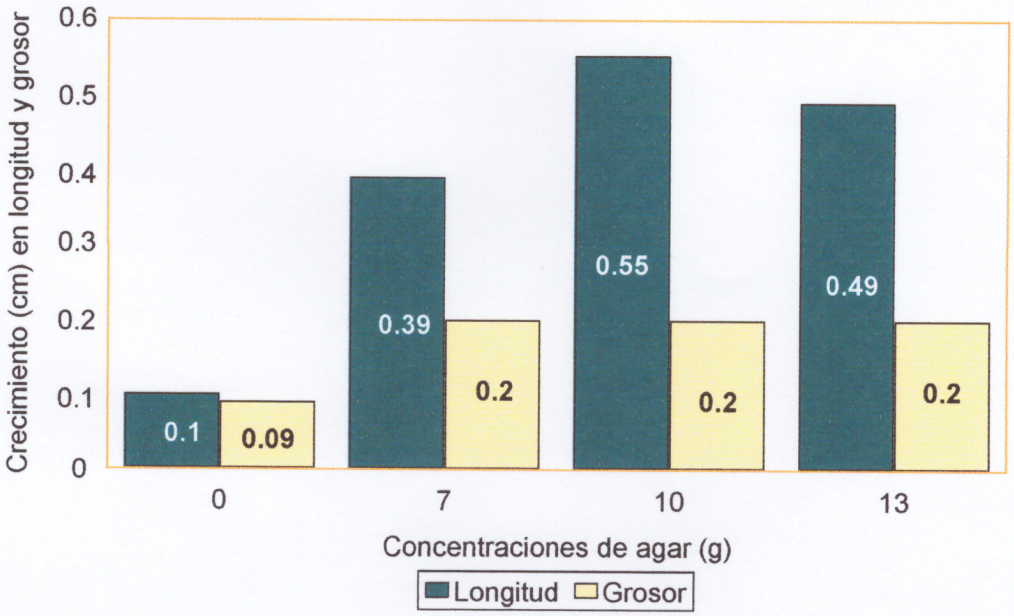

Fig. 23. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de protocormo y plántulas de *B. nodosa* in vitro en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes de agar, 90 d.d.s.

* d.d.s. (Días después de la siembra)

5. 120 días después de la siembra

Las plántulas en los tratamientos con diferentes concentraciones de agar, a los 120 días eran de color verde; se observaban tres hojas en cada plántula. La hojas eran de forma lanceolada, con bordes enteros y levemente doblados hacia adentro (Fig. 24). La longitud de la hoja más desarrollada es el valor que se presenta como crecimiento de la parte aérea en el Cuadro 7. En el tratamiento con 0g de agar el protocormo ha desarrollado primordios foliares y radicales. En el sistema radical de la mayoría de las plántulas se encontró un primordio radical, aunque en algunos casos se pudieron observar dos primordios; la longitud promedio de los mismos fue de 0,05cm exceptuando el sustrato con 0 g de agar, que presentó una longitud promedio de 0,01cm (Cuadro 8).

A los 120 días después de la siembra el crecimiento en longitud del vástago fue de 0,75cm (10g), 0,65cm (13g), 0,6cm (7g) y 0,1cm (0g). En cuanto al grosor del pseudobulbo se encontraron valores de 0,22cm (7g), 0,21cm (10g), 0,21cm (13g) y 0,9cm (0g) (Cuadro 7 y Fig. 25). El tratamiento que mostraba plántulas con mayor desarrollo es el de 10g de agar, porque presenta la mayor longitud, seguido por el tratamiento con 13g de agar y luego el tratamiento con 7g de agar; en grosor no hay diferencia en cuanto al crecimiento entre los tratamientos. En 0g de agar el protocormo se habra diferenciado en una plántula, sin embargo, su crecimiento es en menor escala y de poco valor económico.

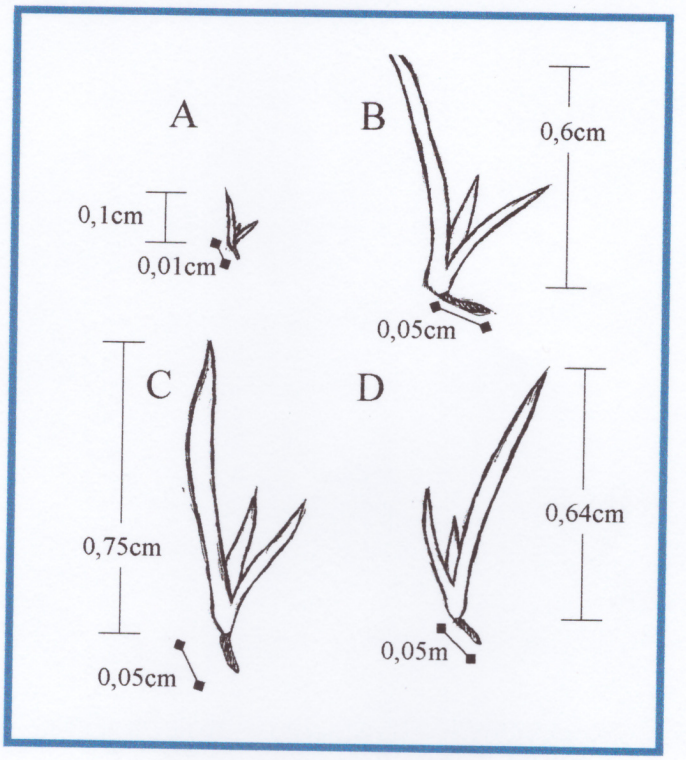

Fig. 24. Plántulas de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 120 d.d.s. A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.

