

Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquidea “*Cattleya nobile*”



“Flor símbolo de Concepción”



Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquidea
Cattleya nobile “Flor símbolo de Concepción”

**Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquidea
Cattleya nobile
“Flor símbolo de Concepción”**

Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquídea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”



Es una publicación de:

Centro para la Participación y el Desarrollo Humano Sostenible

CEPAD – Bolivia

Av. Cristo Redentor, pasando 7° anillo, Urb. Viru Viru / Av. Viru Viru, Esq. Calle 3, s/n

Telf.: (591-3) 3434192; 3434208

E-mail: cepad@cotas.com.bo; info@cepad.org

Web: www.cepad.org

Santa Cruz – Bolivia

Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquídea *Cattleya nobilior*
“Flor símbolo de Concepción”

Autores:

Coordinación del Proyecto y Edición: Rubens Barbery Knautd

Texto: Ingrid Morales Benavent

Diseño: Geovanna Terceros Terceros

Diagramación: Percy Revollo Duabyakosky

Fotografías: Ingrid Morales Benavent y CEPAD

Impresión: Editorial El País

Diciembre del 2011

Agradecimientos: Saira Soledad Duque Montero y Claus Gunnar Schlieff

Esta investigación cuenta con el apoyo de la Agencia Extremeña de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AEXCID), la Asociación para la Cooperación al Desarrollo en el Ambito Municipal (ACODAM) y el Centro Facundo Infante (CEFI).





Uniando esfuerzos para conservar la orquídea

La presente publicación tiene la intención de contribuir a un mayor conocimiento de técnicas que nos permitan aprovechar de forma sostenida un recurso natural de exuberante belleza como son las orquídeas. La inspiración de este manual responde a un proceso iniciado en el año 2000 en el Municipio de Concepción, ubicado en las Misiones Jesuíticas de Chiquitos, Bolivia, que se resume en tres objetivos estratégicos:

1. La Conservación de la Orquídea Nativa (en especial de la especie *Cattleya nobilior*) que debido a la depredación de los bosques se encuentra en peligro de extinción.
2. La posibilidad del aprovechamiento sostenible de un recurso natural renovable como instrumento generador de ingresos y de combate a la pobreza.
3. La generación de capacidades locales facilitando de forma didáctica el acceso a la información de técnicas que puedan multiplicar la propagación en mayor escala y que acelere el proceso de reproducción de la orquídea.



Hemos intentando, a través del trabajo desinteresado y la sistematización de la experiencia práctica de Ingrid Morales en la reproducción in vitro, aportar científicamente a compartir el conocimiento especializado de ese





mundo mágico y seductor de las orquídeas. Estamos convencidos de que el compromiso y el esfuerzo tenaz de muchos actores en el presente, harán que las futuras generaciones puedan seguir disfrutando de las maravillas que nuestra naturaleza ofrece.

Como CEPAD trabajamos bajo una metodología de territorios de referencia, mediante el cual las experiencias se transforman en realidades prácticas que desde su adaptabilidad, pueden ser aplicables a otros territorios. Esta apuesta por el desarrollo sostenible tiene al Municipio de Concepción como su referencia, donde esfuerzos institucionales e individuales del sector público, privado y de la cooperación internacional como la Cooperación de Extremadura, aportan la sinergia necesaria para que un proceso social sea apropiado como parte de la cultura local del ciudadano. Es en Concepción, donde el Festival de la Orquídea, como actividad que pone en valor sus recursos naturales y culturales, sirvió de catalizador de energías positivas y acciones concretas que lo llevaron a definirse a sí mismos como “Santuario de la Orquídea Boliviana”.

Desde el punto de vista técnico, el paso de calidad que intentamos dar con esta publicación es el de proveer de instrumentos a la población comprometida con el medio ambiente – y con la orquídea en particular – a multiplicar las posibilidades de repoblar lo depredado, contar con una fuente legal y sostenible de generación de ingresos, aumentar el potencial eco turístico al disminuir la presión sobre el recurso generador del producto turístico, entre otras potencialidades.

Para nosotros la publicación de este manual es una forma de devolución a todas y todos los que aportan con optimismo a demostrar que cada espacio territorial tiene su propia orquídea.

Rubens Barbery Knautt
Director de CEPAD





PERFIL DE LA AUTORA

Ingrid Morales Benavent

Es Licenciada en Ciencias Biológicas por la UAGRM, Santa Cruz, Bolivia. Docente Titular de las Carreras de Biología, Agronomía y Bioquímica en la U.A.G.R.M. Responsable del laboratorio de Biotecnología vegetal BIOFAN, en la carrera de Biología, con trabajos in vitro en especies agrícolas, forestales, ornamentales y principalmente en orquídeas.

Es Especialista en Cultivo de tejidos vegetales, Biotecnología Vegetal y Recursos Fitogenéticos por la Universidad Politécnica de Madrid y cursos de especialidad en el CIAT-Colombia, IDEA-Venezuela, Universidad de Reading- Inglaterra, CIFOR- España, INIA-Argentina, entre otros.

En la actualidad esta cursando el Doctorado en “Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y microorganismos asociados” por la Universidad Politécnica de Madrid, con la tesis “Aplicación de técnicas in vitro para la propagación de orquídeas endémicas y nativas de Bolivia”.





ÍNDICE

Uniando esfuerzos para conservar la orquídea.....	3
Perfil de la Autora.....	5

PARTE I: GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

I. Introducción.....	9
II. Morfología de las plantas de <i>Cattleya nobilior</i>	10
III. Polinización natural.....	12
IV. Polinización artificial.....	12
V. Como conservar semillas de orquídeas hasta su siembra.....	14

PARTE II: SIEMBRA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN EL LABORATORIO Y EN LA CASA

I. Siembra de semillas en medios de cultivo (cultivo <i>in vitro</i>).....	18
a. Cultivo de semillas de cápsula verde cerrada.....	18
b. Siembra de semillas maduras (capsulas abiertas).....	21
c. Método del sobre.....	21
d. Método de la jeringuilla.....	24
II. Preparación de medios de cultivo.....	26





III. Medios de cultivo y materiales necesarios para el cultivo de semillas.....	27
a. Medio Knudson C.....	27
b. Medios caseros.....	28
c. Medio del plátano.....	29
d. Medio del Tomate.....	29
e. Medio de Tomate con plátano.....	29
IV. Preparación del Medio de Cultivo en casa.....	30
V. Germinación de semillas de orquídeas.....	30
VI. Como cuidar los frascos durante el desarrollo de las plántulas <i>in vitro</i>.....	32
a. Traspaso a nuevos medios.....	32
b. Trasplante fuera del frasco en el invernadero.....	34
VII. Manejo de plantines en vivero.....	37
a. Sustrato.....	37
b. Temperatura.....	37
c. Iluminación.....	37
d. Humedad.....	37
e. Fertilización.....	37
f. Enfermedades.....	37
g. Plagas.....	38
VIII. Conservación y uso sostenible de la <i>Cattleya nobilior</i> y las orquídeas bolivianas.....	39

Bibliografía

Glosario





PARTE I
GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS



INTRODUCCIÓN



Oncidium stacyi



Cattleya nobilior



Maxillaria scorpoidea

Las orquídeas son plantas con flores que por su belleza y diversidad han fascinado a miles de personas en el mundo desde hace cientos de años.

