

Universidad de las Américas

Facultad de Ingeniería
Ingeniería Agroindustrial

**Desarrollo de un medio de cultivo universal para la propagación de
orquídeas en laboratorio.**

Trabajo de titulación presentado en conformidad a los requisitos
Para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial

Profesor Guía: Ing. Hernán Naranjo

José Antonio Pardo Moscoso
2008

Declaración Profesor-Guía:

**UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS
LAURATE INTERNATIONAL UNIVERSITIES
CARRERA DE CIENCIAS AGROINDUSTRIALES Y VETERINARIA**

PARA : Ing. Tomás Villón
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
AGROINDUSTRIALES Y VETERINARIA.

DE : Ing. Hernán Naranjo S.
Profesor Guía

ASUNTO : INFORME FINAL DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

FECHA : Abril 07, 2008

Mediante la presente me permito indicarle a usted Señor Ingeniero el informe final del trabajo de fin de carrera del señor egresado José Antonio Pardo Moscoso cuyo tema de tesis es:

**“DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO UNIVERSAL PARA LA
PROPAGACIÓN DE ORQUIDEAS EN LABORATORIO”**

Por lo expuesto me permito informar:

El trabajo realizado por el Sr. José Pardo está debidamente correlacionado con el tema seleccionado así como con los objetivos esperados, notándose que existe coherencia en la investigación realizada.

Los autores consultados en el marco teórico sobre las generalidades de la familia orchidaceae, las especies representativas y en peligro de extinción, el tipo de reproducción, los medios de cultivos utilizados para su propagación, son los adecuados y que contribuyen a que este trabajo de investigación presente una buena fuente de información y fundamentación para la propagación mediante medios orgánicos de esta especie vegetal exótica y de carácter suntuoso.

La redacción técnica utilizada presenta una adecuada sintaxis, ortografía y puntuación, acorde a un estudio de investigación.

El Objetivo planteado en el anteproyecto corresponde al cubierto por el trabajo de titulación, comprobándose esto con las conclusiones emanadas en este estudio.

El presente trabajo de investigación permite al estudioso en el campo de la floricultura exótica, preservar estas especies que están en peligro o amenazadas de extinción, por el indebido abuso de nuestros recursos genéticos y el desgaste acelerado de nuestra biodiversidad, por lo tanto la importancia de este trabajo radica en la preservación de estas especies y su simplicidad en su propagación.

El estudiante demostró mucho interés en el tema desarrollado como investigación de fin de carrera además de un elevado compromiso para lograr el objetivo propuesto.

Las sugerencias y recomendaciones efectuadas fueron acogidas por el estudiante en lo referente a forma y fondo del presente trabajo de investigación. De igual forma los plazos de entrega fueron cumplidos y en ningún momento hubo desinformación sobre el avance del trabajo.

En virtud de lo expuesto y luego de compartir por el lapso de varios meses el proceso de elaboración y evaluación de esta actividad investigativa en el campo de la botánica, considero que el estudiante merece la calificación de **Diez puntos (10/10)**, en este su trabajo de titulación, no solo por el aporte y esfuerzo realizado en el cumplimiento del objetivo planteado sino también como profesional y como persona.

Sin otro particular, y dando fe de lo actuado

Atentamente

Ing. Hernán Naranjo Sánchez

cc. Archivo

Resumen:

Las zonas donde especies de orquídeas crecen están amenazadas por la deforestación y algunas se encuentran el peligro de extinción.

El proyecto tiene por objetivo la elaboración de un medio de cultivo universal para la reproducción de orquídeas en laboratorio. El medio se elaboro en base de nutrientes naturales provenientes de frutas y verduras, con el fin de remplazar de los reactivos químicos debido a su alto costo y dificultad de conseguir algunos de estos.

Los medios de cultivo se utilizaran para propagar varias especies, y simplificar el proceso de reproducción.

Mediante este proyecto se logró reproducir tres especies de orquídeas representativas y de diferentes características en un medio de cultivo artificial. A este medio se le doto de los nutrientes necesarios para el desarrollo de los protocormos, los mismos que posteriormente quedaron listos para el trasplante.

La reproducción de 3 de las 4 especies propuestas indica que es factible reproducir orquídeas en medios de cultivo menos complejos y elaborados con nutrientes naturales, dejando a un lado los medios químicamente elaborados.

ÍNDICE:

1. Introducción.....	7
2. Marco Teórico.....	7
2.1 Generalidades sobres orquídeas.....	7
2.2 Especies representativas	9
2.3 Tipos de reproducción de Orquídeas.....	10
2.4 Medios de cultivo	12
2.5 Propagación y procedimientos.....	12
2.6 Esterilización.....	15
2.6.1 Métodos Físicos.....	16
2.6.2 Métodos Químicos.....	23
2.7 Plantas Madre.....	27
2.7.1 Cattleya.....	27
2.7.2 Phragmipedium.....	30
2.7.3 Masdevalia.....	32
2.7.4 Maxillaria.....	35
2.7.5 Vanilla.....	37
3. Materiales y Métodos.....	39
3.1 Materiales.....	39
3.1.1 Reactivos Utilizados.....	40
3.1.2 Medios Elaborados.....	40
3.2 Métodos	45
3.2.1 Esterilización	46
3.2.2 Propagación.....	46
4. Resultados y Discusión.....	48
4.1 Medios de cultivo obtenidos.....	55
4.2 Tiempos de germinación de las especies.....	56
5. Conclusiones.....	58
6. Recomendaciones.....	61
7. Bibliografía.....	62
8. Anexos.....	63

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador goza de una riqueza invaluable en el campo botánico, tiene una biodiversidad asombrosa, flora y fauna única, pero lastimosamente se encuentra amenazada por el hombre en su afán de riqueza, que destruye día a día estos recursos, provocando la extinción de plantas y animales, sin que ningún organismo gubernamental se preocupe por hacer algo al respecto.

El objetivo de este proyecto radica en la conservación de especies en peligro de extinción ya que al obtener un medio de cultivo universal se puede simplificar el procedimiento para la propagación de orquídeas.

El medio de cultivo debe ser independiente para cada especie, ya que los requerimientos nutricionales son diferentes. Al obtener un medio de cultivo universal se podrá propagar con mayor facilidad todo tipo de orquídeas y así poder reproducir las especies amenazadas de mejor manera y sin necesidad de mover las plantas madres de su habitat natural.

2. MARCO TEÓRICO

Las Orquídeas pertenecen a la familia botánica de las Orchidaceae, ellas contienen 30.000 especies aproximadamente y alrededor de 60.000 híbridos y variedades producidas para diferentes propósitos. Se las encuentra alrededor de todo el planeta pero principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. Debido a su complejidad floral, a sus interacciones con los agentes polinizadores y a su simbiosis con hongos para formar micorrizas (hongos necesarios para la propagación natural), las orquídeas están consideradas como la parte final de la evolución floral.

2.1 Generalidades sobre orquídeas

La flor de las orquídeas ha despertado mucho interés del ser humano. A esta se le atribuyen propiedades terapéuticas y medicinales.

Existen escritos chinos de 1.500 años de antigüedad donde se hace referencia al cultivo de las orquídeas. Pero su verdadero descubrimiento como flor de gran valor ornamental y el comienzo de su calvario ocurrió en los albores del siglo XIX, cuando por casualidad llegaron a Europa las primeras plantas de *Cattleya labiata* (especie brasileña), muy parecida a la flor nacional de Venezuela, la *Cattleya mossiae*. Durante muchos años los recolectores profesionales provenientes en su mayoría de Francia e Inglaterra se dedicaron a saquear sin misericordia los bosques americanos para satisfacer el gusto de las damas y la avaricia de los coleccionistas de la época por nuevas y raras especies, a tal punto que muchas de ellas se consideran ya extintas en la naturaleza.

La familia Orchidaceae debe su nombre a una modesta especie del género europeo "Orchis" palabra que en griego significa "testículo", dada la semejanza entre sus pseudobulbos y las partes sexuales del animal. Las orquídeas conforman la familia más extensa del reino vegetal, con alrededor de 30.000 especies divididas en unos 1.800 géneros distribuidos por todo el mundo. Solamente existen dos ambientes en la tierra donde no prosperan estas plantas, los polos y los desiertos de arena.¹

Se han encontrado restos fosilizados de insectos, trasladando polen de orquídeas, los cuales tienen alrededor de 80 millones de años, antes de que el hombre apareciera en el planeta.

Son las plantas más evolucionadas y especializadas. Con una elevada capacidad de adaptarse, pueden crecer al nivel del mar como en páramos elevados. Viven sobre árboles (epífitas), sobre las rocas (litófitas), sobre tierra

¹ Artículo de la Enciclopedia Libre Universal en Español.

<http://enciclopedia.us.es/index.php/Orchidaceae>
Autor: Morales Juan

e incluso en ambientes subterráneos. No son plantas parasitas, muchas veces utilizan los árboles para alcanzar la luz o el agua por lo tanto no se alimentan de el.

Su tamaño varía, algunas miden pocos centímetros y sus flores son diminutas, mientras que otras son extremadamente grandes y pueden tener el tamaño de un árbol. Varias especies han logrado que sus flores se parezcan al insecto polinizador, otras utilizan variedad de colores, muy llamativos para llamar la atención de los insectos polinizadores, también poseen extravagantes aromas que atraen a los polinizadores desde varios kilómetros.

En cuanto a la floración, esta varía dependiendo de la especie, por lo general una vez al año dependiendo de factores climáticos y ambientales; la duración de la flor puede ser de un día a más de 3 meses. El ser humano ha logrado crear híbridos los cuales florecen más de una vez al año.

2.2 Especies representativas

Hay muchas especies representativas y en peligro de extinción, las cuales son muy apreciadas por jardines botánicos y coleccionistas, las especies más representativas son aquellas que poseen características singulares o colores espectaculares, pero estas especies también pueden encontrarse en peligro por diferentes motivos.

Entre las especies más representativas tenemos: *Cattleya*, *Cymbidium*, *Acineta*, *Anguloa*, *Coryanthes*, *Dendrobium*, *Drácula*, *Epidendrum*, *Gongora*, *Lycaste*, *Masdevallia*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Phragmipedium*, *Phalaenopsis*, *Pleurothallis*, *Rossioglossum*, *Vanda*, *Vanilla*, entre las cuales también hay subespecies e híbridos de importancia.

