



**Universidad
de La Laguna**

ESCUELA POLITÉCNICA DE INGENIERIA

SECCIÓN DE INGENIERÍA AGRARIA

GRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y DEL MEDIO RURAL

ESTUDIO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO* EN LA PROPAGACIÓN DEL GÉNERO *PHALAENOPSIS* A PARTIR DE PROTOCORMOS

SIXTO GÁMEZ MEDINA

Septiembre 2020

**AUTORIZACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO
POR SUS DIRECTORES
CURSO 2019/2020**

DIRECTOR – COORDINADOR: D. ANTONIO SIVERIO NÚÑEZ
DIRECTOR: D. JUAN ENRIQUE REYES MORENO

como Directores del alumno Sixto Gámez Medina, en el TFG titulado:

**ESTUDIO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO PARA LA
PROPAGACIÓN DE LOS GÉNEROS PHALAENOPSIS Y CYMBIDIUM A
PARTIR DE PROTOCORMOS**

nº de Ref.....

doy/damos mi/nuestra autorización para la presentación y defensa de dicho TFG, a la vez que confirmo/confirmamos que el alumno ha cumplido con los objetivos generales y particulares que lleva consigo la elaboración del mismo y las normas del Reglamento de Trabajo Fin de Grado de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería.

La Laguna, a 1 de septiembre de 2020

Fdo:.....

(Firma de los directores)

437982020

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE TRABAJO FIN DE GRADO

ÍNDICE

1.RESUMEN.....	7
2.INTRODUCCIÓN.....	10
3.OBJETIVOS.....	14
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1 FAMILIA ORQUIDÁCEA: TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA.....	17
4.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LAS ORQUÍDEAS.....	18
4.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	18
4.1.3 <i>PHALAENOPSIS</i>	19
4.1.4 <i>CYMBIDIUM</i>	21
4.2 FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE LAS ORQUÍDEAS <i>IN VITRO</i>	23
4.2.1 AZÚCARES.....	24
4.2.2 DIÓXIDO DE CARBONO.....	25
4.2.3 ETILENO.....	26
4.2.4 FUENTE DE NITRÓGENO.....	26
4.2.5 INTENSIDAD DE LUZ.....	26
4.2.6 HUMEDAD RELATIVA.....	27
4.2.7 RECIPIENTES DE CULTIVO PERMEABLE A LOS GASES.....	27
4.2.8 TEMPERATURA.....	28
4.3 ANOMALÍAS FISIOLÓGICAS OCASIONADOS POR FACTORES FÍSICOS.....	30
4.3.1 HIPERHIDRATACIÓN (VITRIFICACIÓN).....	30
4.3.2 PARDEAMIENTO OXIDATIVO (OXIDACIÓN).....	31
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
5.1 MATERIALES.....	33

5.1.1 MATERIAL VEGETAL.....	33
5.1.2 ESTERILIZACIÓN.....	33
5.1.3 RECIPIENTES DE CULTIVO.....	36
5.1.4 pH-METRO.....	36
5.1.5 AGITADOR-CALEFACTOR.....	37
5.1.6 CAMPANA DE FLUJO LAMINAR.....	37
5.1.7 HERRAMIENTAS Y UTENSILIOS.....	39
5.1.8 MEDIOS DE CULTIVO.....	40
5.1.8.1 ICHIHASHI (NP) MEDIUM ORCHID MAINTENANCE (I 365).....	40
5.1.8.2 ORCHID MAINTENANCE MEDIUM WITH CHARCOAL (P 668).....	41
5.1.8.3 MURASHIGE AND SKOOG MÉDIUM + LEVADURA.....	41
5.1.8.4 MURASHIGE AND SKOOG MÉDIUM + BA.....	43
5.1.8.5 HYPONEX.....	44
5.2 MÉTODOS.....	45
5.2.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO.....	45
5.2.2 CONDICIONES DE CULTIVO.....	48
5.2.2.1 TEMPERATURA.....	48
5.2.2.2 ILUMINACIÓN.....	49
5.2.3 MANEJO IN VITRO.....	50
5.2.4 CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE LOS EXPLANTOS.....	51
5.2.5 ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	51
5.2.6 COMPROBACIÓN DE LA ADAPTACIÓN EXTERNA (EX VITRO).....	51
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
7. CONCLUSIÓN.....	56

8. BIBLIOGRAFÍA.....	59
9. APÉNDICES.....	64

1.RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO EN LA PROPAGACIÓN DEL GÉNERO *PHALAENOPSIS* A PARTIR DE PROTOCORMOS**GÁMEZ MEDINA, S., SIVERIO NÚÑEZ, A. Y REYES MORENO, J.E.****PALABRAS CLAVE: PROPAGACIÓN, ORQUÍDEAS, *PHALAENOPSIS*, *CYMBIDIUM*, PROTOCORMO.****1. RESUMEN**

En este Trabajo Fin de Grado se describe el procedimiento para evaluar la regeneración de *Phalaenopsis* y *Cymbidium* a $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura constante. En *Phalaenopsis* se utilizan cinco medios diferentes, con cinco repeticiones cada uno y en *Cymbidium*, se ensaya dos medios con diez repeticiones cada uno. Para determinar si hay disparidad en el desarrollo de las plántulas en los diferentes medios se hace mediante un análisis de varianza (ANOVA $p < 0,05$) y prueba de Tukey, con medidas tomadas de hojas y raíz, utilizando dos tipos de contenedor. En ambos ensayos se utiliza un volumen de 200 cm^3 de medio sólido por recipiente a $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ constante con 16 horas de luz artificial y 8 horas de oscuridad. Se comprueba la aclimatación en las condiciones externas de cultivo en umbráculo, bajo malla del 80%. A partir de la primera semana y, hasta la semana final del ensayo, se hizo un seguimiento del cultivo *in vitro*. Además, se realizó un seguimiento fotográfico. Entre los resultados más relevantes se constata que, en los tipos de contenedores y medios de cultivo evaluados a $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no se observa ninguna anomalía fisiológica ni mortalidad. Respecto al medio de cultivo en *Phalaenopsis* y *Cymbidium*, Hyponex, según estadística, fue el medio con mejor desarrollo vegetativo y radicular. La evolución de las plántulas *ex vitro* no presentan daños por aclimatación.

TITLE: STUDY OF DIFFERENT IN VITRO CULTIVATION MEANS IN THE PROPAGATION OF THE GENRE PHALAENOPSIS FROM PROTOCORMS**GÁMEZ MEDINA, S., SIVERIO NÚÑEZ, A. AND REYES MORENO, J.E.****KEY WORDS: PROPAGATION, ORCHIDS, PHALAENOPSIS, CYMBIDIUM, PROTOCORM.****1. ABSTRACT**

This Final Grade Project describes the procedure to evaluate the regeneration of *Phalaenopsis* and *Cymbidium* at $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ of constant temperature. In *Phalaenopsis* five different media are used, with five repetitions each, and in *Cymbidium*, two media with ten repetitions each are tested. To determine if there is disparity in the development of the seedlings in the different media, it is done through an analysis of variance (ANOVA $p < 0.05$) and Tukey's test, with measurements taken from leaves and roots, using two types of container. In both tests, a volume of 200 cm^3 of solid medium is used per container at a constant $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with 16 hours of artificial light and 8 hours of darkness. Acclimatization is checked in the external conditions of cultivation in shade, under an 80% mesh. From the first week and until the final week of the test, the in vitro culture was monitored. In addition, a photographic examination was carried out. Among the most relevant results, it is found that, in the types of containers and culture media evaluated at $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no physiological abnormality or mortality was observed. Regarding the culture medium in *Phalaenopsis* and *Cymbidium*, Hyponex, according to statistics, was the medium with the best vegetative and root development. The evolution of the seedlings *ex vitro* does not show damage by acclimatization.

2.INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica muy importante para el desarrollo de la industria de las orquídeas. A fin de que mejorar la calidad y cantidad de plántulas de orquídeas, es necesario controlar el microclima en el interior del recipiente de cultivo.

Los cultivos de tejidos generalmente utilizan recipientes bien cerrados para prevenir la evaporación, la desecación de los tejidos y mantener los cultivos estériles. Sin embargo, estos recipientes de cultivo bien cerrados crear algunas condiciones físicas y químicas que dificultan los procesos normales de desarrollo.

La micropropagación se ha convertido en una industria importante para la biotecnología agrícola. En esta técnica, las plántulas se establecen *in vitro* en pequeños y asépticos recipientes de cultivo, colocados en estantes horizontales. El agua y los requerimientos nutricionales son suministrados por el medio de cultivo. La aireación juega un papel considerable en el crecimiento y desarrollo de las plantas, a través de su efecto sobre la corriente de transpiración. El flujo de transpiración juega un papel fundamental en la translocación de nutrientes minerales a través del xilema (Bairu,2009).

El intercambio gaseoso entre el interior del recipiente y exterior es limitado, debido a la necesidad de aislar los explantes de microorganismos. Sin embargo, estos recipientes de cultivo bien cerrados crear algunas condiciones físicas y químicas que dificultan los procesos normales de crecimiento (Bairu,2009). El agua y la composición del medio de cultivo son la principal fuente de nutrición. En el espacio interior de los contenedores, la humedad relativa suele ser muy alta. En estas condiciones se produce disminución de la concentración de dióxido de carbono (CO_2) en períodos equivalentes de luz diurna y subida de la concentración de CO_2 en períodos de oscuridad (Chen, 2007). El crecimiento de las plántulas dentro de los vasos de cultivo se ve afectado por el microclima interno, por la temperatura y la humedad del aire, la calidad y cantidad de la luz (Hsu y Chen, 2007; George y Davies, 2008; Fujiwara y Kozai, 1995; Kozai, 2010). Los factores ambientales más importantes que afectan al crecimiento de las plántulas son la temperatura del

aire y humedad relativa, irradiación de la luz y CO₂, oxígeno (O₂) y la concentración de etileno (C₂H₄). Varios investigadores han informado que la alta humedad relativa en cultivo *in vitro* induce trastornos fisiológicos de las plántulas (Ghashghaie *et al.*, 1992; Preece y Sutter (1990). Buddendorf-Joosten y Woltering (1994)) encontraron que la limitación de concentraciones de CO₂ en un período de luz inhibió el crecimiento de plántulas y senescencia inducida. El entorno externo de los recipientes de cultivo y las propiedades físicas de los vasos de cultivo influyen en el ambiente interno de los contenedores (Chen, 2004).

Se desarrollaron y validaron modelos de temperatura del aire, humedad relativa y densidad de linaza de fotones fotosintéticos (PPFD) con datos medidos (Chen, 2003, 2004, 2005). El efecto de la fotosíntesis y otras actividades fisiológicas en las plántulas es importante. Pospisilova y col (1997) mencionaron la irradiación, la concentración de CO₂, las concentraciones medias de sacarosa y los reguladores del crecimiento como factores.

Cultivos *in vitro*, tanto en brotes nodales como derivados de yemas y en brotes adventicios, pueden presentar hiperhidricidad ("vitrificación") (Debergh *et al.*, 1992). Este término se usa para describir una morfología aberrante, típicamente hiperhidratada, tejidos translúcidos y disfunción fisiológica en tejidos vegetales *in vitro* (Ziv, 1990). También es asociado con la necrosis de la punta de la hoja y las yemas. Este último a menudo conduce a la pérdida de dominancia apical en los brotes y está asociado con el callo de la base del tallo. Una característica importante de esta condición es la alteración de la función estomática que causa problemas en establecimiento de micro plantas (Preece y Sutter, 1990).

El estrés oxidativo (Gille y Sigler, 1995; Bartosz, 1997) se define como un desequilibrio en la proporción de antioxidantes en las células y da como resultado niveles elevados de prooxidantes (ROS: especies reactivas de oxígeno; incluyendo superóxido, peróxido de hidrógeno hidroxilo, piroxilo y radicales alcoxilo) (Wiseman y Halliwell, 1996), que puede causar daño celular (Sies, 1991). Puede reaccionar con proteínas que incluyen enzimas y moléculas de ácido nucleico (Gille y Siegler, 1995). La influencia de ROS, a

través del potencial redox produce alteración en el ciclo celular y daño oxidativo tanto en el núcleo como en el orgánulo. El desequilibrio puede conducir a respuestas controladas como la resistencia inducida a patógenos (Ernst *et al.*, 1992), desequilibrio excesivo en el daño celular y mutación (Wiseman y Halliwell, 1996), posible muerte celular programada (apoptosis) (Polyak *et al.*, 1997) y, en el extremo, a muerte celular no programada (Hippeli y Elstner, 1996).