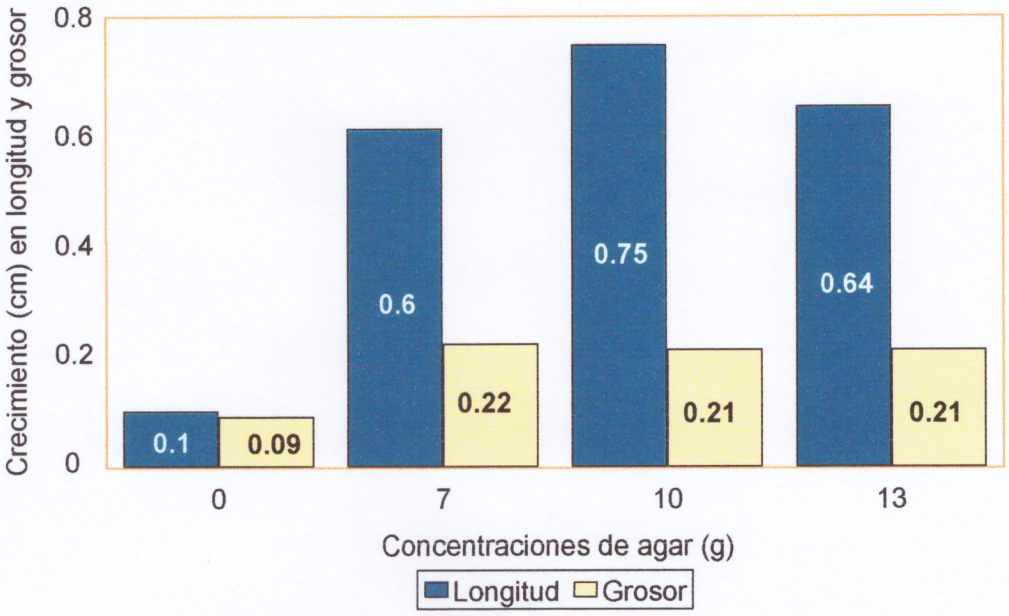

Fig. 25. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de plántulas de *B. nodosa* in vitro en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 120 d.d.s.

* d.d.s. (Días después de la siembra)

6. 150 días después de la siembra

Las plántulas en los diferentes tratamientos eran de color verde; se observaron 2-3 hojas por plántula, pero la mayoría presentó tres de ellas. Estas tenían una forma lanceolada, con bordes enteros y levemente doblados hacia adentro; se observó mucha variabilidad genética de *B. nodosa* en cuanto a su morfología, número y longitud de hojas y raíces, en

todos los tratamientos (Fig. 26). La longitud de la hoja más desarrollada, era el valor que se presenta como crecimiento de la parte aérea (Cuadro 9 y Fig. 27). En cuanto al sistema radical, se encontraron primordios radicales y raíces con longitudes promedio de 1,12cm (10g), 1,08cm (7g), 0,78cm (13 g) y 0,23cm(0g) (Cuadro 10 y Fig. 26). El número de raíces fue de 1-3 en los sutratos con agar y de 1-2 en 0g de agar.

A los 150 días después de la siembra el crecimiento en longitud del vástago fue de 0,98cm (10g), 0,93cm (7g), 0,74cm (13g) y 0,24cm (0g) y en cuanto al grosor del pseudobulbo se encontraron valores de 0,35cm (10g), 0,33cm (7g), 2,9cm (13g) y 0,12cm (0g) (Cuadro 9 y Fig. 27). En el tratamiento con 10g de agar se observó el mayor desarrollado de las plántulas, ya que presentaban un mayor crecimiento en longitud tanto del vástago como del sistema radical, crecimiento muy parecido a las plántulas en el sustrato con 7g de agar; estos están seguidos en crecimiento por el sustrato de 13g de agar. El menor desarrollo fue en el tratamiento con 0g de agar.

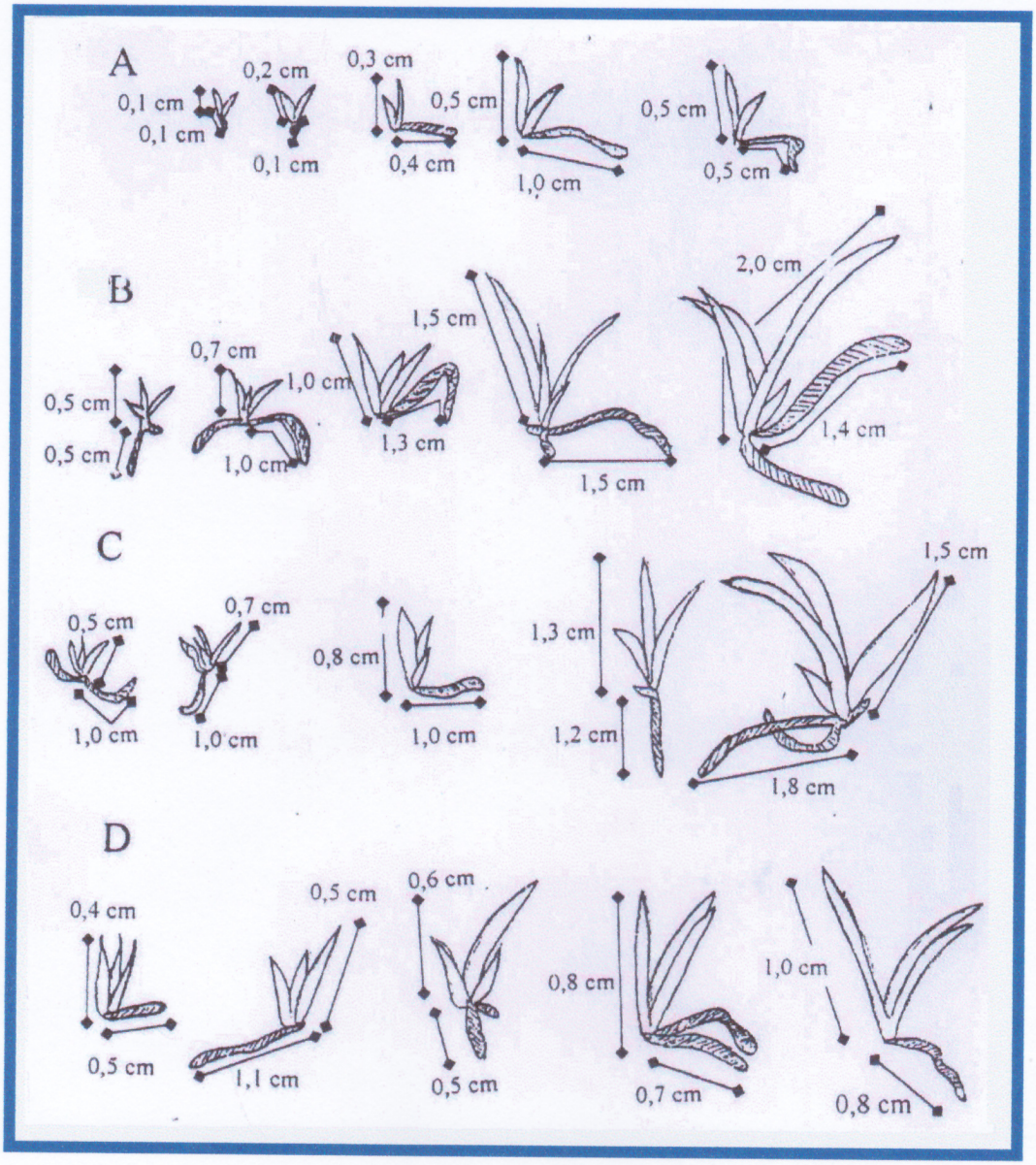

Fig. 26. Plántulas de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, 150 d.d.s. A.0g de agar, B. 7g de agar, C. 10g de agar y D. 13 g de agar.