Muchas de estas especies poseen subespecies en peligro de extinción, amenazadas por la tala de bosques nativos y la eliminación de su hábitat natural, además existen variedades que solamente se han encontrado en un lugar del mundo como es el caso de *Phragmipedium kovachii* encontrada en Perú considerada el mayor acontecimiento de los últimos 100 años. Desafortunadamente el tráfico a gran escala de esta especie la ha diezariado de su hábitat.

En el Ecuador se corre el mismo riesgo, hay variedades que pueden llegar a desaparecer sin haber sido descubiertas todavía.

2.3 Tipos de reproducción de Orquídeas

La reproducción de las orquídeas tiene aspectos muy peculiares. Las flores necesitan ser polinizadas y muchas veces estas solo pueden ser polinizadas por insectos, el hombre no puede hacerlo de ninguna forma. Las flores se mantienen hasta que son polinizadas y sólo después se marchitan.

“Los insectos, atraídos por el olor o la forma de la flor son quienes propician el desarrollo de los tubos polínicos, luego de haber trasladado el polinio —masa de polen— al estigma. Solo así ocurre la fecundación y, más tarde, el paulatino crecimiento de una cápsula con miles y miles de diminutas semillas, posteriormente se diseminarán en el entorno por la acción del viento”. (ARDITTI, 1993).

Luego de la fecundación los embriones solo germinan si son infestados por un hongo (micorriza), que los protege de los ataques microbianos, sin esta simbiosis simplemente no existe germinación.

Si no existe esta asociación, la planta sólo puede sobrevivir en condiciones de asepsia absoluta, lo cual es casi imposible en la naturaleza y solo se lo consigue en laboratorio.

Las orquídeas producen miles de semillas en cada flor, algunas incluso millones, las semillas casi no tienen sustancias de reserva, por lo que necesitan de la pronta simbiosis del hongo para sobrevivir (micorrizas con hongos del género *Rhizostoma*). Luego de que la simbiosis se produce, estas llegan a germinar desarrollándose normalmente hasta que ya no necesitan del hongo para subsistir. La mayoría de las semillas no llegan a germinar, debido a que carecen del potencial germinativo en tierra puesto que no poseen endospermo, lo cual explica y condiciona la reproducción sexual.

“En la corteza de ciertos árboles habita un hongo específico, con el cual las semillas de las orquídeas se relacionan hasta tanto hayan alcanzado un nivel de desarrollo favorable, para iniciar otro, el del óptimo crecimiento de la futura planta. Una vez logrado este estadio superior, la pequeña plántula se independiza para siempre del hongo que por un tiempo fue el que le suministró las sustancias nutritivas imprescindibles para la germinación y demás procesos biológicos.

Sin esta simbiosis transitoria, las orquídeas en condiciones naturales no tendrían una multiplicación sexual. Lógicamente, no todas las semillas llegan a ser una planta, ya sea por el incierto paradero que les espera a muchas de ellas o por la infertilidad de un alto porcentaje de las mismas.

Otro método de propagación es el cultivo in vitro. Tanto en clonación como micropropagación se utilizan medios de cultivo. El cultivo in vitro a partir de semillas, permite obtener plantas vigorosas en tiempo más corto, siendo esta la manera de mantener estas especies si en algún momento desapareciera, por alguna circunstancia, el hongo *Rhizostoma*. Mientras que la clonación, parte del tejido meristemático se reproduce en un medio de cultivo especial generando plantas de características iguales a las de la planta madre.

2.4 Medios de cultivo

Existen un sinnúmero de medios de cultivo (por lo general estos incluyen los requerimientos nutricionales para cada especie), que se pueden dividir en dos: germinación y crecimiento.

Los medios de germinación incluyen nutrientes específicos para los primeros meses de desarrollo y formación de la futura planta. Estos elementos son básicamente: agua, sales minerales, azúcar, vitaminas, y en algunos casos hormonas vegetales. Además hace falta un elemento que dé consistencia al medio que suele ser el agar, aunque también es posible usar vermiculita. También se utiliza extracto de levadura que es muy beneficiosa pues proporciona vitaminas inusuales, algo de nitrógeno en forma de aminoácidos y oligopéptidos (fragmentos muy cortos de proteína de entre dos y 10 aminoácidos), oligoelementos y cofactores.

Cabe recalcar que cada especie tiene diferentes requerimientos por lo tanto, es complicado encontrar un medio sirva para la reproducción de varias especies.

2.5 Propagación y procedimientos

La propagación en cultivo in vitro ha sido utilizada de forma extensiva en la conservación de los recursos vegetales así como en la producción de estos. Sin embargo el uso más importante radica en la propagación de poblaciones que se encuentran bajo peligro de extinción.

Mediante germinación in Vitro, utilizando semillas, se mantiene la variabilidad genética de las poblaciones naturales y es uno de los componentes más importantes para su conservación. Utilizando este método se viabilizan semillas en frascos de vidrio sobre un medio de cultivo que contiene nutrientes esenciales para germinación y en el que posteriormente estas se desarrollarán.

Existe dos tipos de germinación in Vitro: simbiótica y no simbiótica.

La **germinación simbiótica**, permite que las semillas crezcan mediante el uso del hongo micorriza apropiado. Este hongo infesta el frasco y comienza la simbiosis con las semillas, el hongo alimenta al protocormo² y este empieza a desarrollarse hasta que produzca hojas y pueda ser trasplantado a otro frasco para que su crecimiento sea más apropiado.

Existen medios de cultivo simples los cuales solamente utilizan agar, levadura y avena en polvo, sin embargo, la desventaja es que se necesita seleccionar el tipo de hongo micorriza adecuado para que se origine la simbiosis, prevenir el parasitismo y la muerte de las semillas. Existe muy poca investigación acerca de los hongos apropiados para los diferentes tipos de orquídeas, resultando por lo tanto muy complicado la reproducción de muchas especies y por ende el fracaso de este tipo de propagación.

La **germinación a simbiótica** es un poco más complejo que la simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada debido a que no existe la intermediación del hongo.

Para la germinación por medio de cualquiera de estos métodos es sumamente importante que todos los utensilios, frascos, semillas se mantengan desinfectados desde el inicio del procesos ya que la presencia de cualquier tipo de bacteria u hongo pueden afectar al proceso matando a las semillas.

Hay muchos métodos de esterilización pero el más común es el auto clavado por 20 minutos a 15 atmósferas en cuanto a utensilios y frascos se refiere, ya que en esas condiciones se eliminan las esporas y bacterias presentes.

²masa de células producida a partir de semillas fertilizadas

En cuanto a las semillas, las cápsulas que contienen las semillas se sumergen en una solución de cloro y agua al 10% por un tiempo determinado dependiendo de su tamaño, verificando obviamente que las cápsulas no se encuentren abiertas.

Luego de tener las condiciones adecuadas procedemos al sembrado de las semillas. Existen varios métodos pero el más apropiado es el uso de la cámara de flujo laminar la cual nos permite tener condiciones de esterilidad adecuada para poder abrir las cápsulas y sembrar las semillas sin que estas se infecten. Hay que tener muy en cuenta que todos los utensilios a utilizarse deben estar bien desinfectados caso contrario todo el proceso fracasara.

Para mantener una completa asepsia es muy importante el uso adecuado de la cámara de flujo laminar ya que aquí se puede determinar el éxito o fracaso del proceso.

Antes de iniciar el trabajo se debe desinfectar por completo la cámara usando alcohol de 70-90% de concentración, de preferencia etanol, se utiliza un rociador y algodón empapado con alcohol para limpiar las esquinas. Se debe desinfectar tanto antes como después de utilizar la cámara.

Todo debe estar desinfectado antes de que el material floral ingrese a la cámara, por ello antes de ingresar algún objeto, equipo o material de trabajo es conveniente siempre rociarlo con alcohol.

Es necesario tener cerca un recipiente grande con alcohol, donde los utensilios: pinzas, bisturí, etc. estarán expuestos siempre al etanol. Dentro de la cámara de flujo laminar debe estar un mechero que ayudara a flamear los utensilios antes de utilizarlos, previniendo de esta manera cualquier tipo de contaminación. Después de flamear los utensilios se los dejara enfriar en un frasco dentro de la cámara previamente esterilizado.

Se debe trabajar siempre con las manos limpias, desinfectadas o con guantes quirúrgicos, se puede rociar alcohol en las manos pero con cuidado de no encenderlo. Se debe evitar exponer los materiales fuera de la cámara, así como hablar o toser mientras se este trabajando.

2.6 Esterilización³

La esterilización del medio es básica para el proceso de propagación de orquídeas, ya que la presencia de bacterias o de algún microorganismo podría afectar todo el proceso.

Los microorganismos son agentes microscópicos vivos e imperceptibles a los sentidos, generalmente están agrupados en colonias, y bien puede estar como una unidad formadora de colonias (U.F.C.), muchas veces desarrollan un medio apropiado para formar colonias imperceptibles, y estos pueden ser patógenos (productores de ciertas enfermedades) o banales (los habitualmente hallados en los alimentos, el aire, el polvillo ambiental y que no perjudican al hombre).

Estos generan dificultades en cuanto a investigación microbiológica, ya que los instrumentos como los medios de cultivo son invadidos con suma facilidad por los microbios presentes en el medio ambiente.

Debido a esto la esterilización es un procedimiento que consiste en destruir todos los gérmenes vivos que existan sobre los objetos o sustancias a utilizarse y que se desea se encuentren libres de ellos (aséptico).

Los Microorganismos pueden clasificarse en frío resistentes, que son los resistentes al frío y termo resistentes o resistentes a las altas temperaturas, aunque la clasificación más común es por la temperatura a la que se

³ Tomado de: www.microbiologia.com.ar,
MICROBIOLOGÍA MODERNA, James M. Jay. Año 2002
LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN Gerhard Wildbrett Año 2000

reproducen. Así se los puede clasificar en Criófilos (-5 a 14° C); Mesófilos (25 a 47° C) y Termófilos (50 hasta 113° C). Por ejemplo, muchos hongos se destruyen con la temperatura, pero sus esporas aún son viables y cuando encuentran un medio apropiado, rico en nutrientes y humedad, se reproducen. Por tal motivo la tecnología para su destrucción debe considerar éstas variables.

La esterilización comprende todos los procedimientos físicos, mecánicos y químicos, que se emplean para destruir, inactivar o retener gérmenes en general y patógenos en particular. Mediante esta, los materiales de laboratorio y los elementos quirúrgicos alcanzan un estado de desinfección que evita la contaminación.