3.OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fin de grado es conocer el comportamiento de los géneros *Phalaenopsis* y *Cymbidium* cultivados a partir de protocormos en diferentes medios de cultivo y contenedores a una temperatura constante de $17^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. FAMILIA ORQUIDÁCEA: TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA

4.1.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas, integrada en la familia Orchidaceae, cuenta entre 25.000 y 35.000 especies conocidas de monocotiledóneas, herbáceas y perennes. Se estima, que esto representa un 10% de todas las plantas superiores; que se agrupan en más de 650. La forma de las flores va desde la casi completa simetría radial, hasta la más extensa simetría bilateral, o bien hasta la asimetría de géneros. Algunas flores permanecen abiertas solo un día, mientras otras se mantienen frescas durante unos tres meses.

La palabra orquídea (del latín orchis, que a su vez deriva del griego) significa testículo y hace alusión a los pseudobulbos de algunas especies y al uso medicinal que se le asignaba a esta flor como afrodisiaca y potenciadora de la fertilidad. Con el tiempo, la palabra orchis derivó en orchidaceae.

Los científicos consideran que las orquídeas se originaron hace aproximadamente de 100 a 120 millones de años. Posiblemente su lugar de nacimiento fue el Archipiélago de Borneo.

El uso de las orquídeas ha sido tradicionalmente ornamental y medicinal, consideradas como flores místicas. Debido a su belleza y al elevado coste en el mercado actual son motivo de cultivo como flor cortada y como planta ornamental, por ello tiene una importancia económica a nivel mundial.

Las orquídeas están presentes prácticamente todo el planeta, existiendo diversos factores que determinan o influyen la adaptabilidad de diferentes especies de orquídeas en ciertas zonas, tales como altura, temperatura, latitud, precipitación, luz solar, nubosidad o velocidad de viento. Todos estos factores pueden ser decisivos para el establecimiento y floración de las especies.

4.1.2. Descripción botánica

Reino: Plantae

Phylum: Euphyta

División: Angiospermae

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Gynandreae

Familia: Orchidaceae

La familia Orchidaceae se subdivide en seis subfamilias:

- 1.Spiranthoideae: más de 3.600 especies.
- 2.Apostasioideae: 2 géneros y 16 especies del Sureste Asiático.
- 3.Cypripedioideae: 5 géneros y 130 especies de las regiones templadas del mundo, pocas en la América Tropical.
- 4.Vanilloideae: 15 géneros y 180 especies en la franja tropical y subtropical húmeda del planeta.
- 5.Orchidoideae: 208 géneros y 3630 especies distribuidas en todo el mundo, excepto en los desiertos más secos, en el Ártico y Antártico.
- 6.Epidendroideae: 500 géneros y 20000 especies aproximadamente distribuidas en las mismas regiones de Orchidoideae, también incluyen algunas especies subterráneas del desierto australiano.

4.1.3. PHALAENOPSIS

Reino: Plantae

Phylum: Euphyta

División: Angiospermae

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Gynandreae

Familia: Orchidaceae

Tribu: Vandaeae

Subtribu: Sarcanthina

Género: *Phalaenopsis* con cerca 60 Especies

Este género es el más cultivado debido a su fácil cultivo y a que puede florecer incluso en el interior del hogar durante todo el año. Representa más del 66% de las orquídeas comercializadas.

El género es originario de la zona que comprende China, Australia, Filipinas, Indonesia, Sumatra y Borneo.

Son plantas de crecimiento monopodial, tiene un único tallo pequeño del que va naciendo nuevas hojas por ápice y entre ellas nace el tallo floral. Las raíces son aéreas. Si se daña el meristemo apical la planta puede producir brotes laterales. Lo que le permite seguir creciendo.

Generalmente este género crece de forma epífita, sobre troncos de árboles, o litófito, sobre rocas con musgo. Al tener las raíces al aire estas pueden secarse rápidamente, por esa razón las raíces han desarrollado una estructura esponjosa, velamen, que le permite absorber mayor cantidad de agua.

Las hojas son duras y suculentas, de forma elíptica, oblonga o lanceolada; alternas y muy agrupadas entre ellas. Según sea la especie varía el tamaño y el color verde de la hoja.

La flor emerge de la axila de las hojas y esta puede ser simple o ramificado, erecto, horizontal o pendular. El número de flores varía según especie. La época de floración se puede alargar durante dos a cinco meses.

Luz:

No soporta que le de sol directamente. Para plantas adultas los niveles de intensidad de luz esta entre 15.000-25.000 lux. Para plantas jóvenes entre 10.000-12.000 lux. Es recomendado sombrear los invernaderos con mallas de sombreado del 75%.

Humedad:

Se recomienda no bajar de una humedad relativa del 60%, y un máximo de 80-85%.

Temperatura:

La temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre 21 y 30°C de día y entre 17-18°C por las noches.

Riego:

Por el color de la raíz se puede saber si el riego que se aplica es el adecuado, cuando el velamen de la raíz tiene un color verde significa que el agua aplicada es el correcto, si es de color blanco es insuficiente. Es recomendado regar a primera hora del día para permitir la evaporación del agua antes de la noche. No soporta el encharcamiento, los contenedores utilizados para su cultivo deben tener orificios de drenaje. Es aconsejable que el agua este a una temperatura de 17-21°C.

Fertilización:

Quizás sea uno de los factores más complicados por las características de este género. Una fertilización adecuada permite que se establezca una simbiosis entre hongos endomicorrícios y las raíces, que pueden reducir las necesidades de fertilizantes.

En cuanto a la fertilización existen muchas recomendaciones diferentes. Algunos autores recomiendan abonos con equilibrios 20-20-20, otros prefieren

abonos con un equilibrio más rico en nitrógeno de tipo 30-10-10 y otros defiendes la utilización de abonos con equilibrio 10-52-10 ya que las plantas florecen más rápidamente con fertilizantes ricos en fósforo. El abono siempre se ha de dar en aplicaciones muy diluidas pero frecuentes para obtener los mejores resultaos.

Sustrato de cultivo:

El material más utilizado es la corteza de pino. Este material se puede mezclar con otros como turba, lana de roca, perlita, vermiculita o materiales volcánicos como el picón. La mezcla con turba se ha mostrado como la más aconsejada ya que retiene más humedad y nutrientes. Otro material muy utilizado y que da muy buenos resultados es la fibra de coco.

4.1.4. CYMBIDIUM

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Cymbidieae

Subtribu: Cymbidiinae

Género: *Cymbidium*

Son de las más cultivadas por su fácil cultivo y gran número de híbridos. Es originario de Asia, desde la India hasta Japón y Australia.

Es una planta que posee un pseudobulbo del cual surgen de ocho a diez hojas largas y numerosas raíces. Los tallos están transformados en rizomas más o menos aéreos. Las raíces son carnosas, poco ramificadas y juegan un

papel muy importante en la alimentación hídrica: el tejido blanco que les recubre absorbe tanto el agua de escurrimiento como la humedad atmosférica.

Floración:

Las flores están reunidas en racimos erguidos de 20-80 cm. se puede realizar un entutorado de las varas florales ya que estas son más altas que el follaje. Según los híbridos y cultivares la floración ocurre de otoño a primavera. Para inducir la floración es importante que la temperatura nocturna ronde los 10 ° c.

Abonado:

En época de crecimiento se debe utilizar un abono más rico en nitrógeno 30:10:10, y según se aproxime la época de floración se va sustituyendo por otro del tipo 10:30:20 más rico en fósforo y potasio. El abono se aplica regularmente en cada riego en concentraciones muy bajas (0,5 o 1%).

Riego:

Se darán riegos regulares, de forma que se mantenga siempre húmedo el sustrato, evitando los encharcamientos, más frecuentes en primavera-verano. Es importante no dejar secar completamente el sustrato para evitar concentraciones de sales del abonado altas.

Temperatura:

En el momento de la floración la temperatura debe mantenerse entre 13-24°C. En verano la temperatura debe estar entre 23-30°C. Para la formación de las varas florales se induce con disminución de la temperatura a partir de otoño por debajo de 16°C.

Luz:

Es una planta exigente en luz, entre 30.000 y 45.000 lux, pero no soporta el sol directo ya que le produce quemaduras en las hojas.

Medios de cultivo:

El más utilizado es la corteza de pino, pero se pueden utilizar otros como turba o perlita.

4.2. FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE LAS ORQUÍDEAS *IN VITRO*

La mayoría de los factores que afectan al crecimiento *in vitro* de órganos, tejidos y células vegetales son similares a los que limitan el crecimiento de plantas enteras en vivo. Estos factores incluyen la nutrición de carbohidratos y minerales, hormonas vegetales, luz, temperatura, pH del medio, humedad, intercambio de gas y la presencia de microorganismos como hongos y bacterias. Existe un interés en mejorar el cultivo *in vitro* mediante la optimización de factores ambientales que incluye la luz, ambiente gaseoso, temperatura y humedad (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994). La atmósfera en la que crecen la mayoría de las plantas contiene nitrógeno (78%), oxígeno (21%), dióxido de carbono (0,035%) y otros gases. Por el contrario, la composición gaseosa dentro de los recipientes de cultivo *in vitro* suele ser diferente. Esto se debe a la restricción del intercambio de gases entre los recipientes de cultivo y el entorno, ya que es necesario mantener el cultivo aséptico de contaminación microbiana. Existen muchos tipos diferentes de recipientes de cultivo. Los recipientes de cultivo suelen ser fabricado en vidrio o polipropileno con una amplia gama de volúmenes. Materiales de sellado, como tapones de algodón, tapones de rosca, papel de aluminio, película transparente y muchos otros, tienen diferente permeabilidad a los gases y luz.

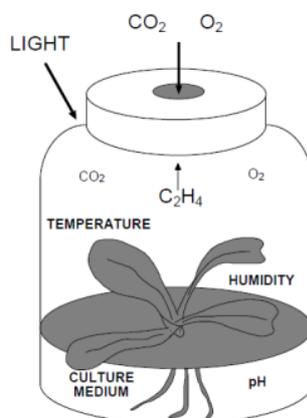


Figura1: Factores que afectan el crecimiento de orquídeas en condiciones de cultivo *in vitro*.

4.2.1. AZÚCARES

Los explantes, brotes y plántulas *in vitro* se considera que tiene poca o muy poca capacidad fotosintética para obtener carbono. Por lo tanto, es necesario proporcionar una fuente exógena de carbono (en forma de azúcares) para el crecimiento. Así se demuestra que las plántulas de orquídeas son heterótrofas en cultivo *in vitro*.

Se ha estudiado el efecto de los azúcares en el tejido de las orquídeas (Arditti, 1977). Muchos medios para el cultivo de tejidos de orquídeas contienen sacarosa como fuente de carbono. Los efectos de otros azúcares, como la glucosa y la fructosa, en medios de cultivo, se han estudiado con resultados variables. *Cymbidium* crece mejor con sacarosa que con maltosa, glucosa o fructosa. La glucosa inhibe la multiplicación de los protocormos de *Cymbidium*. Es de destacar que, aunque la fructosa parece ser una mejor fuente de carbono, no se puede esterilizar en autoclave (debido a descomposición química) a diferencia de la glucosa y sacarosa.

Los estudios han demostrado que las capas periféricas de células en los tejidos de los callos de las orquídeas están involucradas en la absorción de azúcar.

La importancia de la absorción de azúcar se demuestra en su posterior utilización para el crecimiento en tejidos de callos de orquídeas, en estudios de cinética de absorción de azúcar.

Los tejidos de orquídeas de diferentes géneros muestran diferentes afinidades por los diversos azúcares y esto dificulta la formulación de una solución estándar. La presencia de azúcar en el medio de cultivo favorece fuertemente el crecimiento rápido de bacterias y hongos, por lo tanto, los recipientes deben estar estériles y herméticos. El medio debe manipularse con cuidado para evitar cualquier posible contaminación.

4.2.2. DIÓXIDO DE CARBONO

Hay algunos informes sobre los efectos del oxígeno en cultivos de plantas, pero ninguno para orquídeas. Una disminución en el nivel de oxígeno en los recipientes de cultivo puede ser producido por el aumento de la concentración de CO₂. El proceso respiración pueden ser inhibido cuando la concentración de oxígeno es demasiado baja. Los efectos de la baja concentración de oxígeno sobre el crecimiento pueden explicarse por su efecto sobre la reducción de la pérdida fotorrespiratoria de carbono.

En el sistema cerrado de cultivo *in vitro* de orquídeas, el intercambio de gases es restringido y suele haber una disminución de la concentración de CO₂ en el contenedor del cultivo. La evidencia ha demostrado que el aumento del crecimiento de la mayoría de las plantas bajo enriquecimiento con dióxido de carbono se debe a la supresión de la pérdida fotorrespiratoria de carbono.