Constituye una de las familias más jóvenes desde el punto de vista evolutivo: las orchidaceae.

El nombre de orquídeas deriva del griego “orchis” que significa testículo y se le dio este nombre por el parecido que tienen con estos los pseudobulbos de algunos géneros.

En el mundo existen alrededor de 1000 géneros y más de 35.000 especies de orquídeas. En Bolivia, existe en la actualidad 1.300 especies, sin embargo este número va en aumento ya que cada vez se descubren nuevas especies y hasta nuevos géneros. En países tropicales como Bolivia, las orquídeas pueden llegar a constituir el 10% de toda la flora total, dejando a un lado a todas las demás familias de plantas (Vásquez et al, 2003; Vásquez & Ibsch, 2004).

Estas bellas plantas se distribuyen en todo el mundo, la mayoría en regiones tropicales y subtropicales.

Pueden vivir ya sea sobre otras plantas, llamadas orquídeas epifitas, sobre rocas, orquídeas rupícolas o también en el suelo, las que se conocen como orquídeas terrestres.

Además de las miles de especies de orquídeas que existen en la naturaleza, existen orquídeas híbridas, es decir aquellas que se generan del cruzamiento de dos o más especies de orquídeas diferentes. Estos híbridos son producidos ya sea en forma natural en el campo por la acción de polinizadores o con la ayuda del hombre, que ha producido más de 100.000 híbridos de bellas y coloridas flores como los *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cattleyas* y otros.





II. Morfología de las plantas de *Cattleya nobilior*.

Basadas en su forma de crecimiento las plantas de orquídeas pueden ser monopodiales que tienen un tallo o eje principal y las simpodiales, como las *Cattleyas* que crecen a partir de varios ápices vegetativos dispuestos sobre un rizoma.

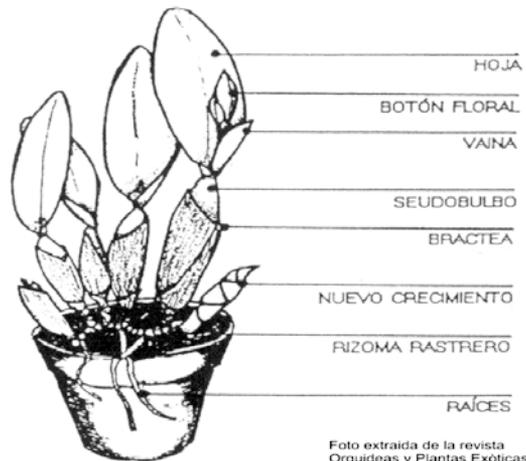


Foto extraída de la revista
Orquídeas y Plantas Exóticas

Crecimiento Simpodial



Las flores de las orquídeas son generalmente hermafroditas, con ambos sexos en la misma flor. Consta de 3 sépalos y 3 pétalos, estando uno de ellos o todos ellos modificados. La modificación del pétalo en forma de labio se conoce como “labelo”. Opuesto al labelo está la columna, que es la estructura reproductiva formada por la fusión de los órganos femeninos y masculinos.



Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquidea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”

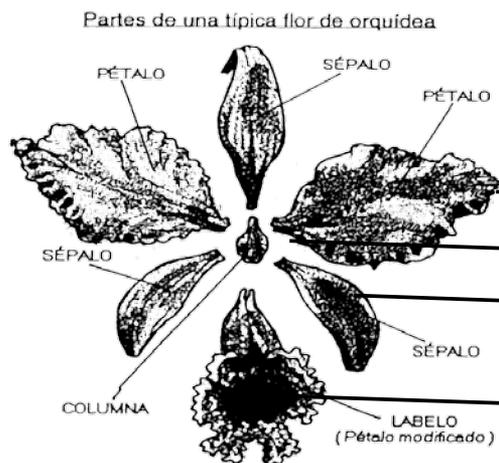
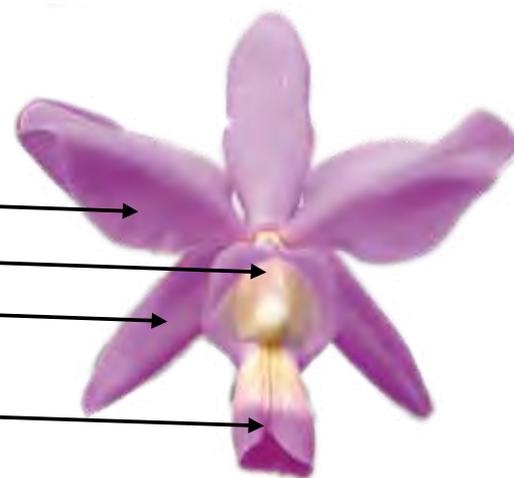
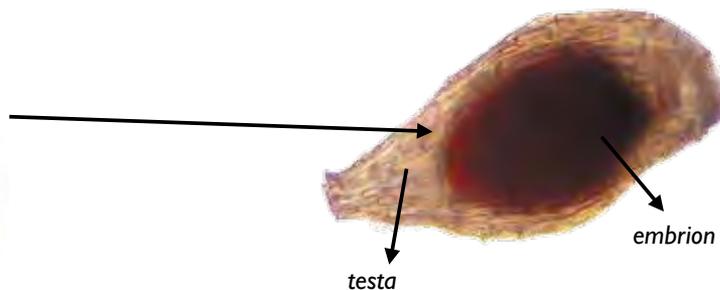


Foto extraída del libro GRIJALBO



Flor de *Cattleya nobilior*

Las semillas de *Cattleya nobilior* son muy pequeñas, teniendo millones y millones de ellas en cada capsula de la planta. Vista bajo un microscopio observamos que las semillas presentan una testa y un gran embrión en el centro, teniendo la semilla aproximadamente 0,80 mm de largo y 0,13 mm de ancho. Esta semilla si es sembrada en un medio de cultivo especial, originará una nueva planta.



Semillas de *C. nobilior* vista al microscopio con 10x aumento.