2.6.1 Métodos físicos:

Calor

La utilización de este método y su eficacia depende de dos factores: el tiempo de exposición y la temperatura. Los microorganismos son susceptibles, en distinto grado, a la acción del calor. El calor provoca desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidantes irreversibles en los microorganismos.

Fuego Directo

Este procedimiento consiste en exponer a la llama de un mechero de Bunsen el objeto que se desea esterilizar. Cuando éste es de metal se deja permanecer en el área de reducción de la llama hasta que se ponga al rojo (asas de cultivo; algunas agujas, etc.). Si es de vidrio se deja un tiempo prudencial, procurando que la llama llegue a todos lados. Antes de utilizar el objeto esterilizado es necesario dejarlo enfriar en un sitio aséptico. Este procedimiento tiene limitaciones debido a que deteriora los objetos y si son de gran volumen, la esterilización nunca es perfecta.

Calor Seco

El calor seco produce desecación de la célula, esto es tóxico por niveles elevados de electrolitos y fusión de membranas, residuos que quedan adheridos al objeto estéril. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con éstos.

Aún así se sigue utilizando el calor seco en todos los laboratorios para la esterilización de placas de petri y pipeteros (recipientes metálicos para alojar pipetas para la siembra de sustancias líquidas).

La acción destructiva del calor sobre proteínas y lípidos componentes o nutrientes de los microorganismos, requiere mayor temperatura cuando el material está seco o la actividad de agua del medio es baja.

Estufas

Para esterilizar por intermedio del aire caliente es necesario colocar los objetos en aparatos especiales llamados ESTUFAS. Y llevar el aire interior a una temperatura entre 150 y 190 °C. Uno de los primeros aparatos utilizados para este fin fue el horno de Pasteur, que luego se sustituyó por estufas de aire caliente. Estas constan de una doble cámara, el aire caliente generado por una resistencia eléctrica circula por la cavidad principal y por el espacio entre ambas cámaras, a temperaturas variables, siendo la más aconsejada 170° C para el instrumental metálico y a 140° C para el contenido de los tambores.

Se mantiene una temperatura estable mediante termostatos de metal denominados par bimetálico, consiste en dos metales de distinto coeficiente de dilatación. Cuando uno se dilata, el otro no lo hace y se arquea. Uno de los extremos de éste dispositivo se halla en contacto con un interruptor que corta la alimentación de la resistencia calefactora.

Calor Húmedo

El calor húmedo produce desnaturalización y coagulación de proteínas. Estos efectos se deben principalmente a dos razones:

El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas son producidas por reacciones que eliminan agua.

El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire.

AUTOCLAVE

Se realiza la esterilización por el vapor de agua a presión. El modelo más usado es el de **Chamberland**. Esteriliza a 120° a una atmósfera de presión (estas condiciones pueden variar) y se deja el material durante 20 a 30 minutos.

Equipo

Consta de una caldera de cobre, sostenida por una camisa externa metálica, que en la parte inferior recibe calor por combustión de gas o por una resistencia eléctrica.

La caldera se cierra en la parte superior por una tapa de bronce sujeta por bulones, mariposas o charnelas. Esta tapa posee tres orificios, uno para el manómetro, otro para el escape de vapor en forma de robinete (también llamado espita) y el tercero, para una válvula de seguridad que funciona por contrapeso o a resorte.

Funcionamiento y método para esterilizar adecuadamente en Autoclave:

Se coloca agua en la caldera, procurando que su nivel no alcance a los objetos que se disponen sobre una rejilla o canasta de metal. Se cierra asegurando la tapa, ajustando los bulones y se proporciona calor, dejando

abierta la válvula de escape hasta que todo el aire se desaloje y comience la salida de vapor en forma de chorro continuo y abundante.

Se cierra la espita de vapor y se espera hasta que llegue a la temperatura adecuada. A partir de allí se cuenta el tiempo de esterilización, luego del cual se debe esperar el descenso de la temperatura para abrir la espita de purga y la tapa de la autoclave nuevamente.

Atmósferas	Grados Centígrados
0	100
1/2	112
1	120
1 1/2	128
2	135

Este proceso de esterilización es el que mejor resultados ha dado en microbiología. El vapor de agua a fuerte presión actúa a mayores temperaturas:

Tiempos de esterilización en autoclave:

Del tiempo, temperatura y presión ha usarse en la esterilización depende del éxito alcanzado. Generalmente los datos presión y temperatura son fijados, y el único factor que varía es el tiempo. Los materiales a usarse necesitan diferentes tiempos de esterilización dependiendo de su textura, porosidad, y otras características propias de cada material. Algunos materiales como el hule, necesitan poco tiempo, mientras otros como el metal quirúrgico

necesitan más. Los siguientes datos han sido tomados para una temperatura de esterilización de 250° F (121° C) a 15-20 psi.

- Guantes de Caucho (Hule) 15 minutos
- Sondas (base tejida) 15 minutos
- Sondas (látex) 15 minutos
- Frascos de Vidrio, Cristalería en General 20 minutos
- Agua en frascos 20 minutos
- Jeringas de Vidrio 20 minutos
- Bandeja 30 minutos
- Equipo de transfusión 30 minutos
- Paquetes de maternidad 30 minutos
- Ropa 30 minutos
- Torundas 30 minutos
- Paquete quirúrgico 45 minutos
- Instrumental de acero inoxidable 45 minutos

Cuando se esteriliza se deben hacer paquetes bien cerrados y bien ordenados, para que haya buena penetración de vapor en el material. No incluir dentro del mismo paquete material con diferentes tiempos de esterilización.

El método utilizado para envolver los paquetes deberá garantizar el mantenimiento de las condiciones de esterilidad de los materiales durante su almacenamiento.

Como Cargar el Autoclave

- a) Se deben acomodar los bultos o paquetes de tal forma que haya una libre circulación de vapor entre ellos (no tratar de llenar el autoclave hasta sobrecargarlo).
- b) Colocar de lado las botellas, frascos y cualquier clase de recipiente no poroso de material seco. Esto permitirá un pronto desplazamiento del aire y un rápido contacto del vapor con las superficies de las vasijas y su contenido. También facilita el secado.
- c) Esterilizar los líquidos separándolos de otros materiales.
- d) Cuando se esterilizan líquidos, debe hacerse con los recipientes destapados.
- e) La cristalería deberá esterilizarse colocando los recipientes boca abajo u horizontales (nunca con la boca hacia arriba).

Tyndalización:

Esterilización por acción discontinua del vapor de agua, se basa en el principio de Tyndall. Las bacterias que resisten una sesión de calefacción, hecha en determinadas condiciones, pueden ser destruidas cuando la misma operación se repite con intervalos separados y en varias sesiones.

Se efectúa por medio de una autoclave de Chamberland, dejando abierta la válvula de escape, o sea funcionando a la presión normal. Puede también realizarse a temperaturas más bajas, 56° u 80° para evitar la descomposición de las sustancias a esterilizar, por las temperaturas elevadas.

Ebullición

Durante mucho tiempo se "hirvieron" los utensilios y materiales quirúrgicos o jeringas hipodérmicas para esterilizarlas. El agua a 100 °C no garantiza una adecuada esterilización, no obstante posee la propiedad de desprender las colonias o los microorganismos y destruir aquellos que son susceptibles a ésta temperatura.

Un claro ejemplo de ello fue el sistema utilizado hasta hace pocos años para esterilizar jeringas de vidrio y agujas hipodérmicas de níquel con embocadura de bronce ó en el mejor de los casos, platino, hirviéndolos en agua.

Filtración

Este procedimiento es aplicable a la esterilización de líquidos y gases, especialmente los primeros. Cuando el líquido a filtrar no puede resistir, sin descomponerse, la acción del calor, se aplica la técnica de filtración, la que puede efectuarse mediante presión o aspiración.

Se basa en el pase de líquidos a través de sustancias porosas que detienen a los microbios. Los antiguos filtros se fabricaban en forma de bujías que son cilindros huecos abiertos por una extremidad y cerrados por otra, de paredes de espesor variable.

La filtración se reconoció como técnica de esterilización a partir de las observaciones de Koch en 1893, con la epidemia de cólera y la presencia del vibrión en el agua. Esta observación fue ilustrada en la epidemia Hamburgo-Altona en 1892. El agua del río Elba, que contenía *Vibrio comma* pasaba a las cañerías de agua de Hamburgo. Solo aparecieron unos pocos casos de cólera en el suburbio de Altona, donde el agua del Elba era filtrada por arenas (nótese el plural, refiriéndose tal vez a varios grados de arena), antes de su distribución.

En la actualidad se usan membranas filtrantes con poros de un tamaño determinado. El tamaño del poro dependerá del uso al que se va a someter la muestra. Los filtros que se utilizan no retienen virus ni micoplasmas, estos últimos están en el límite de separación según el diámetro de poro que se utilice. La filtración se utiliza para emulsiones oleosas o soluciones termolábiles. Se usa para esterilizar aceites, algunos tipos de pomadas, soluciones oftálmicas, soluciones intravenosas, drogas diagnósticas, radiofármacos, medios para cultivos celulares, y soluciones de antibióticos y vitaminas.

2.6.2 Métodos químicos:

Estos métodos provocan la pérdida de viabilidad de los microorganismos. En comparación con los procedimientos físicos, estos métodos tienen una importancia secundaria. Los antisépticos son considerados venenos protoplasmáticos que, al actuar sobre los gérmenes, los destruyen. Algunos de ellos ejercen su acción nociva sobre todas las células, por lo cual se les considera venenos generales, por el contrario otros actúan sobre algunas especies bacterianas, mostrándose como venenos específicos. Este método es óptimo para la antisepsia de las manos del operador, de locales, de mesas de trabajo, de jaulas de animales, y para destruir gérmenes que puedan encontrarse en lugares de trabajo.

AGENTES QUÍMICOS

La Iodopovidona (pervinox), el Cloruro de Benzalconio (sal de amonio cuaternario o Cloruro de Zefirano) son ejemplos de antisépticos útiles para desinfectar manos y superficies. Cuando la superficie es resistente, el mejor agente biocida es el Hipoclorito de Sodio (agua lavandina).

ESTUFAS DE ESTERILIZACION POR OXIDO DE ETILENO

Destruye todos los organismos y microorganismos conocidos, incluso esporas y virus. Esteriliza sin deterioro artículos de goma, plástico, metal, madera, lana, piel, papel, productos farmacéuticos.

