



Universidad Austral de Chile

Escuela de Agronomía

**Aclimatación de plántulas de *Chloraea virescens*
(Willd.) Lindl. cultivadas *in vitro*.**

Memoria presentada como parte
de los requisitos para optar al
título de Ingeniero Agrónomo.

VALÉRIE VAN GINDERDEUREN RAVESCHOT
VALDIVIA – CHILE
2009

PROFESOR PATROCINANTE:

Peter Seemann Fahrenkrog
Ing. Agr., Dr. rer. hort.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

PROFESORES INFORMANTES:

Magaly Rivero Gutiérrez
Prof. Biol. Y Quim., Dr. Cs.

Nancy Andrade Soto
Ing. Agr., M. Sc.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

A mis papás, por su cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos, por estar conmigo.

A Claudia y Camila, por su paciencia, preocupación y ayuda, y
a todos los que compartieron conmigo esta experiencia.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	RÉSUMÉ	2
1	INTRODUCCION	3
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1	Descripción general.	4
2.1.1	Descripción geográfica.	4
2.1.2	Formas de vida.	4
2.1.3	Descripción morfológica.	4
2.1.4	Géneros y especies chilenas.	5
2.1.4.1	<i>Chloraea virescens</i>	6
2.2	Requerimientos de las orquídeas.	7
2.2.1	Agua	7
2.2.2	Luz	8
2.2.3	Fertilización	8
2.2.4	Temperatura	8
2.3	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de orquídeas	9
2.3.1	Biología de las semillas	9
2.3.2	Germinación simbiótica y no simbiótica de semillas	9
2.3.3	Condiciones de esterilidad	9
2.3.3.1	Siembra de las semillas	10
2.3.4	Transplante	10
2.4	Propagación de orquídeas selectas	11
2.4.1	Orquídeas terrestres	11
2.4.1.1	<i>Cypripedium</i>	11
2.4.1.2	Preservación <i>in vitro</i> de orquídeas terrestres poco frecuentes	12
2.4.1.3	Longevidad de semillas de orquídeas terrestres	12
2.4.1.4	Sobrevivencia de orquídeas terrestres transplantadas a sectores urbanos	13

2.4.1.5	Micropropagación de orquídeas terrestres	13
2.4.2	Orquídeas epífitas	14
2.4.2.1	Preservación de <i>Cattleya walkeriana</i> usando propagación <i>in vitro</i>	14
2.4.2.2	Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> y micropropagación de <i>Cattleya aurantiaca</i> (Bateman ex Lindl.)	14
2.4.2.3	Establecimiento <i>in vitro</i> y regeneración de plantas de <i>Laelia autumnales</i> (Llave y Lex.) Lindl.	15
2.5	Aclimatación	16
2.5.1	Stress de agua	16
2.5.1.1	Cutícula	16
2.5.1.2	Estomas	17
2.5.2	Humedad	17
2.5.3	Luz	17
2.5.4	Temperatura	17
2.5.5	Fotosíntesis	18
2.5.6	Sustrato	18
3	MATERIAL Y METODO	20
3.1	Material	20
3.1.1	Material vegetal	20
3.1.2	Material de laboratorio	20
3.2	Método	20
3.2.1	Preparación del medio de cultivo	20
3.2.2	Obtención del material vegetal	20
3.2.3	Sustratos	21
3.2.4	Plantación	21
3.2.5	Diseño de los ensayos	21
3.2.6	Diseño experimental	22
3.2.7	Parámetros a evaluar	22
3.2.8	Análisis estadístico	22

4	PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS	24
4.1	Número de hojas finales	25
4.1.1	Efecto del tamaño de plántula	25
4.1.2	Efecto del tipo de sustrato	26
4.1.3	Interacción entre tamaño de plántula y sustrato	27
4.2	Raíces iniciales	28
4.2.1	Efecto del tamaño de plántula	29
4.2.2	Efecto del tipo de sustrato	30
4.2.3	Interacción entre tamaño de plántula y sustrato	30
4.3	Raíces finales	31
4.3.1	Efecto del tamaño de plántula	32
4.3.2	Efecto del tipo de sustrato	32
4.3.3	Interacción tamaño de plántula y sustrato	33
4.4	Altura	35
4.5	Sobrevivencia	36
5	CONCLUSIONES	38
6	BIBLIOGRAFIA	39
7	ANEXOS	42