La reproducción de las orquídeas se realiza generalmente a través de diversos polinizadores (polinización natural) o con la ayuda del hombre (polinización asistida o artificial).

III. Polinización natural

La reproducción de las orquídeas está estrechamente ligada con la polinización que realizan generalmente moscas, avispas, abejas, mariposas, coleópteros y algunas aves. Esto se da en la naturaleza generalmente cuando el polinizador visita una flor y roza con la antera y lleva el polen junto con el polinio hasta el estigma de otra flor.

Esto es frecuente en las orquídeas ya que el polen no es dispersado por el viento y necesita que alguien lo transporte hacia otra orquídea. Los polinizadores son atraídos por los colores, formas y olores tan diversos de estas bellas plantas.



IV. Polinización artificial

La polinización artificial es realizada por el ser humano y se utiliza mucho en programas de mejoramiento o cuando se

desea crear nuevos híbridos de orquídeas. También se utiliza con la finalidad de apresurar el proceso de reproducción. Por lo tanto se pueden polinizar las orquídeas entre la misma especie, el mismo género o entre especies y géneros diferentes.

Antes de empezar a polinizar una flor de orquídea, es necesario familiarizarse con la flor y revisar donde se encuentran sus órganos reproductivos, es decir la antera y el estigma. En flores muy pequeñas es necesario utilizar una lupa para reconocerlos.

Pasos para realizar la polinización artificial (Seaton & Ramsay,2009):

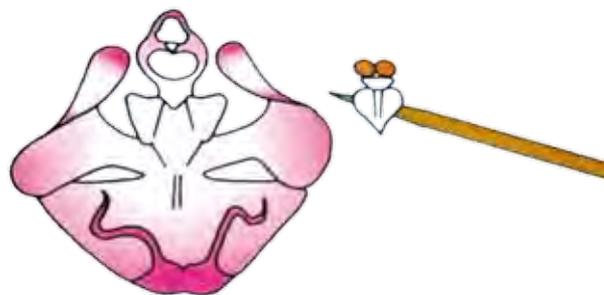
1. Utilizar suficiente polen que se encuentra en los polinios de las anteras, son fáciles de reconocer por el color amarillo que presentan.



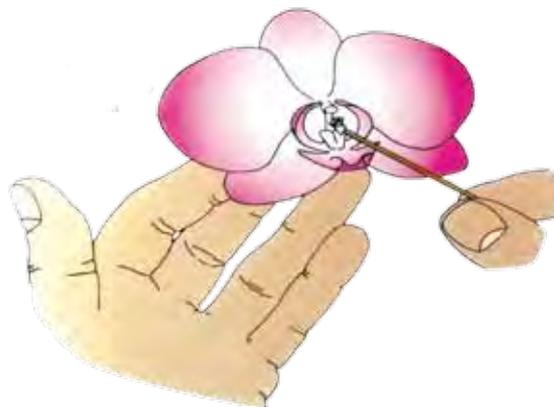


Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquidea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”

2. El polen debe ser transferido (generalmente con la ayuda de implementos estériles como pinzas o mondadientes nuevos) al ovario que se encuentra en el estigma de la flor.



3. Hay que asegurarse de que el polen que se transfirió haya quedado dentro del estigma de la flor para que la polinización sea un éxito.



4. Etiquetar la flor polinizada con estos datos y con la fecha de polinización.

5. La planta donadora de polen será la planta padre y la planta madre la que ha sido polinizada.





V. Como conservar semillas de orquídeas hasta su siembra

La mejor manera de conservar las semillas para la siembra en los medios de cultivo, es que se mantengan protegidas dentro de la cápsula de la planta. Por la tanto si logramos obtener la cápsula antes que se abra, podremos realizar la desinfección de la misma antes de la siembra y las semillas se mantendrán estériles en su interior.



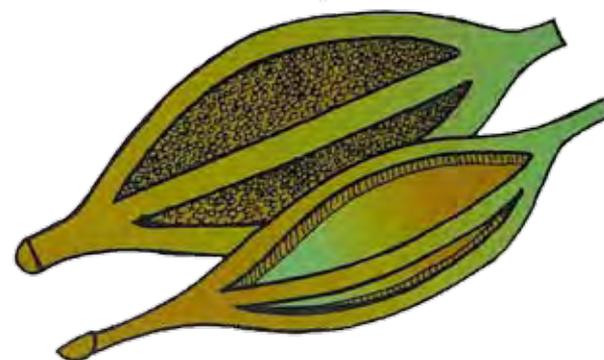
En caso de que las cápsulas ya estén muy maduras y hayan empezado a abrirse, es mejor terminar de abrir la cápsula y retirar las semillas en un papel. Se debe tener mucho cuidado ya que las semillas son muy pequeñas y al retirarlas pueden dispersarse fácilmente.



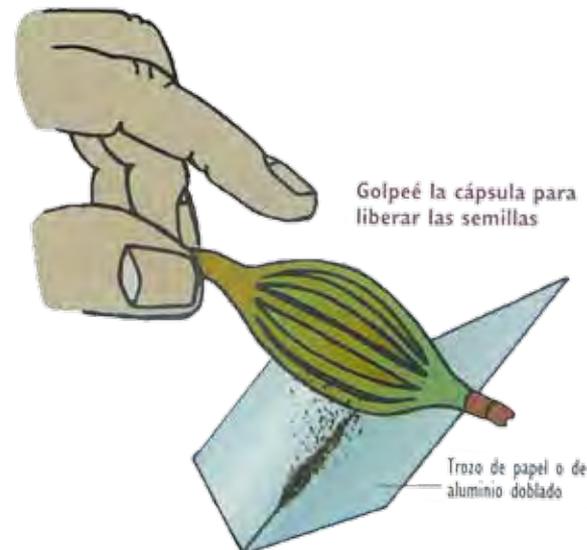
1. Se deben retirar todas las semillas



2. Limpiarlas de restos de cápsulas o flor y colocarlas en una bolsa de papel y nunca en bolsas plásticas ya que pueden humedecerse y contaminarse.



Cápsula cortada longitudinalmente



Golpeé la cápsula para liberar las semillas

Trozo de papel o de aluminio doblado



3. Las semillas en bolsas de papel bien cerradas y con el nombre de planta de la orquídea o el nombre de los padres en caso de ser una planta híbrida.



4. Es posible guardarlas en el refrigerador por unos días, o también para conservación en bancos de semillas.



PARTE II
SIEMBRA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN
EL LABORATORIO Y EN LA CASA



I. Siembra de semillas en medios de cultivo (cultivo in vitro).

Las técnicas de cultivo *in vitro* son una importante herramienta para poder hacer germinar las semillas de nuestras orquídeas o de aquellas que hemos polinizado para la obtención de cápsulas.