Esterilización con embalajes: a este gas son permeables sustancias como polietileno, nylon, celofán, etc.

En 1928, autores americanos: Bac, Cotton y Ellington; Schrader y Bossert y Autores alemanes: Gassner y Hase, descubrieron las propiedades del óxido de etileno.

En 1933 fueron certificadas las propiedades del óxido de etileno en un laboratorio de La Sorbona y en 1939 se estudió en un laboratorio de investigación del Ejercito de U.S.A.

El óxido de etileno era bactericida, esporicida, con gran poder de penetración, efectivo a bajas temperaturas con capacidad de penetrar sustancias porosas; para evitar su poder explosivo y su alto potencial inflamable se mezcló con CO₂ en una proporción de 7,15 veces el volumen de óxido de etileno.

El tiempo de esterilización que requiere el material depende de múltiples variables, el vacío que se produce, la humedad, la concentración del gas expresado en gs./l y la temperatura; es decir que, reduciendo la temperatura aumenta el tiempo de exposición requerido.

El gas se adquiere en botellas metálicas o cartuchos que se vaporizan, cambian de líquido a gas a 10° C.

Todos los artículos deberán airearse por 6 hs. después de una esterilización.

El Oxido de etileno es un agente alquilante que se une a compuestos con hidrógenos lábiles como los que tienen grupos carboxilos, amino, sulfhidrilos, hidroxilos, etc.

Es utilizado en la esterilización gaseosa, generalmente en la industria farmacéutica. Destruye todos los microorganismos incluso virus. Sirve para esterilizar material termosensibles como el descartable (goma, plástico, papel, etc.), equipos electrónicos, bombas cardiorrespiratorias, metal, etc. Es muy peligroso por ser altamente inflamable y explosivo, y además cancerígeno.

Con aldehídos

Son agentes alquilantes que actúan sobre las proteínas, provocando una modificación irreversible en enzimas e inhiben la actividad enzimática. Estos compuestos destruyen las esporas.

Glutaraldehído

Consiste en preparar una solución alcalina al 2% y sumergir el material a esterilizar de 20 a 30 minutos, y luego un enjuague de 10 minutos. Este método tiene la ventaja de ser rápido y ser el único esterilizante efectivo frío. Puede esterilizar plástico, goma, vidrio, metal, etc.

Antisépticos	Alcoholes
	Iodo
	Agentes catiónicos, aniónicos y anfóteros
	Órgano Mercuriales
	Colorantes
Desinfectantes y/o Esterilizantes	Cloro y Compuestos clorados
	Aldehídos
	Oxido de Etileno
	Compuestos Fenólicos
	Ácidos y Alcalis

Formaldehido

Se utilizan las pastillas de paraformaldehido, las cuales pueden disponerse en el fondo de una caja envueltas en gasa o algodón, que después pueden ser

expuestos al calor para una rápida esterilización (acción del gas formaldehído). También pueden ser usadas en Estufas de Formol, llamadas también de formalina, que son cajas de doble fondo, en cuya base se colocan las pastillas y se calienta hasta los 60° C, pueden esterilizar materiales de látex, goma, plásticos, etc.

Las pastillas de formalina a temperatura ambiente esterilizan en 36 hs.

RADIACIÓN

Su acción depende de:

- El tipo de radiación
- El tiempo de exposición
- La dosis

Radiaciones Ionizantes

Producen iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas, y componentes esenciales para la viabilidad de los microorganismos.

Tienen gran penetrabilidad y se las utiliza para esterilizar materiales termolábiles (termosensibles) como jeringas descartables, sondas, etc. Se utilizan a escala industrial por sus costos.

Rayos Ultravioleta

Afectan a las moléculas de DNA de los microorganismos. Son escasamente penetrantes y se utilizan para superficies, se utilizan para la esterilización en quirófanos.

Rayos Gamma:

Su empleo esta basado en los conocimientos sobre la energía atómica. Este tipo de esterilización se aplica a productos o materiales termolábiles y de gran importancia en el campo industrial. Puede esterilizar antibióticos, vacunas, alimentos, etc.

2.7 Plantas Madre

Las plantas madre son la base del proyecto ya que gracias a estas se podrá obtener las cápsulas que contienen las semillas que posteriormente, luego de su germinación se transformarán, en plantas.

Se seleccionaron plantas jóvenes, libres de enfermedades y con flores que han sido polinizadas por la misma especie para que el resultado de la germinación sea lo esperado.

Adicionalmente se detalla la especie Vanilla debido a su valor comercial y al ser un referente en cuanto a la familia Orchidaceae.

2.7.1 Cattleya

Las orquídeas Cattleya, algunas veces conocidas como las reinas de las orquídeas, son nativas de la América tropical. Mejor conocidas por su increíble variedad de flores cuyo tamaño y número varía de acuerdo a la variedad. En su hábitat natural, ellas crecen en los árboles sin tierra alguna que soporten sus raíces.

Su género tiene alrededor de 50 a 75 especies de la tribu Epidendreae, subtribu Laeliinae de la familia Orchidaceae. La mayoría de ellas son originarias de América Central y Suramérica (Panamá, Brasil, Colombia y Ecuador). Su nombre "Cattleya" es en honor de William Cattley orquidólogo aficionado inglés.



Cattleya trianae



Cattleya Máxima

Su hábitat va desde Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Se encuentran en bosques de montaña de niebla y humedad en alturas de 1000 a 1500 metros sobre el nivel del mar. Son epifitas y tienen pseudobulbos. Poseen hojas foliares dísticas, que forman una planta péndula con formas de volantes e inflorescencias auxiliares unífloras en las que la flor está boca arriba con un apéndice truncado hacia el labelo el que posee una apículo. Las Cattleyas se dividen en dos grupos:

Cattleyas Labiadas o Unifoliadas:

Por lo general se encuentran en Suramérica, sus flores son grandes y de pétalos anchos, tiene una hoja que sale del ápice del pseudobulbo. Producen dos o tres flores, que duran de 1 a 4 semanas. Florea dos veces al año. Estas orquídeas son muy populares por sus flores grandes y entre las especies más conocidas están *Cattleya dowiana*, *Cattleya trianae*, *Cattleya mossiae*, etc.



Cattleya alba

Las Cattleyas Bifoliadas:

Son originarias de Centroamérica, de flores pequeñas (en racimos de 20 o más flores) de más intenso y variado color que las unifoliadas, y de mejor textura que aquellas.



Cattleya bicolor

Son orquídeas que requieren de mucha luz, pueden ser expuestas a luz directa, pero tamizada por un visillo o cortina adecuada.

Necesitan temperaturas altas y una diferencia entre el día y la noche de unos 10-12° C, Temperaturas diurnas entre los 25-30° C y nocturnas no inferior a 14-15° C.

2.7.2 Phragmipedium

Este género es muy importante tanto por su valor comercial como por su belleza.

Phragmipedium posee alrededor de veinte especies monopodiales terrestres, epífitas ó litófitas de orquídeas de la Subfamilia Cypripedioideae de la familia de las Orchidaceae. Están distribuidas por la América tropical desde México y hacia el Sur por Bolivia y Brasil. Se encuentran muy amenazadas por la destrucción de su hábitat.



Phragmipedium eric young

El nombre Phragmipedium vine de (Phrag.), "phragma" = "valla" ó "división" y "pedilon" = "zapatilla" donde se refiere a las paredes de separación en el ovario y la forma del labelo.

Estas orquídeas terrestres, epífitas ó litófitas, están muy amenazadas por la destrucción de su medio debido a la deforestación para la agricultura. Todos

los miembros del género *Phragmipedium* están incluidos en el Apéndice I del Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Salvajes en Peligro de Extinción (CITES).

El género *Phragmipedium* muestra un único estaminodio largo parecido a una placa, pétalos parecidos a bigotes y un ovario trilobular. El labelo con forma de saco está curvado hacia dentro en los márgenes. Las hojas son puntiagudas con una longitud de unos 80cm. No presentan pseudobulbos y el tallo llega a los 80 cm de altura, presentando la inflorescencia de 2 a 3 flores.



Phragmipedium kovachii

En este género encontramos a *Phragmipedium kovachii*, la cual es considerada como el “descubrimiento del siglo” en el campo de las orquídeas, por ser un material genético de primer orden además de su magnificencia floral.



Phragmipedium kovachii

2.7.3 Masdevallia

En este género existen alrededor de 500 especies que incluyen algunas de las más extrañas y a la vez mejor conocidas orquídeas de la subtribu Pleurothallidinae de la familia Orchidaceae agrupadas en diferentes subgéneros.



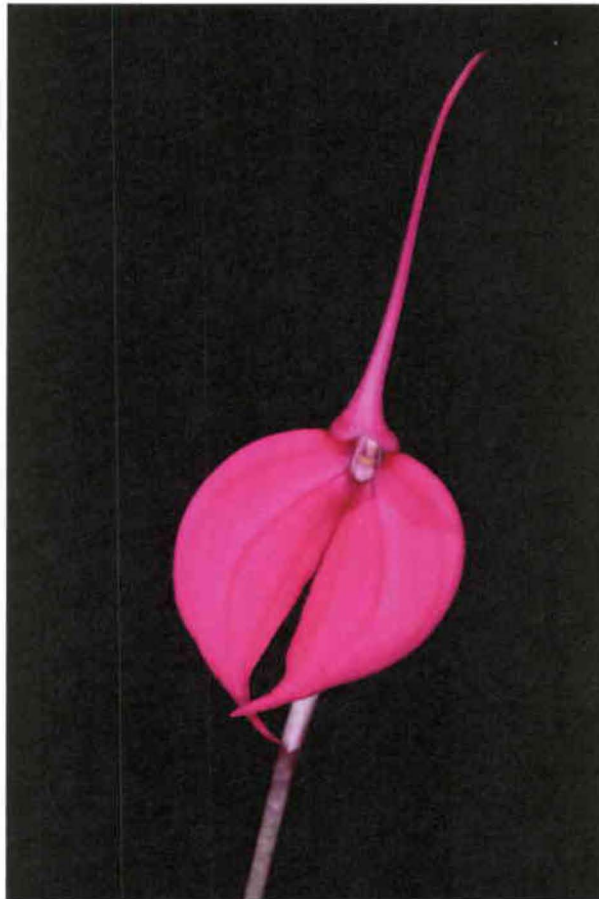
Masdevallia welischii

Su nombre "Masdevallia" es debido a José Masdeval, un médico y botánico en la corte de Carlos III de España. Se las encuentran desde México hasta el Sur de Brasil, pero la mayoría se encuentran en regiones de gran altitud (2,500 - 4,000 m) de los Andes de Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia. Pueden ser epífitas, terrestres ó desarrollarse como litófitas en las rocas desnudas.