Los estudios de cultivos *in vitro* han demostrado que el crecimiento de la mayoría Orquídeas con fotosíntesis C3 pueden mejorarse (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994).

4.2.3. ETILENO

La composición gaseosa cambia con el crecimiento de las plántulas de orquídeas en el sistema cerrado convencional, debido a la restricción del intercambio de gases con el ambiente externo. Los gases como el CO₂ y el O₂ se agotan rápidamente mientras el etileno se acumula en el espacio superior. Además de la liberación de etileno de materiales vegetales, la acumulación de etileno también es contribuida por el tipo de sellado en el sistema de cultivo, la marca de agar utilizada y el gas CO₂ de cilindro utilizado para estudios de enriquecimiento de CO₂. Los efectos del etileno en los tejidos vegetales son muy diversos, con resultados tanto positivos como negativos. Los efectos negativos son la inhibición del crecimiento de las plantas y la mejora de senescencia (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994). Mediante el uso de inhibidores como aminoetioxilvinilglicina o ácido aminooxicético, la acumulación de etileno en los recipientes se puede reducir. Se puede agregar

tiosulfato o nitrato de plata al medio de cultivo para bloquear la unión de etileno a una proteína receptora que de otro modo desencadenaría una producción en cascada de etileno. Alternativamente, se puede utilizar un sistema abierto para permitir suficiente intercambio gaseoso con el ambiente externo (Tanaka, 1991). Este enfoque eliminaría el exceso de etileno acumulado en el del recipiente de cultivo por difusión, lo que permite un mejor crecimiento de las plántulas. Hay estudios que informan que el dióxido de carbono bloquea la acción del etileno (Abeles *et al.*, 1971), el CO₂ puede actuar como un inhibidor competitivo de la acción del etileno. El modo de acción exacto sigue sin estar claro a pesar de los efectos beneficiosos conocidos de CO₂ contra C₂H₄ (etileno).

4.2.4. FUENTE DE NITRÓGENO

Numerosos estudios han demostrado la captación preferencial de iones amonio en comparación con iones de nitrato por tejidos y plántulas de *Dendrobium*. También se observó que los embriones de *Cattleya* durante la germinación y las primeras etapas no pueden utilizar iones de nitrato. Solo pueden utilizar estos iones después de 60 días, que coincide con la aparición de la actividad nitrato-reductasa. Análisis químico de la composición del tallo en las copas de los bosques, muestra que el nitrógeno en forma de amonio es 40 veces mayor que el de nitrato. Por lo tanto, la absorción preferencial de amonio por las orquídeas le permiten obtener nitrógeno en el hábitat epífita con escasez de minerales.

4.2.5. INTENSIDAD DE LUZ

Debido a la concentración baja de CO₂ en un sistema cerrado convencional, la luz (o radiación fotosintética activa) se mantiene baja en aproximadamente 60-65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se sabe que al aumentar la concentración de CO₂ para plántulas *in vitro* promovería la fotosíntesis, dando lugar a una radiación fotosintética activa relativamente alta de 80 a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No hay datos disponibles sobre el efecto de la dirección de la iluminación en el crecimiento de las orquídeas. Los tubos fluorescentes que se apilan verticalmente para maximizar el uso del espacio, sin reducción de los niveles de radiación fotosintética activa, permite que las plántulas recibir más energía luminosa.

Este sistema proporciona un ahorro significativo de electricidad ya que se necesitan menores instalaciones de iluminación y refrigeración y las plantas pueden recibir luz uniformemente en todos los niveles. En comparación con el tratamiento de iluminación convencional, hay estudios que indican un aumento de 1.8 veces en materia seca y área foliar.

Se puede mejorar sistema de iluminación lateral mediante el uso de fibras ópticas difusivas o diodos emisores de luz (LED, fuente de luz puntual). Estas fuentes de luz producen menos calor y emiten menos energía radiante de onda larga que los fluorescentes, lo que permite colocarlas más cerca de los recipientes de cultivo. Las ventajas de los LED sobre otras fuentes de luz son de larga duración, pequeña masa y volumen y sin radiación infrarroja. Por ejemplo, unas matrices de 250 LED crean un campo uniforme de luz roja con intensidades equivalentes a la luz solar plena permaneciendo frío al tacto, a diferencia de muchas lámparas convencionales.

4.2.6. HUMEDAD RELATIVA

En los sistemas cerrados convencionales, la humedad relativa está generalmente en el rango de 70–90%. Esto plantea un problema durante el trasplante al campo donde la humedad relativa es más baja. Las plántulas *in vitro* normalmente poseen cutícula y estomas anormales y no pueden restringir la pérdida de agua en el ambiente exterior. La alta humedad también se asemeja a las condiciones de encharcamiento donde las plantas pueden producir más etileno. Los efectos nocivos de una humedad relativa alta se pueden superar fácilmente utilizando recipientes que permitan el intercambio gaseoso.

4.2.7. RECIPIENTES DE CULTIVO PERMEABLE A LOS GASES

El crecimiento de plántulas *in vitro* se ve muy afectado por el ambiente gaseoso en un sistema cerrado y este debe ser modificado para permitir suficiente intercambio gaseoso. Esto daría como resultado la eliminación del gas etileno y el suministro de niveles óptimos de CO₂.

Los recipientes de cultivo utilizados deben tener alta transmitancia de luz, baja permeabilidad al vapor de agua y propiedades químicamente inertes para el

crecimiento y desarrollo normales. Además, el sistema de cultivo permeable a los gases debe impedir la entrada de bacterias y hongos.

Se han desarrollado varios sistemas de recipientes abiertos que permiten suficiente intercambio gaseoso con el ambiente externo (Tanaka, 1991). Cuando el sistema abierto se combina con incrementos de CO₂ se mantiene un nivel alto de este y bajo nivel de etileno. Esta interacción positiva entre el sistema abierto y aumento de CO₂ puede servir para potenciar el crecimiento de plántulas de orquídeas *in vitro*.

4.2.8. TEMPERATURA

En su entorno natural, las plantas suelen experimentar temperaturas que fluctúan ampliamente, especialmente entre el día y la noche. Probablemente no es necesario imitar esta variación de día a noche, pero debe tenerse en cuenta que la temperatura diurna y nocturna no siempre ejercen los mismos efectos sobre el crecimiento de plantas (Langton y Cockshull, 1997).

El crecimiento de cultivos puede mejorarse al bajar la temperatura por la noche porque la respiración se reduce. Los efectos directos de la temperatura nocturna sobre el crecimiento pueden ser más variados. El aumento de la temperatura nocturna puede disminuir la longitud del entrenudo en algunas especies y aumentarla en otras. Otra ventaja de las temperaturas alternas es que ayudan al intercambio de gases en recipientes de cultivo (Chalupa, 1987). Sin embargo, tales variaciones no son esenciales y, en muchos laboratorios, los cultivos de tejidos son mantenidos en salas de crecimiento a la misma temperatura de noche y de día.

Para acelerar el crecimiento y la morfogénesis *in vitro*, los cultivos generalmente se mantienen en la media de temperaturas superiores a las que sería experimentado por las mismas plantas que crecen en vivo. La temperatura ambiente promedio de crecimiento constante empleado en una gran muestra de informes experimentales es de 25°C (con un rango entre 17 y 32°C). Plantas tropicales y subtropicales como algodón, arroz y cítricos tienden a ser cultivados a temperaturas ligeramente más altas que especies templadas (promedio 27,7 °C, rango 24-32 °C), donde se prefiere una fluctuación diurna.

No hay una sola temperatura definida para el cultivo de tejidos de cualquier especie, en la mayoría de los casos se determina por ensayo y error (Arditti, 2008). Tales diferencias generalmente tienen sólo efectos menores en la tasa de crecimiento o propagación. Muchos pequeños laboratorios de micropropagación tienen una única sala de crecimiento en la que la temperatura es bastante uniforme. Pueden propagarse diferentes tipos de plantas con éxito multiplicándose en tales condiciones, pero no son ejemplos frecuentes en la literatura para demostrar que diferentes especies de plantas pueden tener distintas temperaturas óptimas. Los cultivos de brotes de *Dicentra Spectabilis* proliferan más rápidamente a 22°C y el crecimiento de explantes y brotes es pobre a 27°C. Hay que tener en cuenta que, en habitaciones iluminadas, la temperatura interior de los recipientes de cultivo suele ser varios grados más alto que la temperatura ambiente, debido al efecto invernadero (Debergh, 1988). Además, la base de los recipientes suele ser más cálido que la parte superior. El establecimiento del explante, el crecimiento del cultivo, el desarrollo de plántulas y la morfogénesis, pueden depender de la temperatura.

El crecimiento lento de plántulas, la baja tasa de multiplicación, la vitrificación, el pobre enraizamiento, la alta mortalidad durante la aclimatación y las condiciones del cultivo (temperatura del aire, humedad relativa, luz) afectan directamente al desarrollo de las plantas (Chen, 2003, 2004, 2005).

La baja cantidad de clorofila verde en cultivos *in vitro* se debe en gran parte a la baja concentración de CO₂ en el contenedor durante los períodos de fijación de carbono. El crecimiento de plántulas *in vitro* se ve muy afectado por el ambiente gaseoso en un sistema cerrado. Avances recientes en el cultivo de tejidos de orquídeas demuestran la necesidad de permitir suficiente intercambio gaseoso Kozai (1991).

El crecimiento lento y la alta mortalidad durante la aclimatación son algunas consecuencias del crecimiento heterotrófico (Kozai, 1991).

(Cha-um, 2010) Concluye que las plántulas de *Phalaenopsis* aclimatadas, *in vitro* a baja temperatura del aire (15-25°C) y a baja humedad relativa (60 ± 5% RH), se adaptaron bien a las condiciones *in vivo*.

4.3. ANOMALÍAS FISIOLÓGICAS OCASIONADOS POR FACTORES FÍSICOS

4.3.1. HIPERHIDRATACIÓN (VITRIFICACIÓN)

A menudo, los brotes se regeneran bajo condiciones muy húmedas. Este ambiente en el interior los frascos de cultivo provocan anomalías fisiológicas y metabólicas (Ziv 1999; Kharrazi *et al.* 2011). Las plantas vitrificadas o hiperhidratadas, aparecen empapadas de agua, vidriosos, translúcidas, con hojas rígidas, gruesas y quebradizas. Otras anomalías asociadas a la vitrificación es una pobre diferenciación de tejido mesófilo (el tejido en empalizada está ausente o muy reducido), deficiencia de clorofila, pobre lignificación, mala diferenciación interna de cloroplastos, deposición defectuosa de cera en las hojas, los estomas permanecen abiertos incluso en la oscuridad y no responden al estrés hídrico. La hiperhidratación de los brotes es uno de los problemas más graves en la micropropagación comercial porque estos brotes anormales muestran una pobre respuesta al enraizamiento y supervivencia al trasplante.

El grado de hiperhidratación depende de la especie o incluso de la variedad, naturaleza física del medio de cultivo, tipo de recipiente de cultivo, tipo y cantidad de agente gelificante, concentración y tipo de citoquinina (Debergh 1987). Mejorando la aireación para reducir humedad en el interior del recipiente de cultivo mediante la utilización de cierres que permiten el intercambio gaseoso, utilizando un agar de alta fuerza gelificante, baja concentración de NH_4 y citoquininas, se puede reducir la respuesta de hiperhidratación de las plantas *in vitro*.

4.3.2. PARDEAMIENTO OXIDATIVO (OXIDACIÓN)

Muchas plantas leñosas y algunas especies herbáceas, cuando se cultiva *in vitro* causan el pardeamiento del medio de cultivo. A veces el dorado es tan intenso que los explantes también toman color marrón o negros, se vuelven necróticos y finalmente mueren (Ko *et al.* 2009). Los explantes liberan fenoles que se oxidan dando lugar a productos que pueden ser fitotóxicos y provocan

este oscurecimiento del medio. El grado de pardeamiento depende de la especie o genotipo de las plantas, edad del tejido (los tejidos más viejos muestran más pardeamiento), temporada de inicio del cultivo (más en inviernos y otoño) y composición del medio. Un método simple para proteger el explante es moverlo frecuentemente (cada 2-3 días) dentro el mismo recipiente o colocarlo en uno nuevo. La fotoxidación de fenoles se puede reducir manteniendo los cultivos inicialmente en oscuridad. Elementos como Mn_2 y Cu_2 , que son cofactores de las enzimas peroxidasa y fenolasa, respectivamente, deben reducirse o eliminarse para inactivar estas enzimas y prevenir el pardeamiento (Debergh y Read 1991). Algunas veces la adición de compuestos como ácido ascórbico, cisteína-HCl o ácido cítrico (antioxidantes) al medio de cultivo ayuda a controlar el pardeamiento de los explantes y el medio. La adición de 0,01% de ácido ascórbico al medio no solo evita el pardeamiento letal de los brotes, también aumentó considerablemente el número de plántulas formadas. Sin embargo, el ácido ascórbico fue efectivo sólo si se añadió a la superficie del medio de cultivo; y es ineficaz si se incluye en el medio antes de esterilizar en autoclave. El tratamiento más efectivo para combatir el problema de pardeamiento en explante en cultivos de segmentos de hojas de *Sideritis trojana* fue una combinación de 100 mg/l de ácido ascórbico y 50 mg/l de ácido cítrico (Cördük y Aki 2011). Otros suplementos al medio que han ayudado a prevenir el pardeamiento son la polivinilpirrolidona (PVP) y carbón activado que adsorben fenoles.