Las semillas de orquídeas no pueden germinar en un sustrato común o un invernadero debido a que no poseen endosperma que les de nutrientes al embrión para su germinación. Por ello las semillas de orquídeas en la naturaleza se asocian a un hongo (micorriza) para que le proporcione nutrientes y pueda germinar.

Las técnicas *in vitro*, hacen el trabajo del hongo y le proporcionan nutrientes a través de un medio de cultivo con sales minerales, vitamina, sacarosa y reguladores de crecimiento. Este medio debe estar estéril para evitar la contaminación y el crecimiento de microorganismos no deseados.

Para realizar los trabajos *in vitro*, debemos cosechar las cápsulas de las plantas de orquídeas y conservarlas de forma correcta para evitar que se dañen, sufran pudriciones o se abran y las semillas se dispersen, como lo comentamos anteriormente.

Existen varios métodos para hacer germinar las semillas de orquídeas en el laboratorio o en casa. La selección

de alguno de ellos va a depender si tenemos las cápsulas cerradas o abiertas.

En caso de tener las cápsulas verdes cerradas, la metodología es más sencilla, mientras que cuando tenemos las semillas ya fuera de la cápsula se debe realizar una serie de pasos para su desinfección y posterior siembra en los medios de cultivo.

a) Cultivo de semillas de cápsula verde cerrada:

La experiencia en el cultivo de semillas de orquídeas nos demuestra que estas pueden germinar en los medios de cultivo cuando aún no se han desarrollado totalmente y se encuentran inmaduras, es decir, cuando la capsula aun no se ha abierto y está empezando a madurar.

Para poder cultivar las semillas en los medio de cultivo es necesario que las semillas que cultivemos se encuentren estériles o desinfectadas. Las semillas que se mantienen dentro de las cápsulas cerradas se mantienen estériles, por ello es mas fácil realizar la desinfección superficial externa de la capsula y luego abrir y esparcir las semillas en un ambiente estéril y en el medio de cultivo seleccionado.



Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquídea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”

Los pasos para la siembra de semillas de cápsulas verdes cerradas es la siguiente:

1. Seleccionar la cápsula a desinfectar
2. Retirar los restos de la flor y lavar la cápsula bajo el grifo, retirando los restos de tierra con un cepillo delicado, sin dañarla.



3. En la cámara de flujo laminar o en un ambiente lo mas limpio posible, realizar la desinfección sumergiendo la cápsula en lavandina o hipoclorito de sodio por 10 minutos.



4. Posteriormente sumergir en alcohol puro y luego flamearla o pasarla por el fuego y apagarla rápidamente.
5. Una vez flameada la cápsula, con la ayuda de un bisturí estéril, realizar cortes longitudinales.
6. Dispersar las semillas de orquídeas que se encuentran en el interior sobre el medio de cultivo, si es posible o caso contrario retirar las semillas de la capsula con la ayuda de otro escalpelo o con la espátula, colocándolas sobre el medio de cultivo.





7. Cerrar el frasco donde se ha realizado el cultivo de las semillas y sellar con papel plástico para envolver alimentos o parafilm.



8. Llevar a la sala de crecimiento con la temperatura e iluminación adecuada para el desarrollo de la especie en estudio. En caso de *C. nobilior*, la temperatura adecuada es aproximadamente 24 grados centígrados, con 12 horas de exposición a la luz y 12 horas de oscuridad.



Materiales Necesarios:

- Frascos con medio de cultivo esterilizado
- Frascos con alcohol
- Pinzas
- Bisturí o escalpelos
- Fósforos
- Papel toalla
- Cepillo suave
- Lavandina o hipoclorito de sodio diluido en agua (10%)
- Espátulas
- Plástico para envolver el frasco con medio
- Etiquetas y marcador permanente.



b) Siembra de semillas maduras (cápsulas abiertas).

1. Cuando las cápsulas ya se encuentran abiertas, es necesario hacer la desinfección de las semillas. Generalmente las mismas se desinfectan con lavandina, sin embargo hay que tener mucho cuidado para que el producto químico no dañe las semillas.
2. Hay que eliminar cualquier hongo que pueda estar adherido a la cubierta o testa de las semillas, pero sin dañar el embrión.
3. Para ello se utiliza diferentes métodos para la desinfección, como el método del sobre o de la jeringuilla.



La lavandina comercial que se vende en los mercados tiene un porcentaje de 5 o 6%, por ello es necesario diluir hasta un 2% agregando agua, para su dilución. Para preparar 1000 ml de lavandina comercial al 2% agregue 350 ml de lavandina y 650 ml de agua estéril.

Para tener agua estéril, solo necesita hervir el agua durante 15 minutos y luego colocarla en un envase totalmente limpio y cerrarlo herméticamente.

c) Método del sobre

Para este método utilizar un papel que no se rompa con facilidad al remojarlo, como papel filtro para café.





1. Trabajar en la cámara de flujo laminar (laboratorio) o en una cámara de transferencia o ambiente estéril (casa).



2. Esterilizar todo el material de pinzas y bisturís que va a utilizar durante el trabajo. Puede esterilizar colocando las mismas en un frasco con alcohol puro.



3. Rotular los frascos con medios de cultivo con el nombre de la especie, variedad o híbrido que va a cultivar.
4. Cortar el papel filtro y formar un sobre de unos 2 o 3 cm cuadrados.





Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquidea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”

5. Colocar dentro una pequeña cantidad de semillas en el interior y engrampar el sobre.
6. Sumergir el sobre con una pinza en agua destilada estéril y agitar suavemente.
7. Dejar el sobre unos 5 minutos en el agua destilada
8. Transferir el sobre a otro frasco con la solución desinfectante (lavandina diluida 2%) y dejar 10 minutos, agitando suavemente, para que todas las semillas entren en contacto con el desinfectante.
9. Retirar el sobre y hacer al menos 3 lavados consecutivos con agua estéril para eliminar el resto de lavandina que haya quedado sobre la superficie de las semillas.
10. Con unas pinzas estériles abrir el sobre y esparcir las semillas sobre el medio de cultivo.





11. Cerrar bien el frasco con papel aluminio y/o plástico y llevar a la sala de crecimiento (o a un lugar muy limpio) donde crecerán nuestros cultivos con luz indirecta.