Masdevallia rimarima-alba

Forman en ramilletes desde un corto rizoma del que aparecen diminutos pseudobulbos. Cada uno con una hoja suave y carnosas hendida con unos penachos. Estas hojas de verde intenso son ovadas ó lanceoladas. Los tallos florales se desarrollan erectos. Se pueden encontrar entre las raíces de algunas especies epífitas, colgando debajo de la planta. Las flores terminales con largas espuelas tienen básicamente una forma triangular se desarrollan en unos pedicelos cortos siendo de unos 6 cm de anchura. En cada pedicelo normalmente hay una sola flor pero a veces hay varias.



Masdevallia coccinea

Los pétalos y el labelo que tiene forma de lengua ó de concha son pequeños y están parcialmente ocultos dentro de la flor. Los tres sépalos son grandes y fusionados a lo largo de sus bordes, y generalmente tienen unos apéndices largos. Los sépalos tienen todos el mismo color y marcas (frecuentemente coloreados brillantemente, grandes y espectaculares). Florecen generalmente durante el verano.

2.7.4 Maxillaria

Su nombre viene del latín maxilla, mandíbula; en referencia al prominente mentón formado por el pie de la columna y la base de los sépalos laterales. Este es uno de los géneros más extensos en el Perú, con 231 especies registradas hasta la fecha. Creado por los botánicos Ruiz y Pavón en 1974, en su famosa expedición a Perú y Chile. Este género presenta una variada morfología vegetativa entre sus muchas especies.



Maxillaria cucullata

La mayor parte de las especies de este género son epifitas aunque se dan también litófitas y terrestres. Algunas presentan pseudobulbos. Las hojas nunca son pinadas pero varían en formas. La inflorescencia es siempre lateral brotando de la base del pseudobulbo o de la axila de las hojas. Las flores varían mucho en forma y color la columna.

Están distribuidos en la selva subtropical desde el nivel del mar hasta los 3500 m.s.n.m. debido a esto sus requerimientos de temperatura y condiciones

climáticas son muy diversas. La mayoría son epifitas, y de gran tamaño, algunas son terrestres y pueden ser encontradas en partes altas, como en los árboles, así como cerca de las rocas en el suelo; siempre y cuando la humedad y el aire están acorde con sus requerimientos.



Maxillaria rodrigueziana

Sus pseudobulbos son redondos y algunas veces oblongos y por lo general tienen una o dos hojas lanceoladas, algunas crecen juntas en un rizoma corto, lo que las diferencia de otras especies.



Maxillaria picta

Las flores crecen solitarias en los tallos cortos, de la base del pseudobulbo. La mayoría son pequeñas, pero algunas especies tienen flores grandes y llamativas. Las flores nunca son más largas que las hojas. Sus pétalos y sépalos son libres tienen un lávelo típicamente curvado y con tres lóbulos discretos.

2.7.5 Vanilla

Existen más de 60 especies, pero solo una es usada para propósitos comerciales, está es: *Vanilla planifolia* (formalmente conocida como *Vanilla fragrans*). Es una planta robusta, enredadera trepadora que produce una sola hoja de cerca de 12 cm de largo en cada nodo junto con las raíces que se afianzan tenazmente a la corteza del árbol anfitrión, en cultivo, en el enrejado. La enredadera puede medir hasta 20 mm de diámetro.

Vanilla planifolia viene en dos variedades – la plana y la forma variegada. La planta usualmente no florece hasta que tiene 3 metros de largo y puede alcanzar los 20 metros de largo y más.



Vanilla planifolia

Las flores son pequeñas como lirios de color amarillo verdoso, mide alrededor de 40 x 60 mm. y aparecen en racimos axilares. Usualmente un racimo tiene unas 20 flores pero se sabe que han producido más. Usualmente abre solo una flor al día, la floración completa dura aproximadamente 24 días.

La flor tiene tres sépalos y tres pétalos, uno de los pétalos está alargado y forma un labio en forma de trompeta, y una columna que contiene en una unidad estámen y pistilo. La antera está en el ápice de la columna y cuelga sobre el estigma, pero una lengüeta o rostelum los separa. La flor abre en la mañana y se cierra al atardecer y ya no vuelve a abrirse. Si no es polinizada, se deshojará al día siguiente. El tiempo óptimo para la polinización es a mediodía. La flor es autofértil, pero es incapaz de auto polinizarse sin la ayuda de un agente externo que transfiera el polen de la antera al estigma o de levantar el rostelum, y entonces presionar la antera contra el estigma.



Vanilla planifolia

La cápsula se desarrolla en un periodo de 8-9 meses y alcanza un tamaño de 200 mm de largo. La cápsula es de color verde, regordeta y aún inmadura. En este estado aún no tiene ningún aroma. Una buena enredadera puede producir 100 vainas por año.

3. Materiales y Métodos

Los materiales a utilizarse para la elaboración del medio de cultivo son los siguientes: agua, sales minerales, azúcar, vitaminas, hormonas vegetales. agar o gelatina. Estos materiales son los que mezclados y esterilizados se colocaron en un frasco de vidrio con tapa metálica y podrán ser utilizados para la propagación.

Los materiales y equipos de laboratorio necesarios para que el proceso sea eficaz son: cámara de flujo laminar, mechero de bunsen, alcohol al 95%, cloro, pinzas, y bisturí.

El método a utilizarse para la elaboración del medio de cultivo se basó en el estudio de los requerimientos de las plantas que se van a reproducir, por lo tanto se necesita saber cuales son las necesidades nutricionales para proveerlas de todo lo que ellas necesiten.

Las especies seleccionadas para reproducción fueron: Cattleya, Phragmipedium, Masdevalia y Maxillaria. Estas especies han sido escogidas debido a su valor comercial, particularidades relacionadas a la flor, y riesgos en cuanto a conservación se refiere.

3.1 Materiales

Los materiales utilizados fueron reactivos químicos comunes, soluciones caseras y pulpa de fruta. Estos fueron: agua, sales minerales, azúcar, vitaminas, y en algunos casos hormonas vegetales. Además se adicionó agar el cual dará consistencia al medio (antiguamente se usaba gelatina).

Adicionar levadura fue útil ya que esta brinda nutrientes inusuales provechosos para la germinación, como puede ser nitrógeno en forma de aminoácidos, oligopéptidos, oligoelementos y cofactores.

Otra solución provechosa fue la leche de coco verde la cual debe ser filtrada en un filtro normal de café para evitar objetos sólidos perjudiciales para el medio.

La papilla de banana muy bien triturada a razón de media banana por litro y jugo de piña natural filtrado brindaron nutrientes esenciales para el desarrollo de las semillas.

3.1.1 Reactivos Utilizados

Los reactivos utilizados en el medio en su mayoría fueron 80% orgánicos y se los puede obtener en cualquier supermercado.

Se elaboro cuatro medios de distintas características los cuales tuvieron nutrientes diferentes. Se escogió frutas que posean macronutrientes necesarios para la germinación como: Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio, presentes en la mayoría de los frutos escogidos. Además se seleccionó aquellas frutas que posean más carga de micronutrientes como fue el caso del aguacate, banana, papaya y choclo, los cuales proveyeron: Hierro, Zinc, Manganeseo, Cobre y Cloro.

3.1.2 Medios elaborados

El medio base fue 10 gr. de agar-agar al mismo que se adicionaron los diferentes nutrientes.

Medio # 1:

- 10 g de agar-agar
- 100 g de banano orito
- 100 g de papaya
- 150 g de tomate riñón
- 100 g de choclo
- 250 ml de agua de coco

- 100 g de puré de papa
- 100 g de aguacate
- 50 g de carbón vegetal
- 10 g de ajo
- 10 g de cebolla paiteña picada y machacada
- 5 ml de propoleo

Medio # 2:

- 10 g de agar-agar
- 100 g de plátano maduro hecho puré o licuado
- 15 g de azúcar
- 1.2 g Tiamina
- 900 ml de agua destilada

Medio # 3:

- 10 g de agar-agar
- 250 g de tomate riñón
- 15 g de azúcar
- 1.2 g Tiamina
- 900 ml de agua destilada

Medio # 4:

- 10 g de agar-agar
- 100 g de banano de seda
- 100 g de papaya
- 150 g de tomate riñón
- 50 g de carbón vegetal
- 10 ml de propoleo
- 250 ml de agua de coco
- 100 g de aguacate

Los nutrientes que posee cada uno de los ingredientes de los medios de cultivos son:

NUTRIENTES DEL BANANO.

(POR 100 GRAMOS)

POTASIO (mg)	400
VITAMINA C (mg)	11
MAGNESIO (mg)	34
COBRE (mg)	0.1
FOLATOS (mcg)	14
VITAMINA B6 (mg)	0.3

**NUTRIENTES DEL TOMATE
RIÑÓN.**

(POR 100 GRAMOS)

CALCIO (mg)	7
HIERRO (mg)	0,5
FOSFORO (mg)	27
VITAMINA A (ui)	1700
VITAMINA B (mg)	0,1
VITAMINA C (mg)	26,7

NUTRIENTES DEL AGUACATE.**(POR 100 GRAMOS)**

SODIO (mg)	4
POTASIO (mg)	320
CALCIO (mg)	8
MAGNESIO (mg)	18
FÓSFORO (mg)	28
HIERRO (mg)	0.3
COBRE (mg)	0.13
ZINC (mg)	0.3
VITAMINA A (mg)	19
VITAMINA C (mg)	4
VITAMINA E (TOCOFEROLES) (mg)	2.27
VITAMINA K (mg)	0.1
TIAMINA (mg)	0.07
RIBOFLAVINA (mg)	0.13
NIACINA (mg)	1
VITAMINA B6 (mg)	0.33

NUTRIENTES DE LA PAPAYA.**(POR 100 GRAMOS)**

POTASIO (mg)	211
VITAMINA C (mg)	11
MAGNESIO (mg)	8
PROVITAMINA A (mcg)	97.5
ACIDO FÓLICO (mcg)	1

NUTRIENTES DE CHOCLO.**(POR 100 GRAMOS)**

CALCIO, CA (mg)	2
HIERRO, FE (mg)	0,61
MAGNESIO, MG (mg)	32
FÓSFORO, P (mg)	103
POTASIO, K (mg)	249
SODIO, NA (mg)	17
ZINC, ZN (mg)	0,48
COBRE, CU (mg)	0,053
MANGANESO, MN (mg)	0,194
VITAMINA A, IU (mg)	217
VITAMINA A, RE (ui)	22
VITAMINA E (mg)	0,09
VITAMINA C (mg)	6,2
TIAMINA (mg)	0,215
RIBOFLAVINA (mg)	0,072
NIACINA (mg)	1,614
ACIDO PANTOTÉNICO (mg)	0,878
VITAMINA B-6 (mg)	0,06
FOLATO (mcg)	46,4

NUTRIENTES DEL AGUA DE COCO.**(POR 100 GRAMOS)**

SODIO (mg)	25
POTASIO (mg)	160
COLORO (mg)	20
CALCIO (g)	5
FÓSFORO (mg)	0.4
MAGNESIO (mg)	0.45

NUTRIENTES DEL PURE DE PAPA.	
(POR 100 GRAMOS)	
SODIO (mg)	11.24
CALCIO (mg)	38.34
HIERRO (mg)	11.00

El ajo, la cebolla y el propóleo tienen características que se utilizan para evitar la contaminación de los frascos, por lo cual están incluidos en el medio para que este no se contamine.