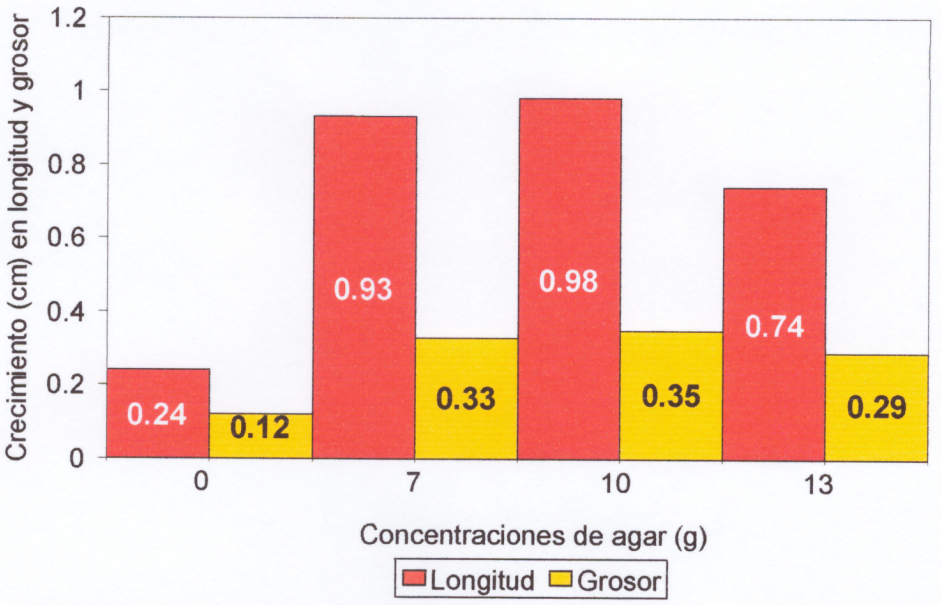

Fig. 27. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de plántulas de *B. nodosa* in vitro en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes de agar, 150 d.d.s.

* d.d.s. (Días después de la siembra)

7. Crecimiento y Desarrollo de *B. nodosa* desde su germinación hasta los 150 días después de la siembra.

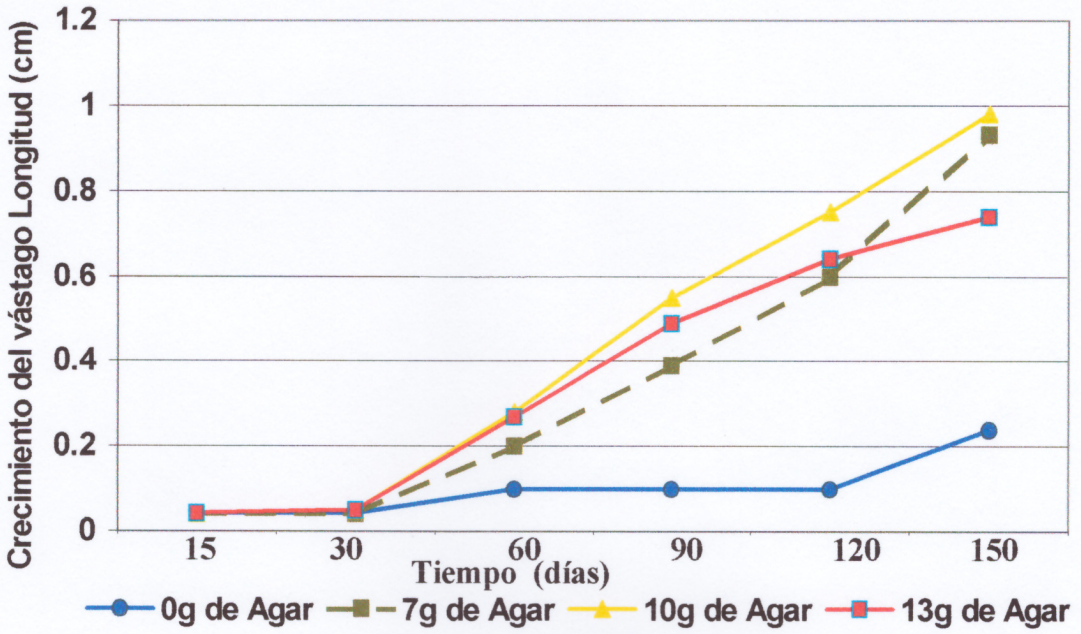

Fig. 28. Crecimiento en longitud de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, desde la germinación hasta los 150 días después de la siembra.

En esta gráfica se puede apreciar el crecimiento en longitud de *B. nodosa* durante los 150 días de su cultivo in vitro; en este género el crecimiento en longitud presenta una curva sigmoidea. El crecimiento inicial, 15 a 30 días después de la siembra, el medio de grminación sólido o líquido, no parece influir en dicho crecimiento pero después de este período el medio líquido no es favorable para el crecimiento. Durante el desarrollo in vitro, se observaron los siguientes eventos ontogenéticos: a los 15 días, en todos los tratamientos

ocurrió la germinación; a los 30 días, en todos los tratamientos, se desarrolló el protocormo; a los 60 días en los sustratos con agar las plántulas presentaron 2 hojas así como la presencia de pelos radícales, en el medio líquido se observaron únicamente protocormo; a los 90 días las plántulas, en los tratamientos con agar presentaron 3 hojas así como en el sustrato sin agar pero estas últimas presentaron un crecimiento muy reducido; a la edad de 120 y 150 días las plántulas continuaron con 3 hojas y la longitud promedio final fue de 0,24cm (0g), 0,93cm (7g), 0,98cm (10g) y 0,74cm (13g), presentaron primordios radicales, con longitudes promedio de 0,02cm (0g), 0,1cm (7g), 0,11cm (10g) y 0,08cm (13g). Estadísticamente, no hay diferencia significativa entre los tratamientos de 7, 10 y 13 g, que presentaron un crecimiento muy parecido, estadisticamente el de menor desarrollo fue el de 0g de agar.