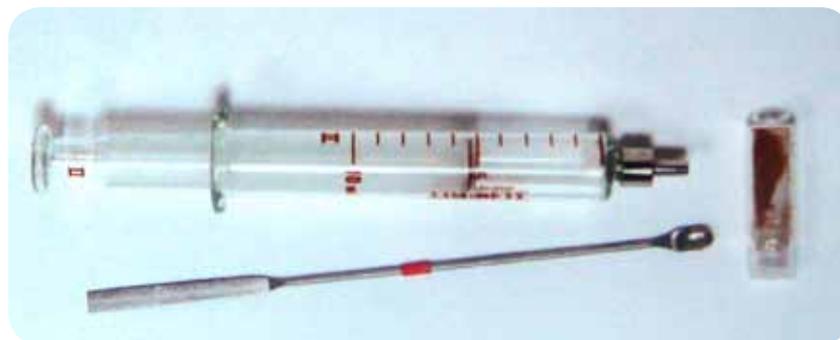
d). Método de la jeringuilla

1. No olvidar tener listos los frascos con medio de cultivo.



2. Rotular con el nombre de la especie o variedad y anotar la fecha del cultivo.

3. Se necesita una jeringa de aprox. 5 ml, retirar el embolo de la jeringa y colocar en el interior del cilindro de la jeringa una pieza de algodón.





Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquidea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”

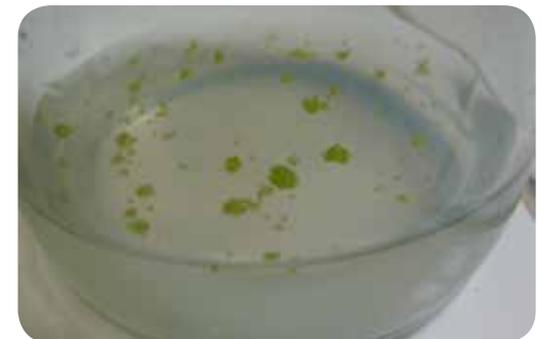
4. Colocar una pequeña cantidad de semillas sobre el algodón y colocar el embolo.
5. Introducir en la jeringa unos 4 ml de solución desinfectante a través del algodón.



6. Mover la jeringa para retirar las burbujas de aire y dispersar las semillas.
7. Agitar la jeringa suavemente durante unos 10 minutos.
8. Luego expulsar la solución de la jeringa e introducir unos 4ml de agua estéril a la jeringa para el lavado de las semillas. Repetir este lavado por tres veces.
9. Las semillas se pueden sembrar: retirando el algodón de la jeringa con una pinza y dispersando sobre el medio o verter directamente las semillas al frasco con medio de cultivo.



10. Sellar el frasco con el plástico y llevar a sala de crecimiento.





II. Preparación de medios de cultivo.

La preparación de los medios exige una serie de cuidados en el momento del pesado de los reactivos y en evitar que se contaminen, para lo cual es indispensable su esterilización antes de la siembra de las semillas de orquídeas (Arditti & Ernest, 1993, Seaton & Ramsay, 2009).

La metodología utilizada para la preparación es la siguiente:

- Pesar los componentes del medio indicados en el Medio Kundson C (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, hierro) y adiciónelos a 500 ml de agua destilado estéril. (Solución 1).



- Luego agregar 20 g de sacarosa o azúcar común. Agitar hasta disolver totalmente.
- Luego disolver en otros 500 ml de agua el agar (entre 7 a 10 g/l de acuerdo a si prefiere el medio mas o menos sólido). Emplear calor para ayudar a disolver el agar (Solución 2).
- Unir ambas soluciones (1 y 2) y medir el pH que debe estar entre 5.6 y 5.8.
- Esterilizar el medio de cultivo en el autoclave a 121 grados centígrados por 10 minutos (en laboratorio) o en olla a presión (en casa), por aproximadamente 15 minutos.



- Luego en una cámara de flujo laminar (laboratorio) o en un ambiente lo más estéril posible, transfiera los medios a frascos o envases estériles, cubra con papel aluminio y plástico las tapas y conserve por al menos 3 días antes de la utilización para la siembra de las semillas de orquídeas.
- Se debe verificar antes de su uso que los medios se encuentren libres de contaminantes por bacterias y hongos.

III. Medios de cultivo y materiales necesarios para el cultivo de semillas

a. Medio Knudson C.

Macronutrientes	mg/l
Sulfato de amonio (NH_4) ₂ SO_4	500
Nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000
Fosfato diácido de potasio KH_2PO_4	250
Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
Hierro	
Sulfato de hierro (III) heptahidratado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25
Micronutrientes	
Sulfato de manganeso tetrahidratado $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7.5
Acido bórico H_3BO_3	0,0560
Sulfato de cobre(II) pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0624





Trióxido de molibdeno MoO_3	0.0160
Sulfato de zinc heptahidratado $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3310
Sacarosa	20 g/l
Agar	10 g/l
pH	5.6

b. Medios caseros

También es posible preparar medios de cultivo sustituyendo las sales minerales y los reguladores de crecimiento por suplementos que podemos encontrar en nuestra casa, como medios en base a extractos de bananos, tomate, agua de coco, que den los nutrientes principales para la germinación del embrión y el desarrollo de la planta.

En los medios de cultivo generalmente se debe agregar el “agar” que es una gelatina que extraen de algas marinas y que es posible comprarlas en farmacias especializadas. El agar se mantiene sólido o gelificado aun a temperaturas del ambiente y es allí donde se germinan y se desarrollan las semillas de nuestras orquídeas.

El pH de los medios de cultivo para la siembra de orquídeas, debe estar entre los 5 y 5,6. Esto se puede medir comprando un papel para medir el pH en las farmacias.

Generalmente los medios caseros presentan un pH en este rango (5,6), sin embargo en caso que el medio este muy ácido (por debajo de 5,6) agregue una pizca de sal, o si el medio es muy básico (arriba de 5,6) utiliza unas gotitas de limón.



c. Medio del plátano

Plátano maduro (puré)	100 g
Agar –agar	10 g
Azúcar común	15 g
Tiamina*	1,2 g
Agua destilada	900 ml.

*La tiamina es vitamina B12 y la podemos comprar en las farmacias.

d. Medio del Tomate

Tomate maduro (pasta)	200 g
Agar –agar	10 g
Azúcar común	15 g
Tiamina	1,2 g
Agua destilada	900 ml.

e. Medio de Tomate con plátano

Plátano (puré)	40 g
Jugo de tomate	100ml
Agar –agar	10 g
Azúcar común	15 g
Tiamina	1,2 g
Agua destilada	900 ml.