5.MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. MATERIAL VEGETAL

Para la realización del presente Trabajo de Fin de Grado se utilizaron protocormos y plántulas procedentes de cruces de *Phalaenopsis* y *Cymbidium* de variedades comerciales. El material vegetal pertenece al laboratorio de Fitopatología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria, obtenido de otros ensayos anteriormente.

5.1.2. ESTERILIZACIÓN

Es fundamental que todo el material vegetal utilizado, así como las diferentes herramientas, zonas de trabajo y los medios de cultivos deben de estar esterilizado. Sin esta esterilización y un manejo muy cuidadoso para garantizar un medio aséptico los cultivos se contaminarán y morirán.

Para garantizar esta esterilidad hay varios métodos:

Autoclave:

Para la eliminación de cualquier espora de microorganismo es fundamental someter los medios de cultivos, una vez preparados, a unas condiciones de temperatura y presión que pueda esterilizarlos. Una maquina autoclave puede generar estas condiciones garantizando una desinfección total.

Normalmente estas máquinas disponen de varias opciones de configuración. Generalmente para los medios de cultivo se utiliza un ciclo de 30 minutos a una temperatura de 121 ° C y 1,2x10⁵ Pa de presión. Junto con los medios de cultivo también colocamos todo el material que se va a utilizar durante la plantación. La duración del ciclo es aproximadamente de 3 horas desde que se cierra y comienza a calentar, hasta que se enfríe y baja la presión para poder abrirla.



Foto1: Auto clave SELECTA modelo AUTESTER

Todos los compuestos inorgánicos que contienen las diferentes fórmulas de los medios de cultivo como azúcares, agar macroelementos y microelementos, y los aditivos orgánicos como el agua de coco, el hidrolizado de plátano, peptona, etc. No se ven afectados por esta temperatura.

LLama abierta:

Durante el proceso de plantación en la cámara de flujo laminar se utiliza un quemador de gas butano, mechero Bunsen, para garantizar la esterilización de los cuellos de las botellas donde se guardaba el material vegetal utilizado en el trabajo. También para esterilizar continuamente toda la herramienta, como bisturí y pinzas, que se va utilizando mientras se hacen los cultivos.



Foto2: Mechero Bunsen

Líquidos desinfectantes:

Todas las áreas de trabajo, tejidos, aparatos, recipiente o cualquier material que no pueda ser sometido al proceso de autoclave se desinfectó con líquidos desinfectante.

Para realizar estas desinfecciones utilizamos un desinfectante llamado ANIOXYDE 1000. Es un producto para desinfección en frío de alto nivel utilizado para material termosensible de laboratorio, quirúrgico o endoscopia entre otros. Compatible con todo tipo de recipientes y mesas de laboratorio.

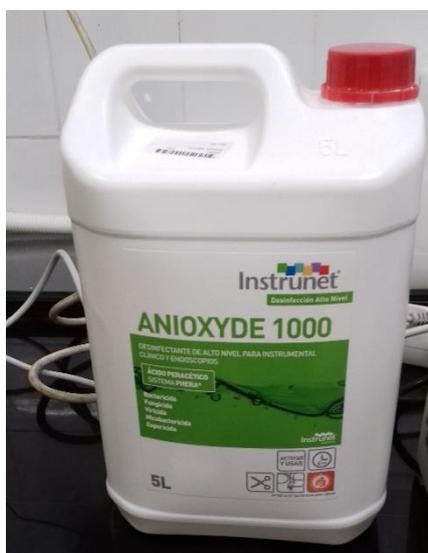


Foto3: Desinfectante ANIOXYDE 1000

Es un potente bactericida, viricida, fungicida y esporicida a base de ácido peracético, peróxido de hidrógeno, caprolactama y propan-2-ol.

El producto se presenta en una garrafa de 5 litros y se ha de activar mediante la adición de un activador (acetilcaprolactama, 2-propanol y excipientes) que se vende conjuntamente con la garrafa. Una vez activado el producto permanece estable durante 15 días.

También se han utilizado otros productos desinfectantes como alcohol, lejía y detergentes para limpiar algunos recipientes e instrumental.

5.1.3. RECIPIENTES DE CULTIVO

Se ha optado por la utilización de recipientes plásticos de polipropileno, de la casa Duchefa Biochemie, modelo ECO2BOX, de 80 mm de altura y 125 x 65 mm de base. Este tipo de recipiente no resiste la esterilización en máquinas de autoclave, por lo que vienen empaquetadas en grupos de 25 recipientes con garantía de esterilización. El paquete se desinfecta bien con líquido desinfectante y se abren dentro de la cámara de flujo laminar.

Para el ensayo de *Cymbidium* También se utilizan estos recipientes de plástico y otros de cristal sin intercambio gaseoso pertenecientes al laboratorio de Fitopatología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria.

5.1.4. pH-METRO

Es muy importante ajustar el pH del medio a lo recomendado en cada caso para un buen desarrollo de la planta. Se ha de contar con un medidor de pH y se ajusta usando NaOH, KOH o HCl diluido. En la mayoría de los medios se suele ajustar a un pH en torno a 5,5-5,8. En nuestro estudio se contó con un medidor de pH modelo SENSION™+ pH3 de la casa HACH.

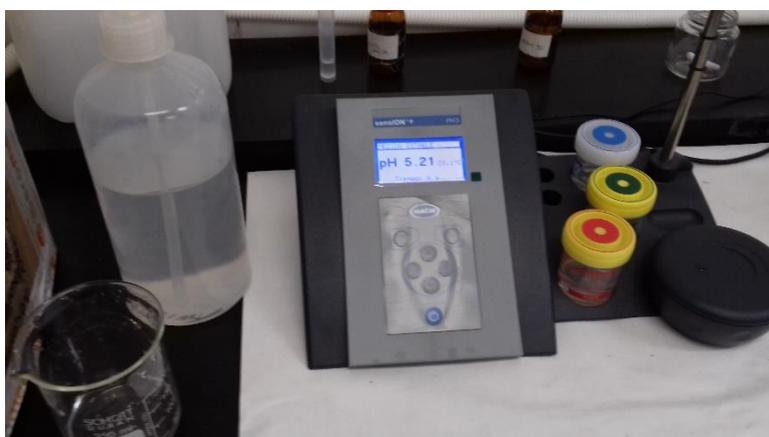


Foto4: pH metro SENSION+ PH3

5.1.5 AGITADOR-CALEFACTOR

Para la elaboración de los medios es esencial contar con agitador-calefactor que permite mezclar y llevar a ebullición los medios.



Foto5: Calefactor- agitador

5.1.6 CAMPANA DE FLUJO LAMINAR

La campana de flujo laminar es el mejor método para asegurar un área de trabajo estéril. Estas campanas producen un flujo de aire continuo totalmente filtrado y libre de partículas hacia el operador evitando la contaminación de los cultivos.



Foto6: Cámara de flujo laminar

Cuando se trabajar en la cámara de flujo laminar hay que tener en cuenta una serie de reglas:

1. Encender la cámara de flujo laminar junto con la luz entre 15 y 20 minutos antes de comenzar a realizar las labores en ella.
2. La luz ultravioleta se debe apagar cuando se vayan a comenzar los trabajos dentro de la cámara.
3. Desinfectar por completo, usando alcohol etílico al 70% de concentración. Usar un difusor y limpiar todas las superficies de la cámara con un algodón o gasa empapado en alcohol, incluyendo las paredes laterales, superior y filtro. Se debe desinfectar tanto antes como después de utilizar la cámara.
4. Todo lo que entre en la cámara fue previamente esterilizado. Los materiales autoclavados, así como los envoltorios que contienen los guantes y bisturís asépticos, se limpiaron con un algodón con lejía antes de meterlos en la cámara para asegurarnos de que ningún agente patógeno ingrese en ella.
5. Se usará un mechero Bunsen dentro de la cámara para esterilizar de forma rápida, a través de calor, los materiales tales como pinzas o bisturís, así como los cuellos y las tapas de los tubos de vidrio.
6. Cualquier espora de bacteria u hongo dentro de la cámara flotará hacia el exterior y en dirección al operador. Nunca hay que poner las manos, mangas u otro objeto sobre o en dirección a algo desinfectado (como el medio). Realizar movimientos leves, evitando crear turbulencias de aire que puedan ocasionar contaminación.
7. Mantener las condiciones de esterilización de la cámara mediante la limpieza con alcohol, desinfectar los instrumentos después de su uso, así como cambiar de guantes o rociarlos generosamente con alcohol si se ha tenido contacto con cualquier objeto fuera de la cámara. Prestar especial atención en no tocarse la cara o el pelo.

5.1.7 HERRAMIENTAS Y UTENSILIOS

Además de todo lo expuesto es necesario contar con vasos de precipitado, balanza de precisión, cucharas, pinzas, Bata, Gafas, Gorro, Guantes desechables Mascarilla higiénica y toda aquella herramienta de laboratorio que nos pueda ser útil para elaborar los medios y realizar las plantaciones.



Foto7: Balanza de precisión y producto para elaborar medios

5.1.8. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados en el trabajo fueron:

5.1.8.1. ICHIHASHI (NP) MEDIUM ORCHID MAINTENANCE (I 365)

Se consultó a la empresa de Estados Unidos PhytoTechnology Laboratories, especialista en productos para micropropagación por sus productos para realizar este ensayo. En su respuesta nos recomendaron 2 productos específicos para *Phalaenopsis*, uno es este, I365.

Este medio se prepara a una concentración de 25,35 g/l y al que solamente hay que añadir 8 g/l de agar y ajustar el pH a 5,7.

Tabla1: Composición I365 en mg/l

Ammonium Nitrate	82	Potassium Nitrate	424
Ammonium Sulfate	303.9	Potassium Phosphate, Monobasic	462.7
Boric Acid	3.1	Zinc Sulfate•7H ₂ O	4.3
Calcium Nitrate	637.6	Gellan Gum, CultureGel – Biotech	3000
Cobalt Chloride•6H ₂ O	0.0125	Glycine (Free Base)	2
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.0125	myo-Inositol	100
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.3	Nicotinic Acid (Free Acid)	0.5
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.8	Pyridoxine•HCl	0.5
Magnesium Nitrate	256.4	Sucrose	20,000
Manganese Sulfate•H ₂ O	11.2	Thiamine•HCl	0.1
Molybdc Acid (Sodium Salt) •2H ₂ O	0.125		
Potassium Iodide	0.415		

Fuente: PhytoTechnology Laboratories

5.1.8.2 Orchid Maintenance Medium with Charcoal (P 668)

Este es el segundo producto recomendado por PhytoTechnology Laboratories. Se prepara en una concentración de 27,31 g/l, hay que añadirle 8 g/l de agar y ajustar el pH a 5,7.

Tabla2: Composición P668 en mg/l

Ammonium Nitrate	825	Potassium Phosphate, Monobasic	85
Boric Acid	3.1	Zinc Sulfate•7H ₂ O	5.3
Calcium Chloride, Anhydrous	166	Activated Charcoal	2000
Cobalt Chloride•6H ₂ O	0.0125	MES (Free Acid)	1000
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.0125	myo-Inositol	100
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.3	Nicotinic Acid (Free Acid)	1
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.85	Peptone from Meat	2000
Magnesium Sulfate, Anhydrous	90.35	Pyridoxine•HCl	1
Manganese Sulfate•H ₂ O	8.45	Sucrose	20,000
Molybdic Acid (Sodium Salt) •2H ₂ O	0.125	Thiamine•HCl	10
Potassium Iodide	0.415		
Potassium Nitrate	950		

Fuente: PhytoTechnology Laboratories

5.1.8.3 MURASHIGE AND SKOOG MÉDIUM + LEVADURA

El medio MS fue inventado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962 y se usa en muchos procedimientos de micropropagación vegetal incluido las orquídeas.