En la Figura 29, se presenta el crecimiento en grosor del pseudobulbo con una curva sigmoidea, característica de la cinética de crecimiento. Las pruebas estadísticas muestran que los tratamientos de 7, 10 y 13 g de agar tuvieron un crecimiento parecido con leves diferencias pero no significativas estadísticamente hablando. Sin embargo, el mejor tratamiento pareciera ser el de 10 g de agar porque presentaba a lo largo del desarrollo valores mayores en cuanto a grosor del protocormo y longitud del vástago. No obstante, no hay diferencia significativa con los tratamientos de 7g y 13g de agar. Los análisis de varianza, indican que se dió un crecimiento en longitud sin diferencias significativas hasta los 60 días después de la siembra en todos los tratamientos (0g, 0.08cm; 7g, 0.1cm; 10g, 0.1cm; 13g, 0.15cm); a partir de esta edad hasta los 150 días, el tratamiento sin agar

presentó el menor crecimiento en grosor(0g, 0.12cm; 7g, 0.33cm; 10g, 0.35cm; 13g, 0.29cm). Estadísticamente no hay diferencias significativas entre los tratamientos con sustrato sólidos durante el crecimiento, pero el tratamiento líquido fue el de menor desarrollo. El crecimiento en longitud y en grosor de *B. nodosa* durante los 150 días que duró el estudio in vitro fue muy similar en los sustratos con agar y muy escaso en el medio líquido. Pareciera que las concentraciones de agar entre 7 y 13 gramos, son favorables para el cremiento in vitro de este género, aunque la literatura sugiere como concentración de agar entre 12 y 15 gramos para este medio Knudson C Modificado (1946).

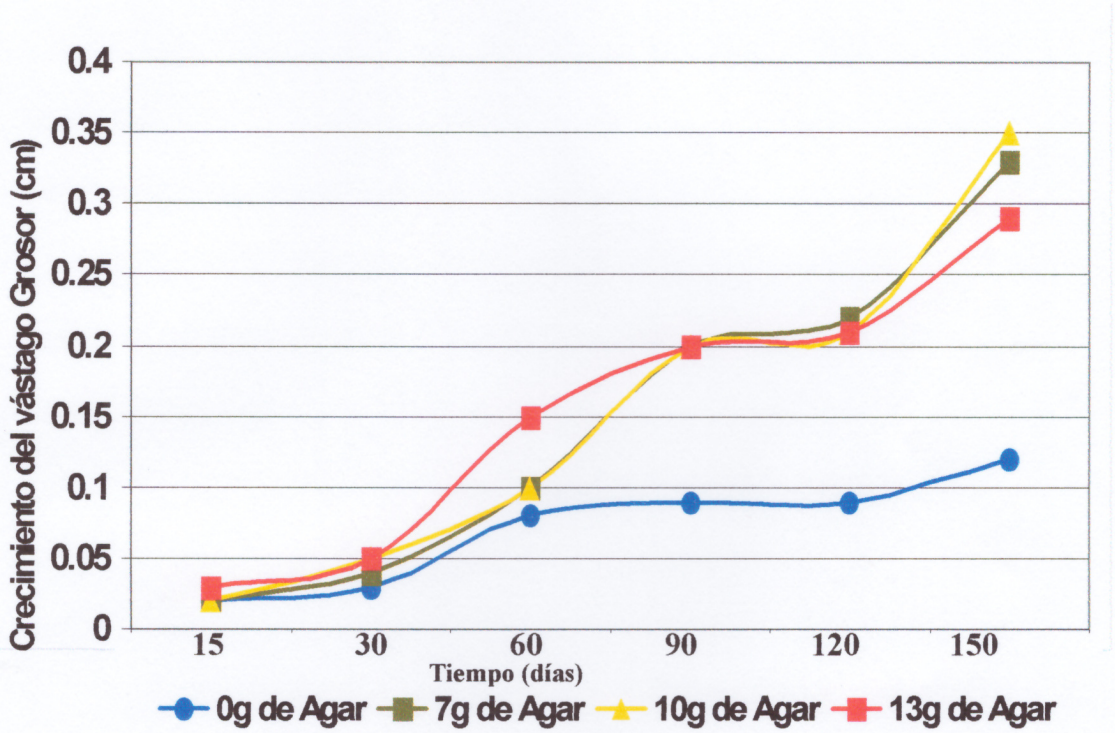

Fig. 29. Crecimiento en grosor del pseudobulbo de *B. nodosa* en medio Knudson C Modificado (1946), líquido (sin agar) y sólido (con agar) en tres concentraciones diferentes, desde la germinación hasta los 150 días después de la siembra.

V. CONCLUSIONES

- La germinación in vitro de *Brassavola nodosa*; se da a los 15 días después de la siembra. La formación de primordios foliares a los 120 días después de la siembra, los primordios radicales a los 120 días después de la siembra y a los 150 días, ya se observa la planta con 3 hojas y primordios radicales.

- La planta de *B. nodosa* a los 150 días después de la siembra alcanza una longitud promedio de 0,98cm y grosor del pseudobulbo de 0,35cm, con un sistema radical de 1,0cm.

- *B. nodosa* tiene un buen desarrollo en un médio sólido con concentraciones entre 7 y 13gramos de agar.

- El medio líquido de crecimiento no es favorable para el desarrollo de *B. nodosa*.

- Estadísticamente se encontró que el desarrollo de las plantas de *B. nodosa* en medio sólido es bastante homogéneo.

VI. RECOMENDACIONES

- En futuras investigaciones evaluar otros componentes del medio con fin de abaratar los costos.

- Emplear mayor cantidad de semillas al momento de la desinfección de las mismas, debido a que se pierden muchas semillas viables en los lavados.