El agua de coco es importante debido a que en estudios anteriores realizados por Joseph Arditti en su libro *Micropropagation of Orchids* (1993), ratifica que es beneficiosa para la formación de protocormos además de aportar varios nutrientes.

Los reactivos utilizados fueron escogidos debido a sus nutrientes y propiedades nutritivas que pueden aportar al medio.

3.2 Métodos

Se midió cada uno de los reactivos en una balanza de precisión. Luego de tener la cantidad exacta de cada reactivo se mezclaron todos, y disolvieron en agua, sea de coco o agua destilada, dependiendo del medio, Este medio se colocó en una olla para calentarlo hasta llegar a punto de ebullición.

El medio obtenido se colocó en frascos de vidrio limpios hasta alcanzar un volumen aproximado de un cuarto de frasco. Se depositaron las semillas y se sellaron los frascos con tapas de metal las mismas que fueron perforadas para permitir la aireación. Estos orificios tuvieron papel filtro para evitar el ingreso de bacterias y esporas que puedan afectar al medio.

3.2.1 Esterilización

La esterilización es la base de la propagación in vitro. Todos los equipos y herramientas se lavaron y esterilizaron así como los frascos que contienen el medio de cultivo. Cuando los medios se envasaron se colocaron en autoclave para esterilizarlos y eliminar cualquier tipo de agentes contaminantes.

Se introdujeron los frascos con una décima parte de agua en autoclave, por aproximadamente 20 minutos a 135 grados Celsius. Inmediatamente de ese período de tiempo la temperatura se redujo a la mitad y se mantuvo por otros 20 minutos.

Una vez enfriado el medio por una hora, este tuvo la consistencia adecuada para proceder a la siembra. Previo a la siembra se prendió la cámara de flujo laminar por 30 minutos con el fin de eliminar cualquier tipo de contaminante que pueda haber quedado dentro de la cámara. Posteriormente y para mayor seguridad se desinfectó con alcohol para introducir todos los implementos necesarios previamente esterilizados.

3.2.2 Propagación

Para empezar con la propagación propiamente dicha se desinfectaron las semillas. Dependiendo del tamaño de las cápsulas estas se introdujeron en una solución de cloro y agua destilada por varios minutos, siendo las más grandes las que más tiempo necesitan; en promedio, una cápsula de tamaño regular necesita ser sumergida por 25 minutos.

Luego del tiempo indicado se colocaron las cápsulas dentro de la cámara y se procedió a abrirlas para depositar las semillas dentro de los frascos que contienen el medio de cultivo. Las cápsulas se abrieron cuidadosamente con un bisturí quirúrgico, herramienta previamente esterilizada que sirvió para

pasar las semillas de la cápsula al frasco, no se recomienda cambiar de herramienta para evitar contaminar las semillas.

Una vez sembradas las semillas se sellaron muy bien los frascos, se colocaron en un lugar con temperatura y luz adecuada, 20 grados Celsius, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Las semillas se distribuyeron de la siguiente manera:

Especies de Orquídea	Medio de cultivo # 1	Medio de cultivo # 2	Medio de cultivo # 3	Medio de cultivo # 4
<i>Cattleya máxima</i>	4	4	4	4
<i>Phragmipedium besseae</i>	4	4	4	4
<i>Masdevallia coccinea</i>	4	4	4	4
<i>Maxillaria grandiflora</i>	4	4	4	4
Total Frascos	16	16	16	16

En cada frasco se depositó la misma cantidad de semilla, para que las condiciones de crecimiento fueran similares. Cada uno de ellos contuvo aproximadamente 0.01 mg de semilla (la semilla es tan pequeña que parece

polvo), lo que representa aproximadamente a un cuarto de una cuchara de café.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

La propagación inició el día 10 de octubre del 2007, el proceso de observación duro 120 días y finalizó el 6 de febrero del 2008.

Los primeros días se chequeó la posible presencia de algún tipo de contaminación en los frascos. Los cinco primeros días no se observó contaminación alguna en ninguno de los frascos. Sin embargo en los frascos testigo de *Cattleya* (dos del medio de cultivo número uno y dos del medio de cultivo número tres) que no recibieron esterilización alguna mostraron contaminación a partir del sexto día, determinando de esta manera que la esterilización o autoclavado elimina efectivamente los posible contaminantes.

Luego de 10 días de la siembra no se observó contaminación alguna en los frascos restantes lo cual nos indicó que los medios se mantuvieron libres de contaminación, manteniéndose así hasta el final del ensayo.

Medio de Cultivo # 1:

Cattleya máxima:

Total de frascos: 4.

Trascurridos 34 días de la siembra se notó cambios en el medio de cultivo # 1 con la especie *Cattleya Máxima*, las semillas cambiaron de color, de un amarillo pálido a un amarillo verdusco, color que fue asentándose con el paso de los días. A los 67 días las semillas se encontraban muy hinchadas y de color verde. Se comenzó a distinguir los primeros protocormos lo que nos indica que este medio es adecuado para reproducir *Cattleya Máxima*. A los

110 días los protocormos estaban más grandes observándose las primeras raíces en forma de pelos muy pequeños y de color blanco.

Phragmipedium besseae:

Total de frascos: 4.

Trascurridos 41 días de la siembra, no se notó cambio alguno en los frascos, las semillas siguieron de la misma manera. Al día 48 se observó un cambio de color en las semillas así como un ligero aumento de tamaño. Al día 73 éstas se encontraban casi completamente verdes y redondas, a los 117 días aparecieron las primeras raíces de color blanco.

Masdevallia coccinea:

Total frascos: 4.

El medio de cultivo no mostró ningún tipo de cambio luego de 20 días de sembrado. Al día 35 las semillas comienzan a tomar un color marrón. Al día 90 no se aprecia cambio alguno. Finalizada la observación sin ningún cambio posterior.

No hubo germinación.

Maxillaria grandiflora:

Total frascos: 4

Al cabo de 45 días de la siembra las semillas estuvieron poco hinchadas y el color verde ha variado muy poco. En el día 70 los protocormos comenzaron a formarse, encontrándose bastante hinchados.

Al día 113 se observaron las primeras raíces blancas siendo su desarrollo el adecuado.

Cambios en Medio de Cultivo # 1				
Días	<i>Cattleya máxima</i>	<i>Phragmipedium besseae</i>	<i>Masdevallia coccinea</i>	<i>Maxillaria grandiflora</i>
1	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
30	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
34	Cambios color semilla	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
35			No existen Cambios	
40	La semilla se encuentra de color verde		No existen Cambios	
45				Cambios color semilla
48		Cambios color semilla	No existen Cambios	
50			No existen Cambios	
55	Semilla muy hinchada	La semilla se encuentra de color verde	No existen Cambios	La semilla se encuentra de color verde
60			No existen Cambios	
65			No existen Cambios	
67	Formación de protocormos		No existen Cambios	Semilla muy hinchada
70		Semilla muy hinchada	No existen Cambios	Formación de protocormos
73		Formación de protocormos	No existen Cambios	
75				
80				
85				
90				
95				
100	Protocormos muy bien formados		No existen Cambios	Protocormos muy bien formados
105		Protocormos muy bien formados	No existen Cambios	
106			No existen Cambios	
107			No existen Cambios	
108			No existen Cambios	
109			No existen Cambios	
110	Primeras raíces blancas		No existen Cambios	
111				
112				
113				Primeras raíces blancas
114				
115			No existen Cambios	
116				
117		Primeras raíces blancas		
118	Raíces definidas			
119				
120			No existen Cambios	

Medio de Cultivo # 2:***Cattleya máxima:***

Total frascos: 4.

A partir del día 58 las semillas comenzaron a hincharse y a cambiar de color. Al día 85 las semillas comenzaron a formar protocormos, de un color verde muy claro. En el día 108 de la siembra, empezó a formarse las primeras raíces de color blanco, sin embargo a los 112 y 113 días éstas se volvieron de color café en tanto que a los 120 días no existía rastro de nuevas raíces.

Phragmipedium besseae:

Total frascos: 4.

Al día 20 no se evidenció cambio alguno. Lo mismo ocurre con los días 60, 90, y 120.

Masdevallia coccinea:

Total frascos: 4.

Durante 120 días no se observó cambio alguno.

Maxillaria grandiflora:

Total frascos: 4

No se observa ningún tipo de cambio en el medio durante todo el proceso.

Cambios en Medio de Cultivo # 2				
Días	<i>Cattleya máxima</i>	<i>Phragmipedium besseae</i>	<i>Masdevallia coccinea</i>	<i>Maxillaria grandiflora</i>
1	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
10	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
58	Cambios color semilla	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
85	Formación de protocormos	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
108	Primeras raíces	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
113	Raíces se toman café	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
120	Raíces café, no hay raíces nuevas	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios

Medio de Cultivo # 3:***Cattleya máxima:***

Total frascos: 4.

Los primeros 60 días no tuvieron cambio alguno. A partir del día 67 se observó un color característico en tanto que a partir del día 80 se pudo observar la formación de protocormos. A los 110 días se observaron raíces manteniéndose así hasta el día 120.

Phragmipedium besseae:

Total frascos: 4.