Tabla 3: composición del medio MS (Murashige & skoog)

Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1.65 g/l
KNO ₃	1.9 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37 g/l
CaCl ₂ .aq	0.33 g/l
KH ₂ PO ₄	0.17 g/l
Micronutrientes	
KI	0.83 mg/l
H ₃ BO ₃	6.2 mg/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 mg/l
Na ₂ .EDTA	37.3 mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8 mg/l
Vitaminas	
Myo-Inositol	100 mg/l
Acido Nicitínico	0,5 mg/l
Piridoxina HCl	0,5 mg/l
Tiamina HCl	0,1 mg/l
Glicina	2 mg/l

Fuente: BIOSIGMA

Para el ensayo se compró un medio MS comercial. Las concentraciones propuestas para este medio son:

2 g/l MS.

200 ml/l agua de coco.

2 g/l de levadura en polvo Royal Baking Powder

pH 5,6-5,7

8 g/l de agar

5.1.8.4. MURASHIGE AND SKOOG MÉDIUM + BA

Medio sacado del estudio de los investigadores Wee-Peng Gow, Jen-Tsung Chen, Wei-Chin Chang (2008) "Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of Phalaenopsis orchids".

2,15 g/l MS.

200 ml/l agua de coco.

10 mg/l BA.

10 mg/l adenine sulfate

pH 5,7

8 g/l de agar

5.1.8.5. HYPONEX

Este medio está basado en el estudio publicado por los profesores Kee Yoeup Paek, Eun Joo Hahn, and So Young Park “Micropropagation of *Phalaenopsis* Orchids via Protocorms and Protocorm-Like Bodies”, de Corea del Sur. Se caracteriza por realizarse a partir de abonos comerciales.

Tabla 4: composición medio Hyponex para diferentes fases del cultivo

Component	Seed germination	Protocorm multiplication (PM)	First trans-planting (1st TP)	Second trans-planting (2nd TP)
<i>Hyponex (g/L)</i>				
N:P:K = 6.5:6:19	3.0	1.0	1.0	1.0
N:P:K = 20:20:20		1.0	1.0	1.0
Adenine sulfate (mg/L)	5.0			
Peptone (g/L)		2.0	2.0	3.0
Coconut water (%)	20	10	10	
Potato or banana homogenate (g/L)		30–100		30–100
Activated charcoal (%)	0.05	0.05	0.05	0.05

Fuente: Paek K. (2011)

1 g/l Hyponex N:P:K 6,5 :6:19

1 g/l Hyponex N:P:K 20:20:20

2 g/l Peptona.

100 ml/l agua de coco.

30 g/l homogeneizado de plátano (o papa).

0,5 g/l carbón activo.

pH 5,5.

8 g/l agar

5.2. MÉTODOS

5.2.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO

Los pasos seguidos a la hora de elaborar los medios son los siguientes:

- 1- Calibrar el pH-metro. Esto hay que realizarlo al menos una vez cada 7 días.
- 2- Medir volumen correcto de agua destilada y colocarlo en recipientes donde luego se hervirá.
- 3- Añadir al agua destilada todos los aditivos que se necesiten para realizar el medio que se desee menos el agente gelificante, en nuestro caso agar, ya que el agar se disuelve a temperatura alta y hay que hacer una corrección de pH antes de calentar.
- 4- Agitar y disolver bien todos los componentes
- 5- Medir pH en frío y rectificarlo con ácido o hidróxido hasta alcanzar el pH recomendado para cada formula.
- 6- Añadir el agente gelificante (agar) y calentar el medio hasta llevar a ebullición sin dejar de agitar.
- 7- Dejar enfriar el medio hasta los 50°C para realizar otra medida de pH y volver a rectificarlo hasta el valor deseado. Por debajo de 50°C el gelificante comienza a coagular y dificulta mucho el poder realizar la medida del pH.



Foto8: Ajuste de pH

- 8- Colocar los medios en recipientes que soporten el proceso de autoclave y someterlos al proceso de esterilización. En nuestro caso al contar con recipientes para los cultivos que no soportan el autoclave, la esterilización de los medios se hace independientemente de los recipientes.



Foto9: Esterilización en autoclave

- 9- A no contar con recipientes que soporten el autoclave, hay que sacar los medios de cultivo del autoclave antes de que la temperatura baje de 50°C y comience a coagular. Es un proceso que se ha de realizar con rapidez y evitando que se pueda contaminar. Los medios se pasan a los recipientes en la cámara de flujo laminar dispensando en cada uno de ellos 200 cm³. de medio.
- 10- Se deja enfriar los medios en los recipientes hasta que se enfríen y coagule el medio. Una vez frío ya se puede realizar la plantación en ellos con el material vegetal previamente seleccionado.
- 11- Se realizan la plantación dentro de la cámara de flujo laminar con sumo cuidado de que no se contamine, desinfectando todo el

material cada poco tiempo con liquido desinfectante o con calor por medio de llama abierta.



Foto 10 y 11: Repicado en cámara de flujo laminar

12-Terminada la plantación se etiqueta cada recipiente indicando fecha de plantación, medio de cultivo y material vegetal utilizado.



Foto12 y 13: Etiquetado y clasificación

13-Colocación en zona adecuada de iluminación y climatización.



Foto14: Sala de cultivo con iluminación y climatización

5.2.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Las condiciones de luz y temperatura son fundamentales para un buen crecimiento y desarrollo de los protocormos y tener éxito en este tipo de cultivo. En todo momento estas condiciones deben estar controladas por climatizador y luz artificial.

5.2.2.1 TEMPERATURA

La temperatura es un factor muy determinante. La decisión de realizar el ensayo a una temperatura de 17 °C viene determinada por estudios anteriores del departamento de fitopatología de Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria de la ULL, donde se realizaron ensayos de prueba y error a diferentes temperaturas para 5 géneros de orquídeas (*Phalaenopsis*, *Cymbidium*, *Laelia*, *Cattleya* y *Epidendrum*). En dichos estudios se comenzó a temperatura de 25°C de día y 14°C de noche, dando lugar a una mortalidad elevada en los cultivos realizados en medio P6668. Progresivamente se fue bajando la temperatura a 20°C y luego a 18°C y para finalizar a 17°C. Según bajaba la temperatura la mortalidad descendía, quedando demostrado que una

temperatura de 17°C puede ser la más apropiada. También se comprobó que durante la reforma de la cámara de cultivo se produjo temperaturas muy altas que ocasionaron problemas de vitrificación y oxidación.

Para mantener la temperatura se cuenta con un sistema de aire acondicionado de la marca Junkers, que proporciona una temperatura constante las 24 horas del día.



Foto15: Equipo de aire acondicionado JUNKERS

5.2.2.2 ILUMINACIÓN

Se utilizaron lámparas de tubo fluorescentes de luz blanca, siendo las más recomendadas tanto por su espectro de emisión como por su intensidad. Se colocó a una altura de 50 cm del cultivo.

La duración del fotoperiodo diario fue de 16h de luz y 8 de oscuridad durante todo el cultivo.



Foto16: Iluminación del ensayo

5.2.3 MANEJO *IN VITRO*

Para evaluar la regeneración de *Phalaenopsis*, se utilizan cinco medios diferentes, con cinco repeticiones cada uno: P668, Ichihashi, Hyponex, Murashige & Skoog más levadura, y Murashige & Skoog más BA; en *Cymbidium*, se ensaya dos medios con diez repeticiones cada uno: P668 y Hyponex. Por otro lado, para la elección del contenedor, se utilizan dos modelos: uno de cristal sin intercambio gaseoso y otro de plástico con intercambio gaseoso. En ambos ensayos se utiliza un volumen de 200 cm³ de medio sólido por recipiente a 17°C constante con 16 horas de luz artificial y 8 horas de oscuridad

La manipulación de los protocormos y plántulas se realizó en la cámara de flujo laminar. Con todo el material desinfectado se procede a pasar el protocormo de su recipiente al nuevo medio mediante pinzas y cuchara, colocándolos de forma cuidadosa y homogénea en los nuevos recipientes con el medio ya solidificado y esterilizado. Una vez terminado el trasplante se cierra herméticamente, se etiqueta y es colocado en la zona donde se va a desarrollar el cultivo.

5.2.4. CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE LOS EXPLANTOS

A partir de la primera semana y, hasta la semana final del ensayo, se contabilizó periódicamente la mortalidad de plántulas y la evolución del crecimiento. También se realizó un seguimiento fotográfico.

5.2.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO

De las 25 muestras realizadas para *Phalaenopsis* se toman 5 al azar para realizar las mediciones, una de cada medio empleado. Se miden el desarrollo de la raíz y de las hojas. (foto 22)

En el cultivo realizado en *Cymbidium* en botes de cristal y de plástico se realizó un seguimiento visual semanalmente.

Para determinar si hay diferencias en el desarrollo de las plántulas en los diferentes medios, se realizó un análisis de medias de las hojas y de las raíces, por medio de pruebas paramétricas para determinar si hay diferencias entre las medias utilizando el análisis de varianza (ANOVA $p < 0,05$). Mediante la prueba de Tukey, en caso de existir diferencias en el resultado del análisis ANOVA, se analiza entre que medios hay diferencias significativas.

5.2.6. COMPROBACIÓN DE LA ADAPTACIÓN EXTERNA (EX VITRO)

Las plantas extraídas de las cinco cajas del ensayo para realizar las medidas sus plántulas para confeccionar el estudio estadístico, se trasplantan a multipost con sustrato de corteza de pino finamente triturada, manteniendo las plantas constantemente hidratada en una solución a base de agua de lluvia al que se le añade un abono complejo 20-20-20 a razón de 5 g / L., alternado con un abono simple a base de nitrato cálcico ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) a 5 g/ L. Colocándolas en el umbráculo del invernadero de la caja, bajo malla del 80%.

6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después 36 semanas de cultivo *in vitro* los resultados con las nuevas condiciones ambientales en la cámara de cultivo, 17°C de temperatura constante, han sido los siguientes:

En estudio previos, los vasos de cristal con el medio de cultivo comercial sólido de la marca Sigma® denominado P6668, con tapa metálica y sellados con papel de film transparente de los géneros *Cymbidium*, *Cattleya*, *Laelia* y *Epidendrum* junto a otros con *Phalaenopsis* en medio de cultivo de MS + BA, que también sufrieron estrés por altas temperaturas (foto 23), no presentan daños por oxidación ni vitrificación.

Se contabilizan dos cajas de plástico con intercambio gaseoso contaminadas de mohos. En contenedor de cristal no hubo contaminación.

En los medios ensayados, los recipientes de cristal con tapas metálicas y selladas con papel de film transparente y los recipientes plásticos con intercambio gaseoso, no presentan daños por oxidación ni vitrificación.

Según los datos estadístico ANOVA se puede apreciar una diferencia significativa entre los diferentes medios utilizados ($p < 0,05$), tanto para hojas como para raíz.

Tabla 5. Resultados del análisis ANOVA de la influencia de los medios de cultivo en el crecimiento de las hojas

Factor	SS	df	MS	F	P value	F crit
Medios de cultivo	89,641	4	22,4104167	15,4959403	1,5095E-08	2,53968

Tabla 6. Resultados del análisis ANOVA de la influencia de los medios de cultivo en el crecimiento de las raíces

Factor	SS	df	MS	F	P value	F crit
Medios de cultivo	289,48553 8	4	72,3713846	10,1422766	2,4431E-06	2,5252151

Una vez demostrada que existen diferencias significativas en el comportamiento de los medios, usamos el análisis Tukey para ver entre que medios hay diferencias significativas.

Tabla 7. Resultados del análisis Tukey para hojas

<i>group 1</i>	<i>group 2</i>	<i>p-value</i>
hiponex	ba	4,0454E-07
hiponex	paula	5,5541E-07
hiponex	i365	1,5586E-07
hiponex	p668	0,00010469
ba	paula	0,99998786
ba	i365	0,99904473
ba	p668	0,54936001
paula	i365	0,99705546
paula	p668	0,60323278
i365	p668	0,39412312

Tabla 7. Resultados del análisis Tukey para raíz

<i>group 1</i>	<i>group 2</i>	<i>p-value</i>
hiponex	ba	9,7729E-06
hiponex	paula	2,3355E-05
hiponex	i365	0,00068202
hiponex	p668	0,07525735
ba	paula	0,99930607
ba	i365	0,75738971
ba	p668	0,0509926
paula	i365	0,87414046
paula	p668	0,08915473
i365	p668	0,49378203

En el análisis Tukey se observa que el medio Hiponex muestra una diferencia significativa con el resto de medios, tanto para el desarrollo de hojas como de raíces, siendo menor la diferencia con respecto al medio P668.