- Realizar observaciones diarias al microscopio durante los primeros 15 días para estudiar mejor el proceso de germinación.

- Estudiar el desarrollo in vitro mediante observaciones cada 15 días y realizar subcultivos cada 30 días para permitir a las plántulas tener mayor cantidad de nutrientes; además disminuir elnúmero de plantas por frasco, para permitir mayor espacio para su mejor desarrollo.

- Mantener las plántulas mayor tiempo en condiciones in vitro , 8 meses antes de su establecimiento ex vitro con el fin de que le sea más fácil su aclimatación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arditti, J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture. a Manual. En L. Arditti (Ed.) Ordhid Biology: Reviews and Perspectives II. Págs 243-370. Cornell Univesity Press. Londres, Inglaterra.

Bartina, M. Orquídeas, Propagación in vitro (en línea). Consultado 13 de marzo 2002. Disponible en http://66.163.243.91/espana/tarragona/Orquideas/invitro.htm

Bhojwani, S.; Razdan, M. 1983. Plant Tissue culture. Elseiver Science Publishing Company Inc. New York, E.U.A.

Devlin, R. 1980. Fisiología Vegetal. Tercera edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. 493p.

Fernandes, G y Johnston, M. 1986. Fisiología Vegetal Experimental. Servicio Editorial IICA. Costa Rica. 411p.

George, E. y Sherrington, P. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Editorial Eastern Press. Inglaterra. 767 p.

Gold, M. 1997. Procesos Energéticos de la Vida. Segunda edición .Editorial Trillas. México. 74p.

Hartmann, H ;Kester, D y Davies, F. 1990. Propagación de Plantas. Principios y prácticas. Quinta edición. Editorial Prentice Hall. Mexico. 592p.

Hurtado, D. y Merino ,M. 1997. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México. 232p.

Jones, S. 1987. Sistemática Vegetal. Editorial McGraw-Hill. México, D.F.

Kyte, L. 1987. Plants From Test Tubes. Editorial Timber Press. Estados Unidos. 160p.

Light, M. 1995. Growing Orchids in the Caribbean. Editorial MacMillan Education LTD. Londres, Inglaterra.

Lira, R. 1994. Fisiología Vegetal. Primera edición. Editorial Trillas. México. 237p.

Meléndez, J. Reproducción de Orquídeas (en línea). México. Consultado 22 de marzo de 2002. Disponible en http://www.amo.com.mx/invitro.doc

Miller, E. 1967. Fisiología Vegetal. Primera edición. Editorial Ispanoamericana. 362p.

Moreno, E. 1996. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. México. 393 p.

Mudge, K.W y C.C. Chu. 1992. Novel Laboratory Exercises in Plant Tissue Culture; in vitro Asymbiotic Germination of Orchids Seeds. Hort Technology.

Pupulin, F.1998. Orchids. Editorial Mesoamerican Press. San José, Costa Rica.

Quiñones, M.; Blga, S. y Manrique T. Las Orquídeas y las Modernas Tecnologías de Propagación y Conservación (en línea). Perú. Consultado 16 de abril 2002. Disponible en http://www.concytec.gob.pe/investigacion/biotecnologia/orqui.htm

Rojas, M. 1980. Fisiología Vegetal Aplicada. Editorial McGraw-Hill. Mexico. 364p.

Rivera , G. 1998. Orquídeas, Generalidades y Cultivo. Editorial Fundación UNA. Costa Rica.

Salisbury, B y Ross, C. 1994. Fisiología Vegetal. Editorial.Iberoamericana. México.759p.

Sevillano, J. Orquídeas su cultivo in vitro en el ámbito domestico (en línea). Consultado 7 de abril 2002. Disponible en www.lanzarote.net/ogro/gocarticuloinvitrojmsv.htm

Spiegel, M. 1999. Estadística. Segunda edición.. Editorial McGraw-Hill. México. 556 p.

Shuttleworth, F.; Zim, H. y Dillon, G.1989. Orchids. Segunda edición. Editorial Golden Press. New York, Estados Unidos. 160 p.

Uno, G.; Storey, R. y Moore, R. 2001. Principles of Botany. Editorial McGraw-Hill. Boston, Estados Unidos. 552 p.

Vidoz, M. Comportamiento ex vitro de Plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidacea) y de tres híbridos intergénericos. Disponible en www1.unne.educ.ar/cyt/agraria/a-005.pdf

VIII. ANEXOS

Anexo 1.

Cuadros de datos

Cuadro 1. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de explantes de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 15 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Longitud	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*
1	0.04	0.02	0.04	0.02	0.05	0.02	0.03	0.03
2	0.03	0.01	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.03
3	0.04	0.01	0.03	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03
4	0.04	0.03	0.04	0.02	0.03	0.01	0.03	0.03
5	0.05	0.04	0.04	0.02	0.03	0.01	0.03	0.02
6	0.04	0.01	0.03	0.02	0.04	0.02	0.04	0.02
7	0.03	0.02	0.04	0.02	0.05	0.02	0.05	0.02
8	0.04	0.02	0.05	0.02	0.04	0.03	0.04	0.03
9	0.04	0.02	0.04	0.01	0.04	0.03	0.04	0.04
10	0.04	0.01	0.05	0.03	0.04	0.02	0.04	0.03
11	0.05	0.03	0.04	0.02	0.04	0.03	0.04	0.03
12	0.04	0.02	0.04	0.03	0.03	0.02	0.04	0.04
13	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.04
14	0.04	0.02	0.03	0.01	0.04	0.03	0.05	0.03
15	0.04	0.02	0.03	0.02	0.04	0.01	0.04	0.03
16	0.04	0.02	0.04	0.01	0.05	0.02	0.04	0.03
17	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.01	0.04	0.03
18	0.03	0.02	0.04	0.02	0.05	0.02	0.05	0.03
19	0.04	0.01	0.05	0.02	0.04	0.02	0.04	0.04
20	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03
21	0.04	0.02	0.05	0.03	0.03	0.02	0.04	0.02
22	0.05	0.02	0.04	0.03	0.04	0.02	0.05	0.03
23	0.04	0.03	0.05	0.02	0.05	0.02	0.05	0.03
24	0.04	0.02	0.03	0.01	0.04	0.01	0.05	0.03
25	0.04	0.02	0.04	0.01	0.04	0.02	0.03	0.03
$\bar{x}$	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.03