IV. Preparación del Medio de Cultivo en casa

1. Tener todos los componentes indicados listos para la preparación de los medios de cultivo.
2. Colocar el agua a calentar en una olla de vidrio, esmaltado o de teflón.
3. Cuando esté a punto de hervir, apagar el fuego y colocar en la olla todos los componentes.
4. Mezclar todo usando una cuchara de palo o de plástico.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5,6 aproximadamente.
6. Distribuir el medio de cultivo en los tubos de ensayo y o frascos.
7. Evitar derramar el medio en borde de los frascos ya que puede ayudar a la contaminación. Utilizar un embudo para colcar el medio sin derramar.
8. Colocar unos 30 ml en cada frasco y cubra los frascos o tubos con papel aluminio.
9. El medio debe ser esterilizado, es decir, quitarle todos los microorganismos que pueden estar en el medio. Para ello se puede utilizar una olla a presión. Colocar un poco de agua en el fondo, una rejilla y luego los frascos debidamente tapados con papel aluminio.
10. Hacer hervir en la olla por aproximadamente 20 minutos si fuese una olla presión o 40 minutos en ollas normales

V. Germinación de semillas de orquídeas

Las semillas de orquídeas tienen un ciclo de vida que incluye la imbibición, germinación, formación de protocormos y aparición de las primeras hojas y raicillas.

Esta germinación es diferente en especies epifitas que necesitan luz para su germinación, mientras que las especies terrestres germinan en oscuridad.

En el caso de la germinación de orquídeas epifitas, puede tardar de unos pocos días a varios meses. La germinación se inicia con la imbibición de agua por las semillas, para luego germinar al romper la testa de la semilla. Las semillas empiezan a cambiar de color amarillo a verde cuando comienzan a realizar fotosíntesis, con la presencia de luz.

Estas especies en lugar de formar hojas y raíces directamente, forman primero una pequeña esfera de células verdes que se llama protocormo. Una vez el protocormo crece se observa el desarrollo de pelos radicales y posteriormente el brote con la aparición de las hojas.



Desarrollo de la germinación in vitro de *Cattleya nobile*

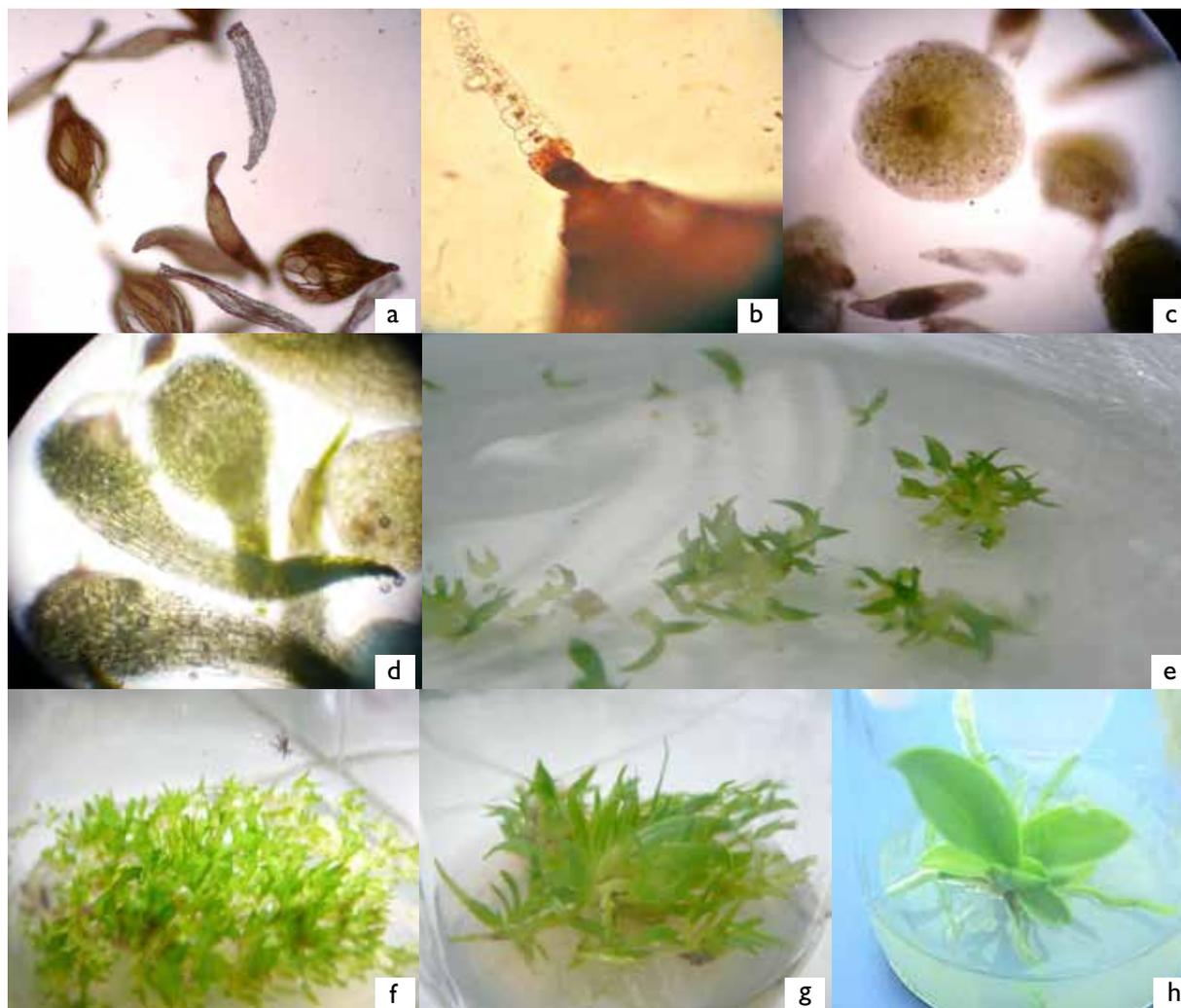


Figura: a) semillas hidratadas b) germinación de la semilla rompiendo la testa c) formación de protocormos d) aparición de las primeras hojas e) formación de las vitroplantas f) crecimiento de los plantines g) desarrollo foliar y radicular h) desarrollo completo de *Cattleya nobile* in vitro, mostrando hojas y raíces completamente formadas.



VI. Como cuidar los frascos durante el desarrollo de las plántulas *in vitro*

Durante la germinación y desarrollo de las plantas en los frascos *in vitro*, los mismos deben permanecer en el caso de especies epifitas en luz, esta puede suministrarse colocando los frascos cerca de ventanas que dejen pasar la luz natural o colocando bajo luz artificial (focos fluorescentes).

La temperatura del ambiente va a depender de la especie, sin embargo la mayoría de las orquídeas cruceñas, crece bien entre los 22 y 24 grados centígrados, ya que a menor temperatura crecerá más lento y a mayor temperatura podrían morir.

a. Traspaso a nuevos medios

Como generalmente germinan mas semillas de las esperadas, el frasco puede quedar lleno de semillas y es necesario transferir los protocormos desarrollados a nuevos medios de cultivo, para que pueden crecer y desarrollarse *in vitro* de forma adecuada.