Según los datos documentados y los resultados estadísticos expuestos, el medio Hyponex [1gr / L NPK (20-20-20) + 1gr / L NPK (6.5-6-19)] recomendado por Paek K. (2011), ha mostrado ser el más adecuado en el desarrollo

vegetativo y radicular, con raíces entre 8-10 cm de longitud y hojas grandes de 5-8 cm de color verde intenso y brillante, en un periodo de 36 semanas (foto 17). El medio comercial P668 de la empresa Phytotechlab se muestra como un producto válido para la obtención de plantas, si bien no es tan apropiado como el medio Hyponex, desarrolla plantas de tamaño medio con raíces de 5-8 centímetros en las plantas mayores (foto 18). En el medio MS-BA, (Wee-Peng G. *et al.*, 2008) al contrario de lo que se esperaba, no se obtuvieron resultados favorables en cuanto al desarrollo de plántulas. El crecimiento vegetativo es despreciable, obteniendo plantas de pequeño tamaño y con raíces muy cortas (foto 19). El medio denominado MS+ levadura, no ha conseguido desarrollar plantas adecuadamente (foto 20). Las pocas que han crecido en este medio muestran decoloración y poco desarrollo de raíz. En el medio I365 se han desarrollado plantas de pequeño tamaño y raíz corta (foto 21).

Las condiciones de la cámara de cultivo del Laboratorio de Fitopatología y Genética, antes de las modificaciones estructurales, eran algo similares a las descritas por otros trabajos (Hernández Padilla, 2016), donde se registraron los datos de temperatura a lo largo del año obteniendo una temperatura media anual de 23,2°C, con mínimas de 18,6°C y máximas de 27,3°C. Las plántulas de *Phalaenopsis* obtenidas *in vitro*, se adaptaron a las condiciones exteriores de cultivo utilizando como recipientes vasos cristal con tapa metálica sellados con papel de film transparente y medio de cultivo comercial sólido de la marca Sigma® denominado P6668, no presentando ningún daño de oxidación ni vitrificación en este ensayo (foto 25 y 26).

Desde el día 15 de agosto de 2020, las plantas trasplantadas y colocándolas en el umbráculo en el invernadero, bajo malla del 80%, no presentado hasta la fecha problemas de aclimatación *ex vitro*.

7.CONCLUSIÓN

7. CONCLUSIÓN

1º. A temperatura constante de $17^{\circ}\text{C} \pm 1$, los recipientes de cristal con tapa metálica sellados con papel de film transparente y los recipientes plásticos con intercambio gaseoso no presentan ningún daño por oxidación ni vitrificación en los medios ensayados: Hyponex [1gr / L NPK (20-20-20) + 1gr / L NPK (6.5-6-19)]; P668; MS (Murashige y Skoog, 1962)+ BA; MS (Murashige y Skoog, 1962)+ levadura; Ichihashi.

2º. Se cita por primera vez la temperatura constante de $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ de la cámara de cultivo *in vitro*. La temperatura constante permite el crecimiento óptimo de los géneros de orquídeas comerciales de: *Cattleya*, *Cymbidium*, *Epidendrum*, *Laelia* y *Phalaenopsis*.

3º. El medio Hyponex que contiene [1gr / L NPK (20-20-20) + 1gr / L NPK (6.5-6-19)] ha demostrado ser el más apropiado en los recipientes plásticos con intercambio gaseoso según el estudio estadístico.

4º. El medio comercial P668 de la empresa Phytotechlab se muestra como un producto a tener en cuenta a la hora de obtener material vegetal, si bien no es tan eficiente como el medio Hyponex. Es capaz de desarrollar plantas de un tamaño con raíces de 5-8 centímetros, en las plantas más desarrolladas.

5º. En el medio MS-BA el crecimiento vegetativo es poco significativo, obteniendo plantas de pequeño tamaño y con raíces muy cortas.

6º. El medio denominado MS+ levadura, no ha conseguido desarrollar plantas viables, presentando decoloración y poco desarrollo radicular.

7º. En el medio I365 se han obtenido plantas de pequeño tamaño a nivel foliar y radicular.

8º. Las plántulas colocadas en el umbráculo bajo malla del 80%, no han presentado hasta la fecha problemas de aclimatación *ex vitro*.

7. CONCLUSIONS

1°. At a constant temperature of $17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, the glass containers with a metal lid sealed with plastic wrap and the plastic containers with gas exchange do not present any damage by oxidation or vitrification in the tested media: Hyponex [1gr / L NPK (20-20-20) + 1gr / L NPK (6.5-6-19)]; P668; MS (Murashige and Skoog, 1962) + BA; MS (Murashige and Skoog, 1962) + yeast; Ichihashi.

2°. The constant temperature of $17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}$ of the in vitro culture chamber is mentioned for the first time. The constant temperature allows optimal growth of the commercial orchid genera of: Cattleya, Cymbidium, Epidendrum, Laelia and Phalaenopsis.

3°. The Hyponex medium that contains [1gr / L NPK (20-20-20) + 1gr / L NPK (6.5-6)] has proven to be the most appropriate in plastic containers with gas exchange according to the statistical study.

4°. The commercial medium P668 from the company Phytotechlab is shown as a product to take into account when obtaining plant material, although it is not as efficient as the Hyponex medium. It is capable of developing plants of a size with roots of 5-8 centimeters, in the most developed plants.

5°. In the MS-BA medium the vegetative growth is not very significant, obtaining plants of small size and with very short roots.

6°. The medium called MS + yeast has not managed to develop viable plants, showing discoloration and little root development.

7°. In the I365 medium, small plants have been chosen at the foliar and root level.

8°. The seedlings placed in the shade under 80% mesh, have not presented ex vitro acclimatization problems to date.

8.BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles F. B. **Ethylene Air Pollution**: Effects of Ambient Levels of Ethylene on the Glucanase Content of Bean Leaves. *Plant Physiology*.1971
- Arditti, J. *Micropropagation of Orchids*. 2ª ed. Irvine,California: blackwell publishing, 2008.
- Arditti,J. *Clonal propagation of orchids by means of tissue culture – a manual, Orchid biology: reviews and perspectives*, Volume 1. Ithaca, NYCornell niversity.1977
- Bairu, Michael W, Stirk, Wendy A., Van Staden, Johannes. Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2009. 98
- Balilashaki k., Vahedi M., Karimi R. In vitro Direct Regeneration from Node and Leaf Explants of Phalaenopsis cv. 'Surabaya'. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*.2015. 25(2):193-205
- Bartosz G Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant*. 1997. 19: 47-64.
- Buddendorf-Joosten J MC; Woltering E J. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro. *Plant Growth Regulation*. 1994.
- Calupa V. Temperature. In Bonga J.M. and Durzan D.J. *Cell and Tissue Culture in Forestry*.Vol. 1. Boston, Martinus Nijhoff Publishers. 1987, pp. 142-151.
- Cha-Um S., Ulziibat B., Kirdmanee C. Effects of temperature and relative humidity during in vitro acclimatization, on physiological changes and growth characters of Phalaenopsis adapted to in vivo. *Australian Journal of Crop Science*.2010. 4(9):750-756
- Chen, C. Development of a heat transfer model for plant tissue culture vessels. *Biosyst*. 2003. Eng. 85, 67–77.

- Chen, C. Humidity in plant tissue culture vessels. *Biosyst.* 2004. Eng. 88, 231–241.
- Chen, C. In situ measurement of microclimate for the plantlets cultured invitro. *Biosyst.* 2007. Eng. 95, 413–423.
- Chen, C. Lighting distribution models of fluorescent for plant micropropagation. *Biosyst.* 2005. Eng. 90, 295–306.
- Chingwen H.; Chiachung C., Physical Properties of Culture Vessels for Plant Tissue Culture. *Biosystems Engineering.* 2005
- Cördük N., Aki C. Inhibition of Browning Problem During Micropropagation of *Sideritis trojana* Bornm., an Endemic Medicinal Herb of Turkey. *Romanian Biotechnological Letters.*2011
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Von Arnold S, Zimmerman R & Ziv M. Reconsideration of the term ‘vitrification’ as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1992. 30, 135–140
- Debergh P. Micropropagation of woody species -state of the art on in vitro aspects. *Acta Hortic.* 1988, 227, 287-295
- Debergh P., Read P.E. Micropropagation. In Debergh, P. and Zimmerman, R.H., Eds., *Micropropagation. Technology and Application.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,1991, p 1-14.
- Ernst W. H. O. , Verkleij J. A. C. , Schat H. Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica.*1992. 41,229-249
- Fujiwara, K., Kozai, T. Physical microenvironment and its effects. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M. (Eds.), *Automation and Environment Control inPlant Tissue Culture.* New York. *Kluwer Academic Publishers.* 1995 pp. 319–369.
- George, E., Davies, W. Effects of the physical environment. In: George, E., Hall,M., de Klerk, G. (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture.* vol. 1. Springer Verlag. 2008. pp. 423–464.

- Ghashghaie J; Brenckmann F; Saugier B. Water relations and growth of rose plants cultured in vitro under various relative humidities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.1992. 30, 51–57.
- Gille G & Sieglar K. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol.* 1995. 40: 131–152
- Gow W., Chen J., Chang W. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of Phalaenopsis orchids. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2008
- Hernández Padilla, A. *Evaluación de medios de cultivo para la propagación masiva de Phalaenopsis*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de La Laguna. 2016
- Hippeli S & Elstner EF Mechanism of oxygen activation during plant stress:biochemical; air pollution. *J. Plant Physiol.* 1996. 148: 249–257
- Hsu, H., Chen, C. The effect of light quality on the growth characteristics of invitro cultures of Phalaenopsis. *Propag. Ornam. Plants*. 2007. 10, 3–8.
- Kharrazi M. *et al.* In Vitro Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Focusing on the Problem of Vitrification. *J. Biol. Environ. SCI.*, 2011,
- Kozai, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. *Chapter*, 1991
- Kozai, T. Photoautotrophic micropropagation – environmental control forpromoting photosynthesis. *Propag. Ornam. Plants*. 2010. 10, 188–204.
- LangtonF., Cockshull K. Is stem extensión determined by DIF or by absolute day and night temperatures? *Sci. Hortic.* 1997, 69, 229-237.
- Lava J. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Path. Biol.* 1996. 44: 14–24
- Paek K., Seung-Yong Park S. Micropropagation of Phalaenopsis Orchids via Protocorms and Protocorm-Like Bodies. *Methods in molecular biology*. 2011.

- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW & Vogelstein B A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. 1997. 389: 300–305
- Preece J E; Sutter E G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh P C; Zimmerman R H, eds. *Micropropagation: Technology and Application*. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers,.1990. pp 71–93.
- Pospisilova, J., Catsky, J., Sestak, Z. Photosynthesis in plants cultivated in Vitro. In: Pessaraki, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Second ed. NY, USA, *Marcel Dekker, Inc.* 1997.
- Sharifi G., Mirmasoumi M., Zahed Z. Malihe Entezari Effects of culture medium and supplementation on seed germination, protocorm formation and regeneration of some Phalaenopsis hybrids. *Progress in Biological Sciences*. 2016. Vol. 6, Number 2
- Sies H. Oxidative stress. *Amer. J. Med.* 1991. 91: 31S–38S
- Sreeramanan S., Rathinam X. Ranjetta P. Establishment of in Vitro Phalaenopsis Viola Plant Cultures from Flower-stalk Cuttings. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 2009. 3(33):432-437
- Tanaka M., *et al.* Practical Application of a novel disposable film culture vessel in micropropagation. *Acta horticulturae*. 1991
- Wiseman H & Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem*. 1996. 313: 17–29
- Ziv M. Organogenic Plant Regeneration in Bioreactors. *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*. Rehovot, Israel: Kluwer Academic Publishers, 1999, pp 673-676
- Ziv M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: Debergh P C; Zimmerman R H, eds. *Micropropagation: Technology and Application*. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 1990, pp 45–69

9.APÉNDICES

9. APÉNDICES

9.1: ESTADÍSTICA

Tabla 3: ANOVA hojas

ANOVA: HOJAS								
DESCRIPTION					Alpha	0,05		
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
hiponex	12	57	4,75	5,25	57,75	0,34715656	4,05428271	5,44571729
ba	12	19,5	1,625	0,41477273	4,5625	0,34715656	0,92928271	2,32071729
paula	12	20	1,66666667	0,60606061	6,66666667	0,34715656	0,97094937	2,36238396
i365	12	18	1,5	0,27272727	3	0,34715656	0,80428271	2,19571729
p668	12	28,5	2,375	0,6875	7,5625	0,34715656	1,67928271	3,07071729
ANOVA								
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between Gr	89,6416667	4	22,4104167	15,4959403	1,5095E-08	2,53968863	1,1363663	0,49145544
Within Group	79,5416667	55	1,44621212					
Total	169,183333	59	2,86751412					