Cuadro 2. Crecimiento (cm) en longitud y grosor de protocormos de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 30 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Longitud	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*
1	0.03	0.03	0.05	0.07	0.05	0.05	0.06	0.05
2	0.03	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06	0.04
3	0.04	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03	0.05	0.05
4	0.05	0.03	0.04	0.02	0.05	0.04	0.05	0.05
5	0.04	0.04	0.04	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05
6	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04
7	0.03	0.03	0.05	0.03	0.06	0.04	0.06	0.05
8	0.03	0.03	0.05	0.05	0.06	0.03	0.05	0.05
9	0.04	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04	0.06	0.04
10	0.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.04	0.05	0.05
11	0.04	0.03	0.05	0.03	0.04	0.03	0.07	0.05
12	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.07	0.05	0.05
13	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.06	0.05	0.04
14	0.03	0.03	0.05	0.04	0.05	0.06	0.06	0.05
15	0.03	0.02	0.05	0.07	0.05	0.04	0.05	0.05
16	0.03	0.03	0.05	0.02	0.04	0.04	0.05	0.05
17	0.03	0.02	0.04	0.03	0.05	0.07	0.07	0.04
18	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.07
19	0.04	0.03	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06
20	0.04	0.04	0.04	0.03	0.06	0.04	0.05	0.07
21	0.03	0.03	0.05	0.03	0.05	0.06	0.05	0.05
22	0.04	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05
23	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.06
24	0.04	0.04	0.04	0.02	0.05	0.05	0.05	0.06
25	0.04	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05
$\bar{x}$	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05

Cuadro 3. Crecimiento (cm) en longitud y grosor del protocormo y del vástago de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 60 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Longitud	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*
1	0.1	0.08	0.20	0.1	0.28	0.11	0.27	0.15
2	0.1	0.08	0.18	0.09	0.28	0.1	0.2.6	0.14
3	0.09	0.07	0.18	0.1	0.27	0.11	0.27	0.15
4	0.08	0.08	0.19	09	0.27	0.1	0.27	0.15
5	0.11	0.08	0.19	0.11	0.28	0.1	0.28	0.15
6	0.12	0.07	0.19	0.1	0.28	0.1	0.26	0.14
7	0.1	0.08	0.21	0.1	0.28	0.12	0.28	0.15
8	0.09	0.09	0.21	0.1	0.29	0.09	0.28	0.16
9	0.09	0.08	0.21	0.1	0.28	0.09	0.27	0.15
10	0.08	0.09	0.21	0.1	0.28	0.09	0.27	0.15
11	0.11	0.08	0.2	0.1	0.29	0.09	0.26	0.16
12	0.11	0.08	0.2	0.1	0.28	0.09	0.27	0.15
13	0.11	0.08	0.2	0.1	0.28	0.1	0.27	0.14
14	0.1	0.07	0.2	0.1	0.28	0.1	0.27	0.15
15	0.1	0.07	0.2	0.11	0.27	0.1	0.27	0.14
16	0.1	0.08	0.21	0.1	0.28	0.09	0.26	0.15
17	0.1	0.08	0.2	0.1	0.28	0.09	0.27	0.15
18	0.09	0.08	0.2	0.09	0.28	0.09	0.27	0.15
19	0.12	0.09	0.2	0.1	0.28	0.11	0.27	0.15
20	0.09	0.08	0.2	0.1	0.28	0.12	0.28	0.16
21	0.1	0.09	0.2	0.1	0.28	0.1	0.27	0.15
22	0.08	0.08	0.2	0.11	0.28	0.1	0.27	0.15
23	0.11	0.09	0.21	0.1	0.28	0.1	0.27	0.15
24	0.11	0.07	0.2	0.1	0.29	0.09	0.27	0.15
25	0.1	0.08	0.2	0.1	0.28	0.11	0.27	0.15
$\bar{x}$	0.1	00.8	0.20	0.1	0.28	0.1	0.27	0.15

Cuadro 4. Longitud de hojas (cm) de protocormo y plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 60 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar	7g de Agar	10g de Agar	13g de Agar
	Longitud	*Longitud*	*Longitud*	*Longitud*
1	-	0.11	0.20	0.18
2	-	0.1	0.18	0.15
3	-	0.1	0.18	0.16
4	-	0.1	0.19	0.2
5	-	0.1	0.19	0.15
6	-	0.1	0.19	0.17
7	-	0.12	0.21	0.14
8	-	0.09	0.21	0.16
9	-	0.09	0.21	0.15
10	-	0.09	0.21	0.18
11	-	0.09	0.2	0.17
12	-	0.09	0.2	0.17
13	-	0.1	0.2	0.16
14	-	0.1	0.2	0.15
15	-	0.1	0.2	0.14
16	-	0.09	0.21	0.2
17	-	0.09	0.2	0.2
18	-	0.09	0.2	0.16
19	-	0.11	0.2	0.17
20	-	0.12	0.2	0.17
21	-	0.1	0.2	0.18
22	-	0.1	0.2	0.19
23	-	0.1	0.21	0.18
24	-	0.09	0.2	0.15
25	-	0.11	0.2	0.2
$\bar{x}$	-	0.1	0.2	0.16

Cuadro 5. Raíces adventicias en protocormo y plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 60 días después de la siembra. (n=25).