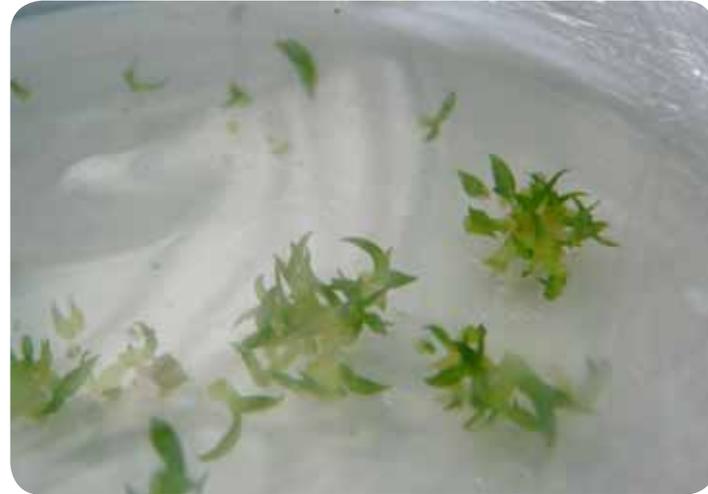
Los pasos para la transferencia a medios nuevos son:

1. Tener listos los frascos con medios estériles.
Rotularlos con los datos de la especie que esta subcultivando y la fecha de cultivo inicial y la actual.





2. Con pinzas estériles traspasar los protocormos y colocarlos unos separados de otros, por al menos medio centímetro de distancia, para que posteriormente pueda desarrollarse la planta sin problemas.



3. Volver a sellar el frasco y llevar nuevamente a sala de crecimiento.
4. Revisar constantemente los frascos sembrados para verificar que se encuentren sin contaminantes (desarrollo de hongos o bacterias).





b. Trasplante fuera del frasco en el invernadero.

Una vez que las plantas se han desarrollado en los medios de cultivo *in vitro* y han desarrollado completamente sus raíces, es posible transferirlas a un medio exterior. Para ello es necesario contar con un pequeño invernadero o vivero en el cual podamos sacar las vitroplantas del medio de cultivo.

Los pasos para transferir y aclimatar las vitroplantas a condiciones externas son los siguientes:

1. Retirar las tapas de plástico o papel aluminio que tengan los frascos.
2. Retirar con mucho cuidado los plantines, tratando de no dañar las raíces de las plantas.



3. Lavar las raíces con abundante agua de grifo para eliminar el medio de cultivo y agar de las raíces de las vitroplantas.
4. Sumergir las plantas completas en una solución diluida de fungicidas (ej. Benomyl).
5. Colocar las plantas en los sustratos adecuados. Si son edifitas como *Cattleya nobilior* escoja sustratos como coco molido, ladrillos, carbón, etc.



6. Antes se debe esterilizar el sustrato colocando unos 10 cm del mismo en una bandeja, cubrirlo con papel aluminio y exponerlo a unos 80 °C en el horno de la cocina. Dejar actuar durante 30 minutos y enfriar antes de utilizarlo. Esto nos ayudara a eliminar posibles contaminantes.
7. Cubrir las macetas con los plantines con un plástico transparente por al menos dos semanas luego de su transferencia. Es necesario mantener la humedad lo más alto posible para evitar deshidratación y muerte de las plantas. Luego de las dos semanas ir destapando cada día un poco el plástico hasta que las plantitas estén habituadas a sus nuevas condiciones de menor humedad y mayor intensidad lumínica.
8. No colocar las plantas directamente en el sol, tratar de colocar una malla sombra para proteger las vitroplantas, al menos durante las dos primeras semanas en el invernadero o vivero.







VII. Manejo de plantines en vivero.

- a) **Sustrato:** El sustrato o el medio donde hagamos crecer y desarrollar nuestras orquídeas va a depender de la especie. En el Caso de la *Cattleya* como es una especie rupícola, es decir que crece sobre rocas principalmente, hay que preparar un sustrato en base a pedazos de ladrillo o roca, trozos de corteza de árboles, coco picado, musgos u otros que den solamente soporte para las raíces de las plantas. Sin embargo es importante que este sustrato este aireado para permitir que el agua de riego drene sin problemas.
- b) **Temperatura:** Las orquídeas son muy susceptibles al cambio brusco de temperatura, por ello es conveniente cultivarlas en lugares muy similares a donde se desarrollan naturalmente.
- c) **Iluminación:** La iluminación también es importante, coloque las orquídeas bajo sombra, evitando que les de directamente el sol sobre todo en horas de la tarde.
- d) **Humedad:** La humedad es un factor importante para el buen desarrollo de las orquídeas en los viveros. Generalmente deben hacerse dos riegos semanales, siem-

pre verificando que el sustrato se haya secado entre un riego y otro. El riego excesivo es el causante en muchas ocasiones, mas que la falta de agua, de la muerte de nuestras plantas.

- e) **Fertilización:** El uso de fertilizante es también muy importante para el buen crecimiento y floración de las plantas de orquídeas. Usar un fertilizante en proporción 7-9-5 (N-P-K) para el desarrollo de la planta y uno especial más alto en fósforo, como 3-12-6 (N-P-K) para estimular la floración. La fertilización se podrá hacer cada 15 días a 1 mes. No exagere en la fertilización ya que puede causar muerte de las raíces y las puntas de las hojas.
- f) **Enfermedades:** Existen varias enfermedades que puede atacar sus plantas de orquídeas en el vivero. Si su planta presenta manchas oscuras en las hojas o flores, es muy probable que sea un hongo quien esté causando el problema, por ello se puede pulverizar sus plantas con un fungicida no muy fuerte como el Benomyl en las cantidades que especifique el producto, nunca aumentando la dosis.

Otras enfermedades pueden estar asociadas a bacterias que presentan lesiones acuosas o mandas redondeadas en las hojas o pseudobulbos. En este caso la causa es





generalmente el abundante riego, por ello corte la parte afectada y evite el riego por varios días. Si el problema persiste debe aplicar algún anti-biótico.

Otro problema es la presencia de manchas que son causadas por virus. No existen remedios para curar estas enfermedades, por ello debemos evitar la diseminación a otras plantas, retirando las enfermas y aplicando productos para combatir el transmisor que generalmente es la cochinilla. Si la planta es muy preciada y solo contamos con muy pocas, el cultivo de tejidos puede ayudarnos a salvar nuestra planta.

g) Plagas: Hay varias plagas que afectan nuestras orquídeas en el vivero. Cochinillas marrones o algodonosas, Pulgones y Babosas y caracoles pueden causar serios daños. Por ello debemos tratarlas con insecticidas o productos naturales que los combata y realizar fumigaciones periódicas para evitar la presencia principalmente de cochinillas que transmiten otras enfermedades.