Tabla 4: TUKEY hojas

TUKEY HSD/KRAMER						alpha	0,05		
group	mean	n	ss	df	q-crit				
hiponex	4,75	12	57,75						
ba	1,625	12	4,5625						
paula	1,66666667	12	6,66666667						
i365	1,5	12	3						
p668	2,375	12	7,5625						
		60	79,5416667	55	3,98827273				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
hiponex	ba	3,125	0,34715656	9,0017023	1,74044496	4,50955504	4,0454E-07	1,38455504	2,59856762
hiponex	paula	3,08333333	0,34715656	8,8816796	1,6987783	4,46788837	5,5541E-07	1,38455504	2,56392006
hiponex	i365	3,25	0,34715656	9,36177039	1,86544496	4,63455504	1,5586E-07	1,38455504	2,70251033
hiponex	p668	2,375	0,34715656	6,84129375	0,99044496	3,75955504	0,00010469	1,38455504	1,97491139
ba	paula	0,04166667	0,34715656	0,1200227	-1,34288837	1,4262217	0,99998786	1,38455504	0,03464757
ba	i365	0,125	0,34715656	0,36006809	-1,25955504	1,50955504	0,99904473	1,38455504	0,1039427
ba	p668	0,75	0,34715656	2,16040855	-0,63455504	2,13455504	0,54936001	1,38455504	0,62365623
paula	i365	0,16666667	0,34715656	0,48009079	-1,21788837	1,5512217	0,99705546	1,38455504	0,13859027
paula	p668	0,70833333	0,34715656	2,04038585	-0,6762217	2,09288837	0,60323278	1,38455504	0,58900866
i365	p668	0,875	0,34715656	2,52047664	-0,50955504	2,25955504	0,39412312	1,38455504	0,72759893

Tabla 5: ANOVA raíz

ANOVA: RAICES									
DESCRIPTION					Alpha	0,05			
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper	
hiponex	13	101	7,76923077	16,6923077	200,307692	0,74087346	6,28726319	9,25119835	
ba	13	26,8	2,06153846	0,7325641	8,79076923	0,74087346	0,57957088	3,54350604	
paula	13	30	2,30769231	1,60576923	19,2692308	0,74087346	0,82572473	3,78965989	
i365	13	43	3,30769231	4,10576923	49,2692308	0,74087346	1,82572473	4,78965989	
p668	13	65	5	12,5416667	150,5	0,74087346	3,51803242	6,48196758	
ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq	
Between Gr	289,485538	4	72,3713846	10,1422766	2,4431E-06	2,5252151	0,88327522	0,36004163	
Within Grou	428,136923	60	7,13561538						
Total	717,622462	64	11,212851						

Tabla 6: TUKEY raiz

TUKEY HSD/KRAMER						alpha	0,05			
group	mean	n	ss	df	q-crit					
hiponex	7,76923077	13	200,307692							
ba	2,06153846	13	8,79076923							
paula	2,30769231	13	19,2692308							
i365	3,30769231	13	49,2692308							
p668	5	13	150,5							
		65	428,136923	60	3,977					
Q TEST										
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d	
hiponex	ba	5,70769231	0,74087346	7,70400423	2,76123854	8,65414608	9,7729E-06	2,94645377	2,13670633	
hiponex	paula	5,46153846	0,74087346	7,37175607	2,51508469	8,40799223	2,3355E-05	2,94645377	2,04455727	
hiponex	i365	4,46153846	0,74087346	6,02199792	1,51508469	7,40799223	0,00068202	2,94645377	1,67020171	
hiponex	p668	2,76923077	0,74087346	3,73779181	-0,177223	5,71568454	0,07525735	2,94645377	1,03667693	
ba	paula	0,24615385	0,74087346	0,33224816	-2,70029992	3,19260762	0,99930607	2,94645377	0,09214906	
ba	i365	1,24615385	0,74087346	1,68200631	-1,70029992	4,19260762	0,75738971	2,94645377	0,46650462	
ba	p668	2,93846154	0,74087346	3,96621242	-0,00799223	5,88491531	0,0509926	2,94645377	1,1000294	
paula	i365	1	0,74087346	1,34975815	-1,94645377	3,94645377	0,87414046	2,94645377	0,37435556	
paula	p668	2,69230769	0,74087346	3,63396426	-0,25414608	5,63876146	0,08915473	2,94645377	1,00788034	
i365	p668	1,69230769	0,74087346	2,28420611	-1,25414608	4,63876146	0,49378203	2,94645377	0,63352479	

9.2: certificado de composición y análisis



PhytoTechnology Laboratories®
 Helping to Build a Better Tomorrow through Plant Science™

Product Information Sheet

I365

Ichihashi New Phalaenopsis (NP) Medium

Properties

Form: Powder
 Appearance: White to Cream
 Application: Plant Tissue Culture
 Solubility: Partially Soluble in Cold Water. Fully Soluble in Hot/Boiling Water.
 Typical Working Concentration: 25.35 g/L
 Storage Temp: 2-6°C
 Storage Temp of Stock Solution: N/A
 Other Notes: Contains the components as described Ichihashi (1992); modified to contain 82.0 mg/L Ammonium Nitrate. Preparation of concentrated solutions is not recommended as insoluble precipitates may form.

Formula

Ammonium Nitrate	82
Ammonium Sulfate	303.9
Boric Acid	3.1
Calcium Nitrate	637.6
Cobalt Chloride•6H ₂ O	0.0125
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.0125
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.3
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.8
Magnesium Nitrate	256.4
Manganese Sulfate•H ₂ O	11.2
Molybdic Acid (Sodium Salt) •2H ₂ O	0.125
Potassium Iodide	0.415

Potassium Nitrate	424
Potassium Phosphate, Monobasic	462.7
Zinc Sulfate•7H ₂ O	4.3
Gellan Gum, CultureGel – Biotech	3000
Glycine (Free Base)	2
myo-Inositol	100
Nicotinic Acid (Free Acid)	0.5
Pyridoxine•HCl	0.5
Sucrose	20,000
Thiamine•HCl	0.1

Application Notes

Plant Tissue Culture Tested

Plant species: *Phalaenopsis* spp.

This medium was originally developed for the stem propagation of *Phalaenopsis*.

References

Ichihashi, S. 1992. Abstr. of IPPS Toyohashi 98.

PhytoTechnology Laboratories®

Figura 2: composición medio I365

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Description ICHIHASHI NEW PHALAENOPSIS (NP) MEDIUM
 Product Number I365
 Lot Number AKR0365014
 Storage Temperature 2-8°C

Physiochemical Specifications:

TEST	SPECIFICATION	RESULTS
Solubility	Partially Soluble in Water	Passes
pH (25.35 g/L)	4.2 – 5.3	4.6
Physical Appearance		
Color*	PM-1 to PM-4	PM-4 White
Texture	Fine to Coarse Powder	Fine Powder
Solution Appearance		
Clarity	Translucent, Grainy	Translucent, Grainy
Color	Light Gray with a Green Cast to Light Dull Green	Light Gray with a Green Cast
Moisture	For Information Only	1.87%

* Product color based upon comparisons between sample and standardized color wheel (Benjamin Moore® Color Preview™).

Biological Testing:

TEST SPECIFICATION	PLANT CELL LINE	RESULTS
Supports and/or facilitates plant growth and/or shoot proliferation in two or more plant tissue cultured lines with no morphological aberrations to plants.	Bifrenaria	Passes
	Phalaenopsis	Passes

The material described in this certificate was manufactured in the United States of America and is synthetic. No animal- or plant-derived components were used in the manufacture of this product.

*Phyto*Technology Laboratories® provides the above information intended to be used only as a guide to the appropriate handling of this material by a properly trained person. *Phyto*Technology Laboratories® shall not be held liable for any damage resulting from handling or from contact with the above product. This product is intended for LABORATORY USE ONLY. Our products may NOT BE USED as drugs, cosmetics, agricultural or pesticidal products, food additives or as household chemicals.

Date of Release: 4-May-2018
 Recommended Shelf Life Date: May 2021



David S. Hart
 Technical Director

Figura 3: Certificado de análisis I365



PhytoTechnology Laboratories®
 Helping to Build a Better Tomorrow through Plant Science™

Product Information Sheet

P668
Orchid Maintenance Medium
Contains Charcoal, Without Agar

Properties

Form: Powder
 Appearance: Gray powder
 Application: Orchid Culture
 Solubility: Partially Soluble in Water
 Typical Working Concentration: 27.31 g/L
 Storage Temp: 2 – 6° C
 Storage Temp of Stock Solution: Preparation of concentrated solutions is not recommended as insoluble precipitates may form.
 Other Notes: pH = 4.75 – 5.75

Formula	(mg/L)		(mg/L)
Ammonium Nitrate	825	Potassium Phosphate, Monobasic	85
Boric Acid	3.1	Zinc Sulfate•7H ₂ O	5.3
Calcium Chloride, Anhydrous	166	Activated Charcoal	2000
Cobalt Chloride•6H ₂ O	0.0125	MES (Free Acid)	1000
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.0125	myo-Inositol	100
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.3	Nicotinic Acid (Free Acid)	1
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.85	Peptone from Meat	2000
Magnesium Sulfate, Anhydrous	90.35	Pyridoxine•HCl	1
Manganese Sulfate•H ₂ O	8.45	Sucrose	20,000
Molybdic Acid (Sodium Salt) •2H ₂ O	0.125	Thiamine•HCl	10
Potassium Iodide	0.415		
Potassium Nitrate	950		

Application Notes

Plant Tissue Culture Tested
 Plant species: Many epiphytic orchid species
 This medium was originally developed for the culture of Phalaenopsis stem props. It is now widely used as a seed sowing and replat medium for many epiphytic orchid species.

Revised 12/2012

PhytoTechnology Laboratories®

Figura 4: composición medio P668

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Description ORCHID MAINTENANCE MEDIUM
 CONTAINS CHARCOAL, WITHOUT AGAR
 Product Number P668
 Lot Number AHR0668154
 Storage Temperature 2-8°C

Physiochemical Specifications:

TEST	SPECIFICATION	RESULTS
Solubility	Partially Soluble in Water	Passes
pH (27.31 g/L)	4.7 – 5.8	5.3
Physical Appearance Color*	2124-10, 2124-20, 2125-20, 2127-20, 2134-30, 2134-40, 2121-30 or 2124-30 to 2126-30	2125-20 Black
Texture	Fine to Coarse Powder	Fine Powder
Solution Appearance Clarity	Opaque, Grainy	Opaque, Grainy
Color	Black	Black
Moisture	For Information Only	1.84%

* Product color based upon comparisons between sample and standardized color wheel (Benjamin Moore® Color Preview™).

Biological Testing:

TEST SPECIFICATION	PLANT CELL LINE	RESULTS
Supports and/or facilitates plant growth and/or shoot proliferation in two or more plant tissue cultured lines with no morphological aberrations to plants.	Bifrenaria	Passes
	Phalaenopsis	Passes

The material described in this certificate was manufactured in the United States of America and contains synthetic and animal-derived components. The animal-derived component is peptone manufactured from bovine meat of USA origin. This product contains 2.0 g/L peptone (1L = 27.31 g).

PhytoTechnology Laboratories® provides the above information intended to be used only as a guide to the appropriate handling of this material by a properly trained person. *PhytoTechnology Laboratories®* shall not be held liable for any damage resulting from handling or from contact with the above product. This product is intended for LABORATORY USE ONLY. Our products may NOT BE USED as drugs, cosmetics, agricultural or pesticidal products, food additives or as household chemicals.