Planta	0g de Agar	7 g de Agar	10 g de Agar	13 g de Agar
	Cantidad	*Cantidad*	*Cantidad*	*Cantidad*
1	-	15	18	14
2	-	15	17	13
3	-	15	17	16
4	-	13	17	14
5	-	14	16	12
6	-	12	19	14
7	-	11	17	14
8	-	15	17	16
9	-	14	16	14
10	-	14	17	15
11	-	15	16	14
12	-	14	17	12
13	-	14	18	14
14	-	15	16	14
15	-	13	17	15
16	-	14	18	15
17	-	14	15	14
18	-	14	16	13
19	-	15	19	14
20	-	14	17	16
21	-	14	15	13
22	-	14	17	14
23	-	14	19	13
24	-	14	17	14
25	-	14	17	12
$\bar{x}$	-	14	17	14

Cuadro 6. Crecimiento (cm) en longitud del vástago y grosor del pseudobulbo de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 90 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Longitud	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*
1	0.1	0.1	0.4	0.22	0.53	0.2	0.43	0.2
2	0.1	0.1	0.14	0.2	0.64	0.2	0.42	0.19
3	0.09	0.1	0.37	0.19	0.73	0.21	0.45	0.18
4	0.08	0.08	0.4	0.24	0.61	0.2	0.42	0.21
5	0.12	0.1	0.55	0.21	0.58	0.2	0.53	0.2
6	0.11	0.08	0.57	0.2	0.43	0.2	0.48	0.21
7	0.09	0.07	0.36	0.2	0.47	0.2	0.43	0.21
8	0.1	0.09	0.22	0.21	0.51	0.21	0.62	0.21
9	0.08	0.1	0.31	0.22	0.55	0.2	0.45	0.2
10	0.09	0.07	0.4	0.19	0.60	0.2	0.6	0.2
11	0.11	0.08	0.39	0.2	0.71	0.2	0.51	0.19
12	0.1	0.08	0.38	0.19	0.65	0.21	0.51	0.18
13	0.11	0.1	0.51	0.23	0.58	0.21	0.41	0.18
14	0.1	0.09	0.19	0.18	0.40	0.19	0.43	0.21
15	0.11	0.1	0.20	0.19	0.52	0.21	0.4	0.22
16	0.1	0.1	0.53	0.21	0.48	0.19	0.57	0.23
17	0.09	0.08	0.32	0.2	0.32	0.18	0.61	0.21
18	0.09	0.07	0.41	0.18	0.52	0.19	0.4	0.22
19	0.12	0.09	0.50	0.18	0.37	0.18	0.62	0.2
20	0.1	0.09	0.33	0.19	0.61	0.21	0.43	0.21
21	0.08	0.06	0.41	0.2	0.57	0.22	0.5	0.19
22	0.11	0.09	0.39	0.21	0.60	0.2	0.51	0.19
23	0.11	0.08	0.42	0.2	0.67	0.19	0.5	0.21
24	0.1	0.1	0.38	0.22	0.59	0.2	0.43	0.22
25	0.1	0.1	0.57	0.23	0.58	0.21	0.58	0.21
$\bar{x}$	0.1	0.09	0.39	0.2	0.55	0.2	0.49	0.2

Cuadro 7. Crecimiento (cm) en longitud del vástago y grosor del pseudobulbo de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 120 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Longitud	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*
1	0.1	0.1	0.6	0.2	1.0	0.2	0.4	0.2
2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.6	0.2	0.95	0.2
3	0.08	0.07	0.4	0.2	0.9	0.2	0.6	0.2
4	0.08	0.06	0.70	0.2	0.4	0.22	0.3	0.2
5	0.09	0.08	0.60	0.22	0.91	0.22	0.83	0.21
6	0.09	0.09	0.61	0.25	0.72	0.2	0.31	0.18
7	0.08	0.09	0.66	0.2	0.63	0.2	0.46	0.19
8	0.1	0.09	0.7	0.25	0.84	0.21	0.73	0.19
9	0.1	0.1	0.4	0.2	0.77	0.2	0.8	0.21
10	0.08	0.08	0.63	0.24	0.65	0.2	0.67	0.2
11	0.08	0.07	0.53	0.21	0.49	0.2	0.53	0.2
12	0.1	0.08	0.61	0.24	0.58	0.21	0.84	0.21
13	0.08	0.09	0.58	0.2	0.71	0.19	0.81	0.20
14	0.09	0.06	0.6	0.23	0.88	0.2	0.93	0.22
15	0.1	0.08	0.7	0.3	0.83	0.2	0.67	0.2
16	0.08	0.08	0.68	0.3	0.94	0.19	0.59	0.2
17	0.09	0.09	0.62	0.19	0.97	0.23	0.64	0.2
18	0.1	0.09	0.55	0.18	1.0	0.22	0.76	0.2
19	0.1	0.1	0.68	0.17	0.87	0.2	0.88	0.2
20	0.1	0.08	0.7	0.19	0.83	0.22	0.91	0.23
21	0.12	0.1	0.68	0.23	0.74	0.18	0.83	0.21
22	1.0	0.1	0.69	0.2	0.62	0.2	0.6	0.2
23	0.1	0.1	0.7	0.17	0.73	0.19	0.31	0.19
24	0.11	0.09	0.66	0.22	0.61	0.2	0.4	0.2
25	0.1	0.1	0.71	0.3	0.45	0.2	0.39	0.19
$\bar{x}$	0.1	0.09	0.6	0.22	0.75	0.21	0.64	0.21

Cuadro 8. Longitud del sistema radical en (cm) de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificiado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 120 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Cantidad	*Longitud*	*Cantidad*	*Longitud*	*Cantidad*	*Longitud*	*Cantidad*	*Longitud*
1	1	0.01	1	0.04	1	0.06	2	0.05
2	1	0.01	1	0.05	1	0.04	1	0.05
3	1	0.01	1	0.05	1	0.05	1	0.05
4	1	0.009	2	0.05	1	0.06	1	0.05
5	1	0.008	1	0.04	1	0.05	1	0.05
6	1	0.01	1	0.05	2	0.05	1	0.05
7	1	0.01	1	0.05	1	0.06	1	0.05
8	1	0.009	1	0.05	1	0.06	1	0.05
9	2	0.01	1	0.05	1	0.05	1	0.05
10	1	0.013	2	0.05	1	0.05	1	0.05
11	1	0.01	1	0.06	1	0.05	1	0.05
12	1	0.01	1	0.05	1	0.04	1	0.05
13	1	0.01	1	0.05	1	0.05	2	0.05
14	1	0.012	1	0.05	1	0.05	1	0.05
15	2	0.01	1	0.05	1	0.05	2	0.05
16	1	0.011	1	0.05	1	0.05	1	0.05
17	1	0.01	2	0.05	1	0.05	1	0.05
18	1	0.01	1	0.05	1	0.05	1	0.05
19	1	0.008	1	0.05	1	0.05	1	0.05
20	1	0.01	1	0.04	2	0.05	1	0.05
21	1	0.01	1	0.05	1	0.06	1	0.05
22	1	0.012	1	0.06	1	0.06	1	0.05
23	1	0.01	1	0.05	1	0.04	1	0.05
24	1	0.01	1	0.06	2	0.04	1	0.05
25	1	0.008	1	0.05	1	0.04	2	0.05
$\bar{x}$	1	0.01	1	0.05	1	0.05	1	0.05