Durante los 120 días de observación no se encontró ningún vestigio de cambio dentro de los 4 frascos con medio de cultivo.

Masdevallia coccinea:

Total frascos: 4.

No se observa cambio alguno durante los 120 días de observación.

Maxillaria grandiflora:

Total frascos: 4.

A partir del día 90 existió un cambio en el color de las semillas y al día 100 éstas estuvieron más verdes. En el día 110 se apreció una aparente formación de protocormos lo cual no cambio significativamente hasta el día 120 observándose mejor una decoloración de las semillas de verde claro a café en algunos lugares.

Cambios en Medio de Cultivo # 3				
Días	<i>Cattleya máxima</i>	<i>Phragmipedium besseae</i>	<i>Masdevallia coccinea</i>	<i>Maxillaria grandiflora</i>
1	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
60	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
67	Cambios color semilla	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
80	Formación de protocormos	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
90				Cambios color semilla
100		No existen Cambios	No existen Cambios	Semilla más verde
110	Primeras raíces	No existen Cambios	No existen Cambios	Formación de protocormos
120		No existen Cambios	No existen Cambios	Decoloración de la semilla

Medio de Cultivo # 4:***Cattleya máxima:***

Total frascos: 4.

Los primeros 30 días no hubo modificación alguna, al día 38 se observó cambio de color de las semillas lo cual continuó hasta el día 70 en el cual ya se pudo observar la formación completa de protocormos. A partir del día 118 se observaron las primeras raicillas blancas, por lo que al cumplir los 120 días las raíces se encontraron muy bien formadas.

Phragmipedium besseae:

Total frascos: 4.

Al día 45 se observó el primer cambio de color de las semillas las cuales formaron protocormos a partir del día 73. En el día 119 se observó las primeras raíces blancas muy pequeñas.

Masdevallia coccinea:

Total frascos: 4.

A partir del día 94 se observó un ligero cambio de coloración en las semillas pero no hubo ningún indicio de que las semillas germinen. Al cumplir los 120 las semillas están más verdes en comparación con las semillas de el resto de medios de cultivo desarrollados, sin embargo no se evidenció germinación alguna.

Maxillaria grandiflora:

Total frascos: 4.

Los cambios en el medio de cultivo se hicieron considerables al cumplir los 40 días. Cuando las semillas cambiaron de color a los 72 días, existía una formación considerable de protocormos, los cuales comenzaron a emitir raíces a partir del día 115 y siguió de esta forma hasta cumplir los 120 días.

Cambios en Medio de Cultivo # 4				
Días	<i>Cattleya máxima</i>	<i>Phragmipedium nesseae</i>	<i>Masdevallia coccinea</i>	<i>Maxillaria grandiflora</i>
1	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
30	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
35	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
38	Cambios color semilla	No existen Cambios	No existen Cambios	No existen Cambios
40		No existen Cambios	No existen Cambios	Cambios color semilla
45		Cambios color semilla		
50			No existen Cambios	
55			No existen Cambios	
60			No existen Cambios	
65			No existen Cambios	
70	Formación de protocormos		No existen Cambios	
72			No existen Cambios	Formación de protocormos
73		Formación de protocormos	No existen Cambios	
80				
90				
94			Ligero cambio de coloración de las semillas	
95				
100				
101				
102				
103	Se mantienen los protocormos	Se mantienen los protocormos	Se mantiene la coloración	Se mantienen los protocormos
104				
105				
106				
107				
108				
109				
110	Se mantienen los protocormos	Se mantienen los protocormos	Se mantiene la coloración	Se mantienen los protocormos
111				
112				
113				
114				
115				Primeras raíces
116				
117			Semillas ligeramente verdes	
118	Primeras raíces			
119		Primeras raíces		
120	Raíces bien formadas	Se mantienen las raíces	No existen geminación	Se mantienen las raíces

4.1 Medios de cultivo utilizados

Los medios de cultivo utilizados no lograron reproducir las 4 especies propuestas, sin embargo se logró eficazmente reproducir 3 de ellas. Existen variantes que pueden determinar cuáles fueron las causas por las cuales no germinaron las semillas en algunos medios de cultivo, que pueden estar ligados a la calidad de la semilla, estado de madurez de esta, así como también a la falta de nutrientes necesarios y específicos para cada especie.

En cuanto a la madurez de la semilla no existe información 100% confiable en el campo, debido a la gran cantidad de especies existentes y sus características singulares. La información obtenida nos indica que las semillas se encuentran listas cuando el fruto está a punto de abrirse, lo cual complica el procedimiento propuesto realizado ya que al abrirse el fruto las semillas podrían contaminarse y contaminar el medio de cultivo.

El medio de cultivo más adecuado obtenido fue el número # 1 ya que este medio tuvo los tiempos de propagación más cortos y logró que tres de las cuatro especies propagadas germinen de manera exitosa.

El medio # 2 logró propagar de manera deficiente una especie de las cuatro propuestas, lo cual nos demuestra que posiblemente se debió a la falta de nutrientes presentes en comparación con el medio # 1, puesto que este medio tenía menos elementos nutritivos; por lo tanto este era un medio de cultivo más simple.

El medio # 3 fue muy parecido al # 2 ya que únicamente logró propagar la misma especie de orquídea, debido seguramente a que estos dos medios son muy parecidos, muy simples y solamente pudieron propagar especies que germinan fácilmente como es el caso de *Cattleya*.

Además el inconveniente observado en estos medios de cultivo fue su lentitud en la propagación de *Cattleya máxima* en comparación con el medio de propagación # 1. En cambio el medio de cultivo # 4 tuvo buenos resultados, pues logró propagar 3 de las 4 especies en estudio y lo realizó además en tiempo muy similar al del medio # 1. Podemos entonces determinar que los medio # 1 y # 4 son adecuados para reproducir especies como *Cattleya*, *Phragmipedium* y *Maxillaria*, sin embargo hay especies complicadas de reproducir como *Masdevalia*. Esto nos indica que esta especie es muy escogedora en cuanto a sus nutrientes, lo cual explica el por qué no se logró reproducirla.

4.2 Tiempos de germinación de las especies

Debido a que los medios de cultivo # 2 y # 3 no lograron reproducir adecuadamente las especies, se analizó únicamente los medios de cultivo # 1 y # 4 para determinar los tiempos de germinación.

Para esto se tomó en cuenta el día de propagación que en este caso fue el día de inicio, y el día en que los protocormos estuvieron formados, observándose las primeras raicillas blancas. Demostrando con esto que las especies estuvieron listas para ser trasplantadas a un medio de cultivo de crecimiento. Cabe recalcar entonces que el cultivo de crecimiento difiere del cultivo de germinación en cuanto a reactivos y nutrientes presentes en el medio.

En *Cattleya máxima* se obtuvo los siguientes datos:

Cultivo # 1

Día de propagación:	10 de octubre 2007
Día de trasplante a medio de crecimiento:	28 de enero del 2008
Total días:	110

Cultivo # 4

Día de propagación:	10 de octubre 2007
Día de trasplante a medio de crecimiento:	5 de febrero del 2008
Total días:	118

En *Phragmipedium besseae* se obtuvo los siguientes datos:

Cultivo # 1

Día de propagación:	10 de octubre 2007
Día de trasplante a medio de crecimiento:	4 de febrero del 2008
Total días:	117

Cultivo # 4

Día de propagación:	10 de octubre 2007
Día de trasplante a medio de crecimiento:	6 de febrero del 2008
Total días:	119

En *Maxillaria grandiflora* se obtuvo los siguientes datos:

Cultivo # 1

Día de propagación:	10 de octubre 2007
Día de trasplante a medio de crecimiento:	31 de enero del 2008
Total días:	113

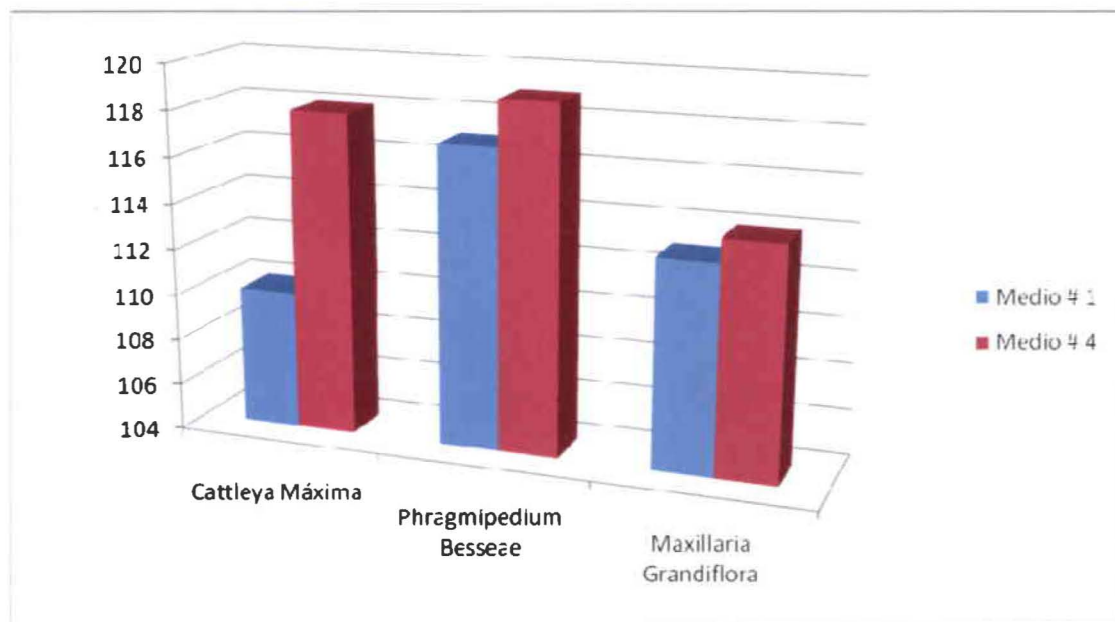
Cultivo # 4

Día de propagación:	10 de octubre 2007
Día de trasplante a medio de crecimiento:	1 de febrero del 2008
Total días:	114

Podemos determinar que el medio de cultivo # 1 es el medio más rápido en cuanto a germinación ya que en *Cattleya máxima* se tuvo un tiempo total de 110 días, ocho días menos que con el medio # 4.

En *Phragmipedium besseae* se tuvo un tiempo total de 117 días, 2 días menos que con el medio # 4 y en *Maxillaria grandiflora* 113 días, uno menos que con el medio # 4.