Date of Release: 13-April-2018
 Recommended Shelf Life Date: April 2021



 David S. Hart
 Technical Director

Figura 5: Certificado de análisis P668

ANEJO: RESULTADO FINAL

HYPONEX



Foto17: Resultado en medio Hyponex

P668



Foto17: Resultado en medio P668

MS+BA

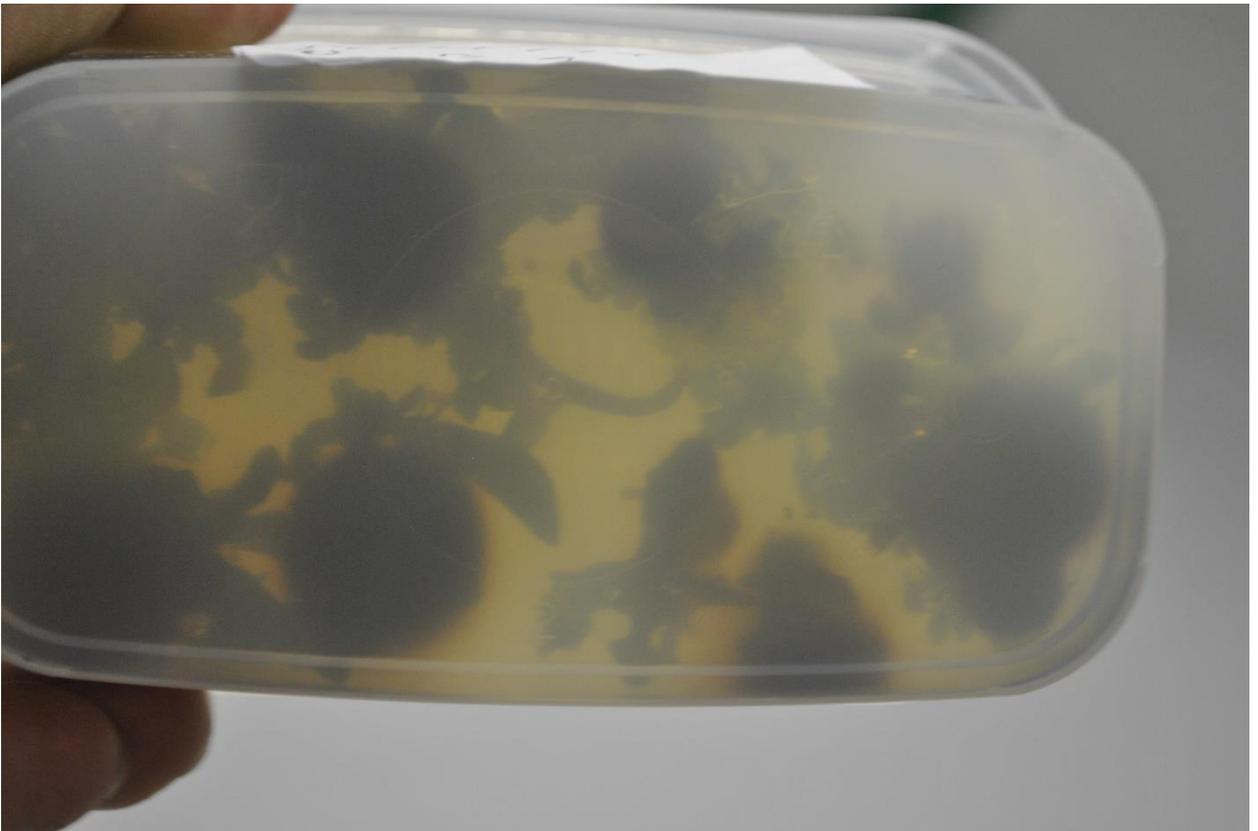


Foto19: Resultado en medio MS+BA

MS+LEVADURA

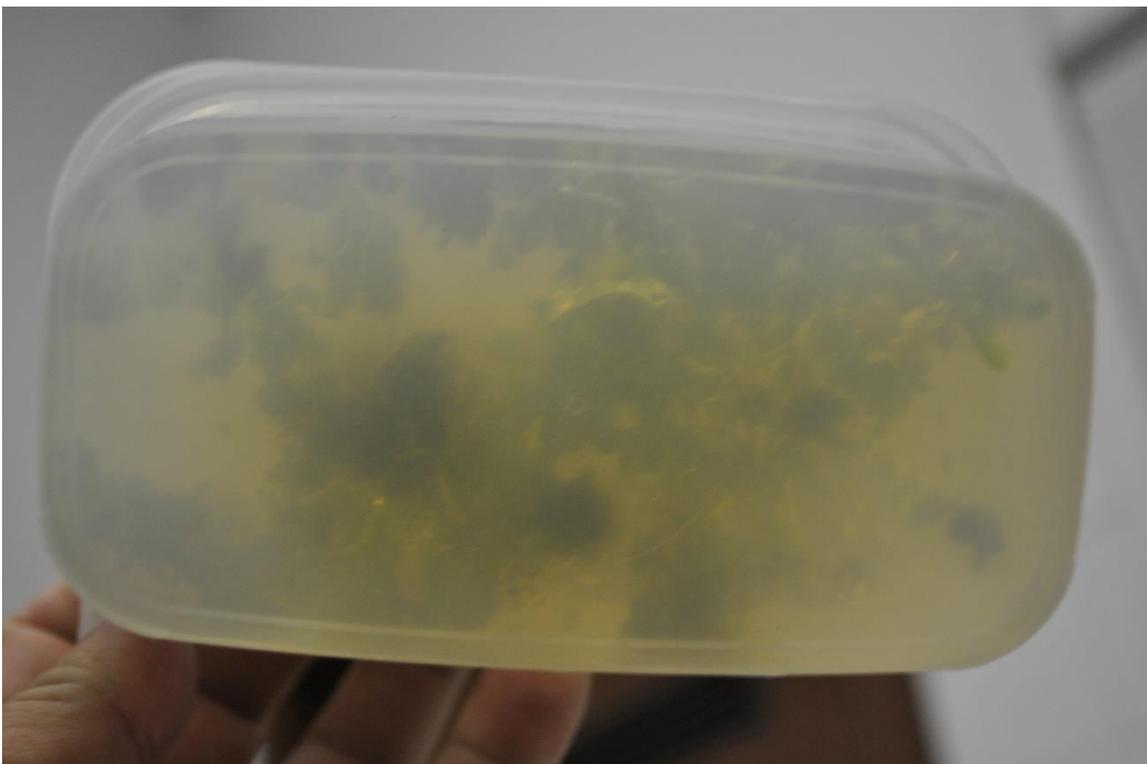


Foto20: Resultado en medio MS+Levadura

I365

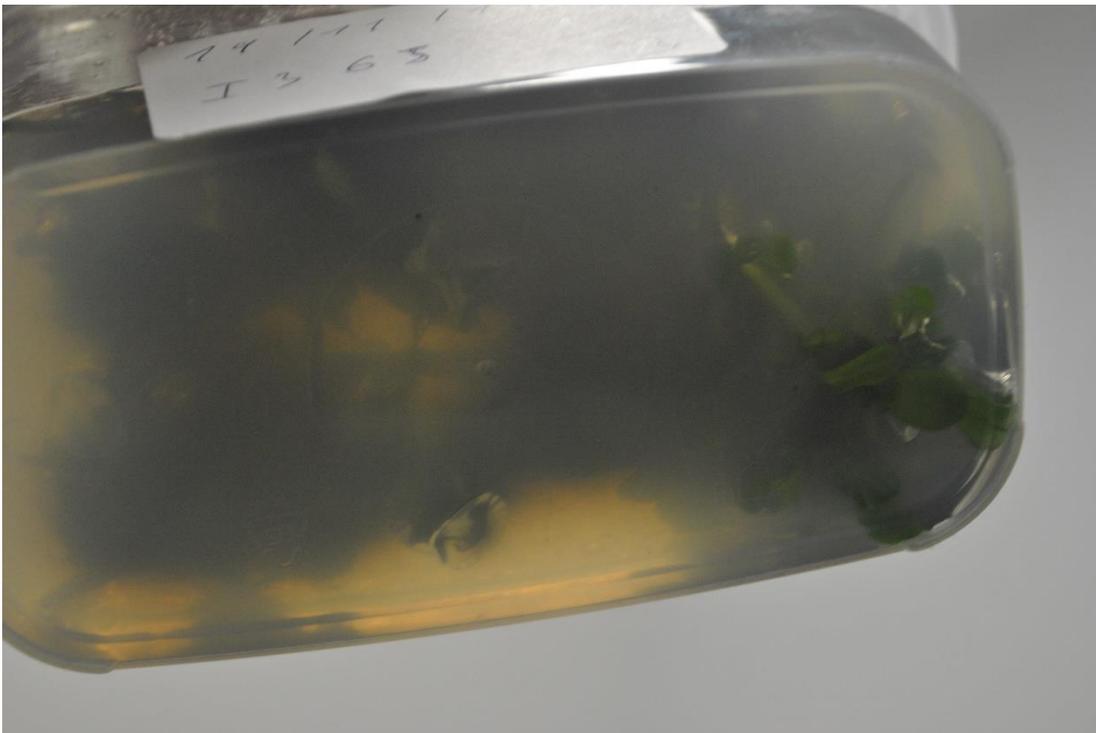


Foto21: Resultado en medio I365



Foto22: Medición para estadística



Foto23: Daños por oxidación y vitrificación en P6668

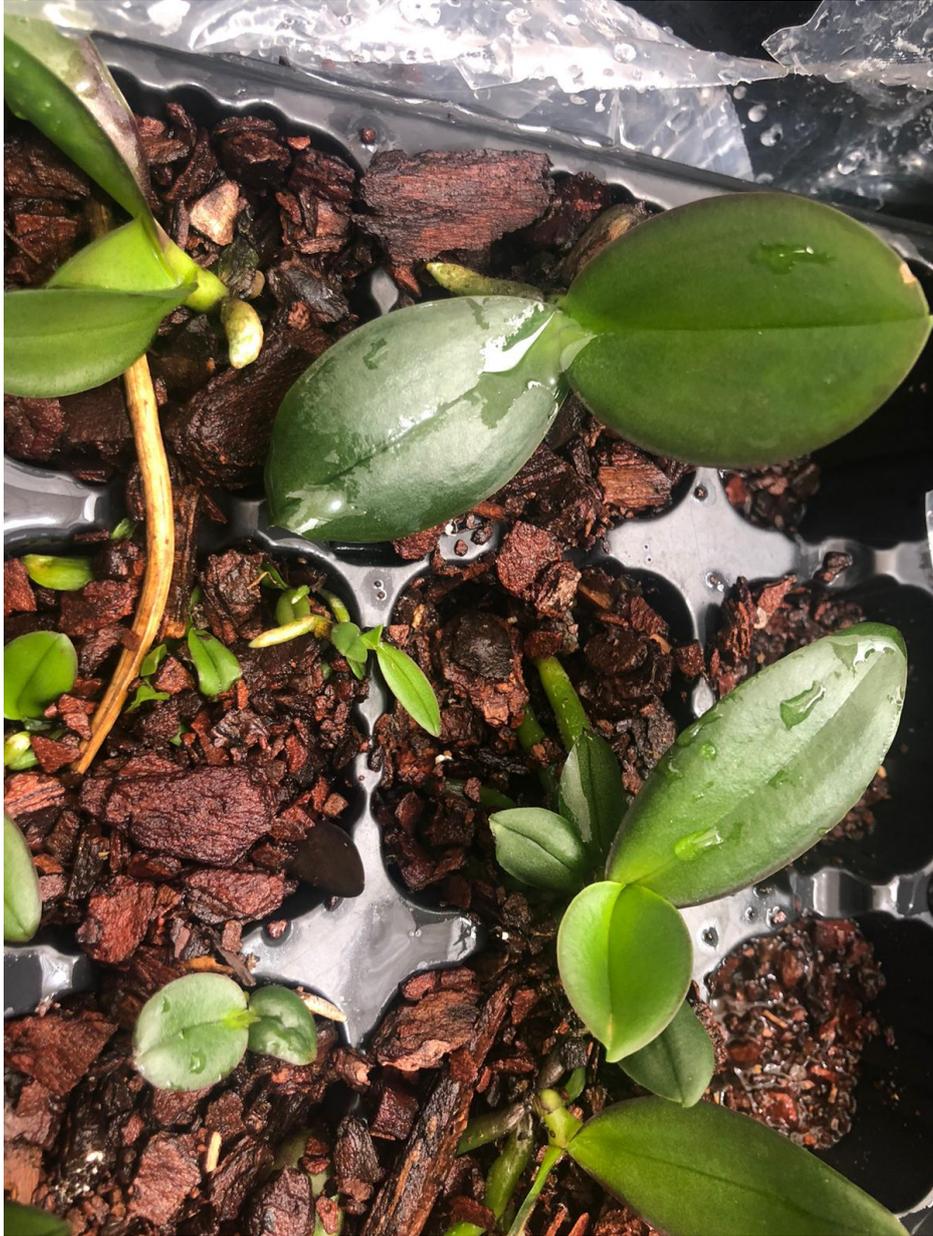


Foto24: Cultivo ex vitro de *Phalaenopsis*



Foto25: Cultivo *Cymbidium* en recipiente plástico



Foto26: Cultivo *Cymbidium* en recipiente de cristal