Cuadro 9. Crecimiento (cm) en longitud del vástago y grosor del pseudobulbo de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 150 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Longitud	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*
1	0.3	0.2	2.0	0.4	1.0	0.4	1.0	0.3
2	0.2	0.1	1.1	0.3	1.2	0.4	1.0	0.3
3	0.3	0.1	1.4	0.5	1.0	0.4	1.2	0.4
4	0.4	0.2	0.4	0.1	1.6	0.6	1.0	0.3
5	0.5	0.2	1.2	0.3	1.0	0.5	0.8	0.3
6	0.2	0.1	1.4	0.4	1.5	0.4	0.8	0.3
7	0.3	0.1	0.5	0.2	1.3	0.4	0.7	0.3
8	0.2	0.1	1.2	0.3	1.8	0.5	0.5	0.2
9	0.1	0.1	1.0	0.3	0.8	0.3	0.6	0.3
10	0.2	0.1	1.2	0.4	1.2	0.3	1.0	0.4
11	0.1	0.1	1.0	0.2	1.0	0.4	0.7	0.3
12	0.2	0.1	0.8	0.3	0.7	0.3	0.7	0.3
13	0.2	0.1	0.9	0.3	0.5	0.2	0.	0.3
14	0.4	0.2	1.0	0.4	0.7	0.3	0.9	0.3
15	0.3	0.1	1.4	0.4	0.5	0.2	0.6	0.2
16	0.2	0.1	0.5	0.2	1.0	0.3	0.7	0.3
17	0.2	0.1	1.2	0.4	1.0	0.3	0.5	0.2
18	0.2	0.1	0.8	0.3	1.0	0.3	0.5	0.2
19	0.2	0.1	1.0	0.4	0.7	0.3	0.5	0.3
20	0.1	0.1	0.7	0.3	0.8	0.3	1.0	0.4
21	0.3	0.2	0.5	0.2	0.5	0.3	1.0	0.3
22	0.2	0.2	0.4	0.2	0.9	0.3	0.8	0.3
23	0.2	0.1	1.0	0.4	1.2	0.4	0.6	0.3
24	0.2	0.1	1.0	0.4	0.9	0.4	0.4	0.2
25	0.2	0.1	0.7	0.3	0.8	0.3	0.4	0.2
$\bar{x}$	0.24	0.12	0.93	0.33	0.98	0..35	0.74	0.29

Cuadro 10. Longitud del sistema radical en (cm) de plántulas de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, 150 días después de la siembra.(n=25).

Planta	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Cantidad	*Longitud*	*Cantidad*	*Longitud*	*Cantidad*	*Longitud*	*Cantidad*	*Longitud*
1	1	0.1	1	1.3	2	1.8	1	1.5
2	1	0.1	2	1.2	2	1.1	1	1.3
3	1	0.4	2	0.8	2	1.5	1	0.7
4	1	1.0	2	0.5	3	1.6	1	0.6
5	1	0.6	3	1.2	2	1.0	2	0.7
6	1	0.1	3	0.8	3	1.1	1	1.0
7	1	0.2	2	1.1	2	0.6	1	1.0
8	1	0.5	1	0.7	2	1.3	2	1.2
9	2	0.3	2	1.5	3	1.0	1	1.5
10	1	0.3	3	1.0	1	1.3	1	1.0
11	1	0.3	2	1.0	1	1.0	1	0.7
12	1	0.2	2	1.2	2	1.0	2	1.0
13	1	0.1	2	1.0	2	1.0	2	1.0
14	1	0.1	2	1.5	2	1.0	3	0.5
15	2	0.3	2	1.2	1	0.9	1	0.2
16	1	0.1	2	1.2	1	1.0	1	0.7
17	1	0.1	2	1.3	2	1.0	2	0.4
18	1	0.1	2	1.3	2	1.3	1	0.1
19	1	0.1	3	1.2	2	0.8	1	0.7
20	1	0.1	1	0.3	2	1.0	1	0.2
21	1	0.1	2	1.0	1	1.0	1	0.8
22	1	0.2	2	1.4	2	1.1	2	0.7
23	1	0.2	2	1.0	1	1.5	2	0.4
24	1	0.1	1	1.0	2	1.0	1	1.1
25	1	0.1	2	1.3	2	1.0	1	0.4
$\bar{x}$	1	0.23	2	1.08	2	1.12	1	0.78

Cuadro 11. Crecimiento (cm) en longitud y grosor del vástago de *B. nodosa* en Knudson C Modificado (1946), en medio líquido (sin agar) y sólido en tres concentraciones diferentes de agar, desde la germinación hasta los 150 días después de la siembra (d.d.s.). (Datos utilizados = $\bar{x}$).

Edad (d. d. s.)	0g de Agar		7 g de Agar		10 g de Agar		13 g de Agar	
	Longitud	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*	*Longitud*	*Grosor*
15	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.02	0.04	0.03
30	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
60	0.1	0.08	0.2	0.1	0.28	0.1	0.27	0.15
90	0.1	0.09	0.39	0.2	0.55	0.2	0.49	0.2
120	0.1	0.09	0.60	0.22	0.75	0.21	0.64	0.21
150	0.24	0.12	0.93	0.33	0.98	0.35	0.74	0.29

Anexo 2.

Análisis Estadístico

Análisis de varianza para valores de grosor del pseudobulbo de *Brassavola nodosa*, usando el programa SYSTAT 10.

GD0 = grosor tratamiento 0g de agar

GD7 = grosor tratamiento 7g de agar

GD10 = grosor tratamiento 10g de agar

GD13 = grosor tratamiento 13g de agar

GD 0	***GD 7***	***GD 10***	***GD 13***
0.072	0.152	0.155	0.155

Edad (d.d.s.)	***GD 0***	***GD 7***	***GD 10***	***GD 13***
15	0.072	0.152	0.155	0.155
30	-0.052	-0.132	-0.135	-0.125
60	-0.042	-0.112	-0.105	-0.105
90	0.008	-0.052	-0.055	-0.055
120	0.018	0.048	0.045	0.045
150	0.018	0.068	0.055	0.055