Tiempos de Germinación



5. Conclusiones

El medio de cultivo más adecuado de la presente investigación es el medio # 1 que está conformado por:

- 10 g de agar-agar
- 100 g de banano orito
- 100 g de papaya
- 150 g de tomate riñón
- 100 g de choclo

- 250 ml de agua de coco
- 100 g de puré de papa
- 100 g de aguacate
- 50 g de carbón vegetal
- 10 g de ajo
- 10 g de cebolla paiteña picada y machacada
- 5 ml de propoleo

Este medio de cultivo preparado no presentó ningún tipo de contaminación después de ser auto clavado, se pudo determinar que este proceso fue 100% efectivo gracias a la prueba testigo que se realizó, ya que los frascos que no recibieron la esterilización resultaron contaminados.

Se determinó que el medio de cultivo es efectivo para la reproducción de especies pero lamentablemente no para todas las que se seleccionó, De un total de cuatro especies a reproducir se logró propagar tres, los que nos da un porcentaje de efectividad del 75%.

La especie que se reprodujo con más facilidad y en menor tiempo de germinación fue *Cattleya máxima*, esta germinó en 110 días, y fue la que mostró un mejor desarrollo dentro del medio de cultivo. Podemos sacar algunas conclusiones de esto, como es el hecho de que la semilla de *Cattleya máxima* se encontraba en perfecto estado de desarrollo lo que permitió que esta germine con mucha facilidad, además podemos acotar que *Cattleya* no es una especie complicada de reproducir y que no presenta complicaciones en su propagación.

La especie que no germinó en ninguno de los medios propuestos fue *Masdevallia coccinea* puesto que no presentó ningún tipo de cambio durante los 120 días de observación, esta especie demostró ser complicada de reproducir no germinando con facilidad ni en medios de cultivo comerciales;

esto se debe a que la especie es escogedora en cuanto a nutrientes lo cual complicó su reproducción en los medios orgánicos desarrollados.

Las especies *Phragmipedium besseae* y *Maxillaria grandiflora* tuvieron un buen desempeño en el medio de cultivo, lograron germinar en un total de 117 y 113 días respectivamente lo que nos indica que estas especies se pueden propagar sin ningún tipo de inconveniente en este medio al igual que la especie *Cattleya máxima*.

El inconveniente más grande que tuvo este proyecto fue la dificultad de obtener la semilla para reproducir las especies indicadas debido a que los lugares especializados en orquídeas únicamente tienen plantas en flor, lo cual no sirve para reproducción ya que para que se forme la cápsula donde se encuentran las semillas es necesario polinizar artificialmente la flor ya sea con su mismo polen o con el de otra planta de la misma especie. Al producirse la polinización la flor se marchita y comienza el proceso de formación de la cápsula. Por esta razón es comprensible el por que las tiendas especializadas en orquídeas únicamente tienen las plantas en flor. Además, las orquídeas que se encuentran sin flor pasan a los invernaderos para su regeneración y posteriormente vuelvan a florecer y ser comercializadas. En el mercado jamás se comercializa semillas o capsulas.

Dependiendo de la especie el proceso de polinización puede demorar aproximadamente cuatro meses hasta que la semilla este viable.

Como conclusión final podemos decir que lamentablemente no se logró propagar el total de especies en estudio por lo cual el medio de cultivo no se lo puede llamar universal. Sería muy complicado elaborar un medio de cultivo de esta característica debido a que existen muchas especies de orquídeas muy exigentes en nutrientes específicos.

Sin embargo se consiguió determinar un medio de cultivo natural que logró reproducir especies que no son muy exigentes en nutrientes ni muy

complicadas de propagar. De tal manera que, mediante este medio de cultivo obtenido, se podrá repoblar muchas áreas en el país con especies que al momento se encuentran en peligro o amenazadas.

6. Recomendaciones

Para poder realizar un medio de cultivo universal se necesita utilizar reactivos y nutrientes específicos para cada especie. Al reunir todos estos nutrientes en un medio de cultivo con una concentración específica se logrará hacer germinar todas las especies, pero esto sería un trabajo sumamente laborioso, muy costoso y extenso debido a la cantidad de especies de orquídeas existentes.

Para propagar especies mediante un medio de cultivo, la clave es mantener todo en total esterilidad, tanto instrumentos como materiales ya que si se presentara contaminación esto repercutirá en el resultado final y por ende no existirá germinación alguna. Por lo tanto se debe mantener los parámetros de asepsia indicados en los laboratorios como son: el uso de mandil, lavarse las manos continuamente, usar guantes quirúrgicos y mantener el orden; son estos pequeños pasos que se deben seguir para que el resultado final sea óptimo.

7. Bibliografía

ARDITTI, J Micropropagation of Orchids, (Department of Developmental and Cell Biology, University of California) New York 1993

CAÑAS, B. M., Cultivo asimbiótico. In Vitro en Orchidaceae Rev UIS. 20(1): 35-44. 1991.

GERHARD WILDBRETT Limpieza y Desinfección 2000
JAMES M. JAY Microbiología Moderna 2002
www.microbiologia.com.ar.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. Amer, orchid, Soc. 15 : 214 - 217. 1946.

MURASHIGE, T, Y SKOOG, F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15:473-497. 1962.

PRITCHARD, H.W. (Ed.) 1989. Modern methods in orchid conservation: The role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press, Cambridge.

THOMPSON, P.A. 1980. *Orchids from seed*. HMSO, Londres

8. Anexos



Medio # 1 Sin Esterilizar Contaminado a los 6 días



Medio # 3 Sin Esterilizar Contaminado a los 6 días



Medio # 1 Sembrado Cattleya Máxima



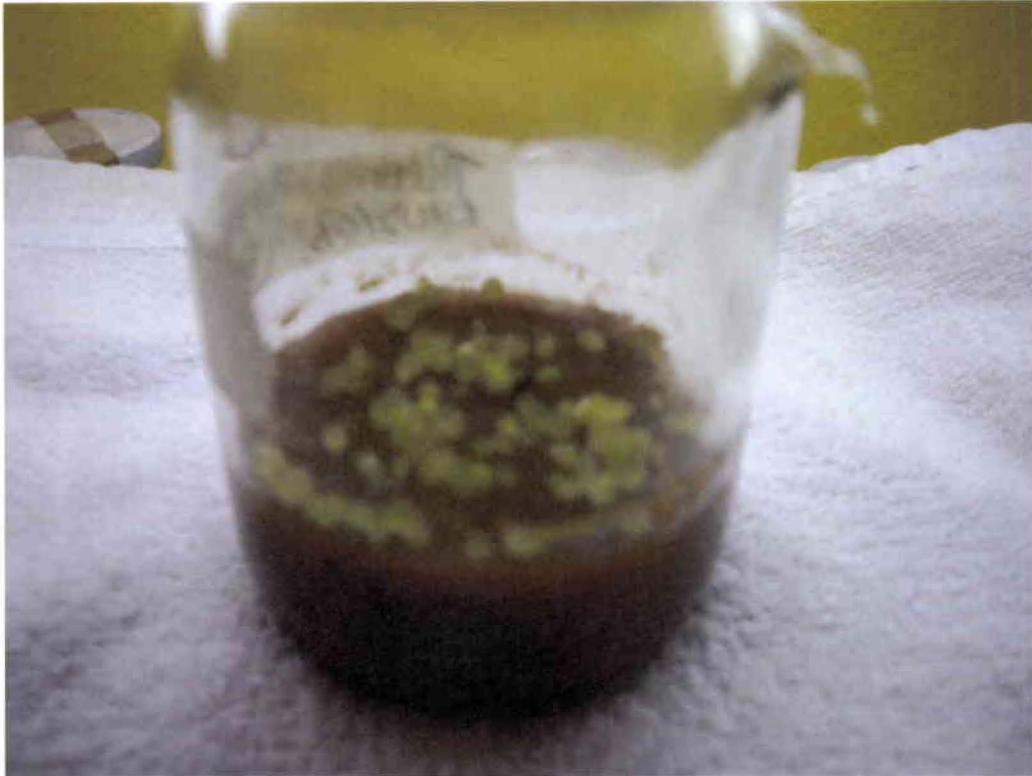
Medio # 2 Sembrado Cattleya Máxima



Medio # 3 Sembrado Cattleya Máxima



Medio # 4 Sembrado Cattleya Máxima



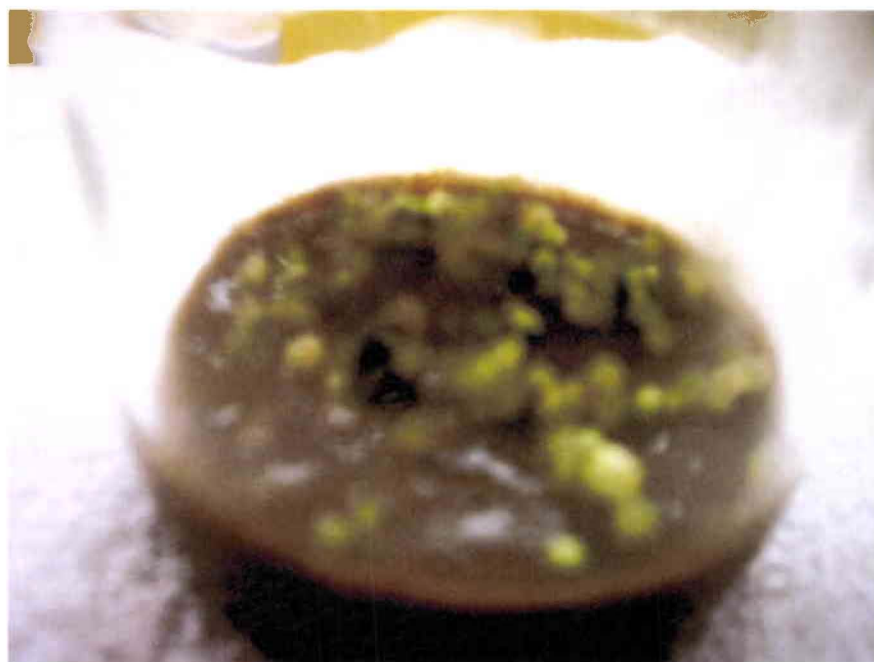
Medio # 1 Protocormos Cattleya Máxima



Medio # 2 Protocormos Cattleya Máxima



Medio # 3 Protocormos Cattleya Máxima



Medio # 4 Protocormos Cattleya Máxima