En el caso de que aparezcan babosas o caracoles, se pueden poner por la noche rodajas de pepinos y al empezar el día podremos retirar las rodajas con los caracoles que van a comerlos.





VIII. Conservación y uso sostenible de la *Cattleya nobilior* y las orquídeas bolivianas

Las orquídeas son plantas que sus características han ido desapareciendo día a día, debido sobre todo a la colecta indiscriminada a que estas plantas están sometidas por la belleza y variedad de sus flores y a la pérdida de su hábitat natural.

Hay varias maneras en que todos podemos ayudar a conservarlas, desde el lugar que vivamos y el trabajo que desempeñemos.

Lo primero que no debemos hacer es comprar las plantas de orquídeas en los mercados o en la calle a personas que las hayan extraído de su hábitat (bosque o reservas), ya que estamos promoviendo la colecta ilegal y generalmente las plantas son llevadas de un lugar a otro donde las condiciones no son las adecuadas y estas tienden a morir.

De igual manera debemos apoyar la creación de áreas protegidas, sean estas nacionales, municipales o privadas, la creación de Bancos y laboratorios *in vitro* y viveros certificados, que puedan producir y comercializar estas plantas con bellísimas flores, sin recurrir a las especies silvestres, protegiendo de esta manera a las orquídeas, muchas de las cuales están a un paso de su extinción.

En el caso de la *Cattleya nobilior*, es importante hacer todos los esfuerzos para mantener el Área protegida Municipal de El Encanto, ubicada en el Municipio de Concepción y su hábitat en general, así la especie podrá desarrollarse y reproducirse naturalmente. Además apoyar la conservación fuera de su hábitat, creando laboratorios caseros en las comunidades y reproduciendo *in vitro* las especies para su comercialización y repoblamiento de áreas protegidas.

**LA CONSERVACIÓN DE LA CATTLEYA NOBILIOR ESTÁ
EN NUESTRAS MANOS, APOYÉMOSLA.**





Bibliografía

ARDITTI, J. & R. ERNST. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley & Sons, Inc. Canada.

SEATON, P. & RAMSAY, M. 2009. Cultivo de orquídeas por semilla. Royal Botanic Garden Kew. England.

VÁSQUEZ, CH., R. & P. L. IBISCH. 2004. Orquídeas de Bolivia / Orchids of Bolivia. Diversidad y estado de conservación/ Diversity and conservation status. Vol II. Subtribu: Pleurothallidinae. Editorial FAN., Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

VÁSQUEZ, CH., R. & P. L. IBISCH & GERKMANN, B. 2003. Preliminary list of Bolivian Orchid species. Diversity of Bolivian Orchidaceae – a challenge for taxonomic, floristic and conservation research. Org. Divers. Evol. 3 (2): 93 -102.





Glosario

Antera: parte masculina de la flor encargada de producir el polen.

Cáliz: Parte de las flores que forma su cubierta más externa y el receptáculo de su base, generalmente verde, aunque en las orquídeas presentan diversos colores, generalmente igual que los pétalos.

Capsula: Fruto sincarpio seco y deshicente en que se alojan miles a millones de semillas en las orquídeas.

Embrión: Primordio de la planta en que aparecen ya esbozadas la raíz, el tallo y las hojas, junto con materia de reserva en los propios cotiledones.

Epífita: planta que crece naturalmente sobre otra planta, pero no depende de ella para su nutrición y obtención de agua.

Especie: Tipo de planta que es genéticamente distinto de otro.

Estigma: extremo distal del gineceo (órgano femenino de la flor). Suele ser la zona que recibe el polen.

Fertilizante: minerales esenciales para la nutrición de la planta.

Genero: Agrupación de especies de plantas que comparten características morfológicas similares y que por ende están emparentadas.

Hábitat: ubicación geográfica donde una planta normalmente crece.





Hibrido: planta resultante de la cruce de dos especies distintas.

Imbibición: Acción de embeber o empapar. Absorción de agua por el embrión.

Labelo: pétalo inferior de una flor de orquídea especializado para ayudar en la polinización de la planta por insectos. Tiene forma distinta, generalmente más grande que los otros pétalos de la flor.

Micorrizas: relación simbiótica entre las raíces de una planta vascular y un hongo.

Monopodial: Planta que tiene un solo tallo que crece verticalmente y que produce hojas y flores a lo largo de él.

Polinio: Masa de granos de polen aglomerados, como en la orquídea.

Protocormo: Masa de células que se forman luego de la germinación en semillas de orquídeas a partir del embrión rudimentario.

Pseudobulbo: Porción engrosada de la parte basal del tallo de muchas orquídeas, encargada de almacenar agua y nutrientes.

Sépalo: cada una de las piezas florales que forman el cáliz.

Simpodial: forma de crecimiento de las plantas en sentido horizontal o lateral.

Sustrato: material en el cual se hace crecer una planta.

Rizoma: es un tallo que crece horizontalmente, a partir del cual se forman raíces adventicias, hojas y/o ramas.





Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquidea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”



¿QUÉ ES CEPAD?

El Centro para la participación y el Desarrollo Humano Sostenible (CEPAD) es una institución que presta apoyo, asistencia y asesoramiento a los actores públicos, privados y de la sociedad civil en general en temas de desarrollo humano, económico y sostenible. Institución acreditada por diversos organismos nacionales e internacionales, entre ellos la OEA mediante resolución N°CP/RES. 759 del 08 de noviembre de 2000.

MISIÓN INSTITUCIONAL

El CEPAD tiene como misión promover el desarrollo económico, humano y sostenible, fortaleciendo la capacidad de gestión de los procesos de descentralización local en participación social.

EQUIPO CEPAD

Carlos Hugo Molina Saucedo
Rubens Barbery Knautd
Victor Hugo Acosta Ortega
Celín Céspedes Ayala
Geovanna Terceros Terceros
Saira Soledad Duque Moreno
Paúl García Bejarano
Ángel Olguín Jiménez
Lilian Viviana Del Barco Quiroga
Eldy Fabiola Pinto

Roberto Barbery Anaya
Ruddy Rolando Cuéllar Rivero
Cecilia Bruno Velasco
Juan Pablo Coimbra Molina
Mauricio Callaú
Daniela Galarza Alcocer
Sebastián Molina Barbery
Arlete Mendizabal Vaca
Shirley Sandóval Romero
Ana Beatriz Galarza Villca







JUNTA DE EXTREMADURA
Agencia Extremeña de Cooperación
Internacional para el Desarrollo