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición de solución nutritiva Hoagland.	21
2	Variables no paramétricas: número final de hojas, número de raíces inicial y final.	24
3	Variables paramétricas, altura final de plántulas y sobrevivencia de plántulas.	25

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>C. virescens</i>	7
2	Plántulas de <i>C. virescens</i> en cámara de crecimiento <i>in vitro</i> .	20
3	A: Plántulas micropropagadas de <i>Chloraea virescens</i> en medio MS B: Plántulas después de 180 días de aclimatación.	24
4	Efecto del tamaño de plántula sobre la variable no paramétrica número final de hojas (Test de Dunn).	26
5	Efecto del sustrato sobre la variable no paramétrica número final de hojas (Test de Dunn).	27
6	Efecto del tamaño y del sustrato sobre la variable no paramétrica número de hojas finales (Test de Dunn).	28
7	Desarrollo de raíces y número de hojas después de dos meses de pre aclimatación.	28
8	Efecto del tamaño de plántula sobre la variable no paramétrica número inicial de raíces (Test de Dunn).	29
9	Efecto del sustrato sobre la variable no paramétrica número final de raíces (Test de Dunn).	30
10	Efecto del tamaño y del sustrato sobre la variable no paramétrica raíces iniciales (Test de Dunn).	31
11	Desarrollo de raíces y número de hojas después de tres meses de aclimatación.	31
12	Efecto del tamaño de plántula sobre la variable no paramétrica número final de raíces (Test de Dunn).	32
13	Efecto del sustrato sobre la variable no paramétrica número final de raíces (Test de Dunn).	33
14	Efecto del tamaño y del sustrato sobre para la variable no paramétrica raíces finales (Test de Dunn).	34
15	Altura final de plántula según sustrato (a) y tamaño (b).	35

16	Análisis de Varianza con un 95% de confianza para la variable paramétrica altura final de plántulas.	35
17	Sobrevivencia de plántulas según sustrato (a) y tamaño (b).	37
18	Análisis de Varianza con un 95% de confianza para la variable paramétrica de sobrevivencia.	37

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Composición del medio basal MURASHIGE y SKOOG (1962) y suplementos orgánicos.	44
2	Análisis químico de los sustratos ocupados en el estudio.	45
3	Registro de temperaturas mínimas, máxima y promedio durante el estudio.	46
4	Test no-paramétrico de Kruskall Wallis para la variable hojas finales.	47
5	Tabla de medias para la variable no paramétrica hojas finales.	47
6	Test no-paramétrico de Kruskall Wallis para la variable raíces iniciales.	48
7	Tabla de medias para la variable no-paramétrica raíces iniciales.	48
8	Test no-paramétrico de Kruskall Wallis para la variable raíces finales.	49
9	Tabla de medias para la variable no-paramétrica raíces finales.	49
10	Análisis de varianza del parámetro altura de plántula en aclimatación.	50
11	Tabla de medias para la variable paramétrica altura.	50
12	Análisis de varianza para el parámetro sobrevivencia de plántulas en el período de aclimatación.	51
13	Tabla de medias para la variable paramétrica sobrevivencia.	51
14	Cuadro descriptivo del género <i>Chloraea</i> .	52

RESUMEN

Dentro del esquema de micropropagación de plántulas de *Chloraea virescens*, la aclimatación es la etapa final, donde la manipulación debe ser muy cuidadosa, ya que es donde se produce el mayor índice de mortandad, principalmente en el proceso de trasplante. Esta etapa es muy importante ya que gracias a ella se verá la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro*, por eso el objetivo general de este trabajo es evaluar la influencia del tamaño de plántulas y utilización de distintos sustratos en la aclimatación *ex vitro* de plántulas de *C. virescens*.

Se utilizaron plántulas de *Chloraea virescens* obtenidas a partir de la micropropagación de protocormos provenientes de germinación asimbióticas de semillas efectuada en el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile.

Las plántulas fueron repicadas hasta obtener el número adecuado para el ensayo. Luego fueron trasladadas a una sala del laboratorio en macetas de seis, ocho y diez plántulas dependiendo del tamaño de la plántula (más de 3cm; 2-3cm y 1-2cm respectivamente), por dos meses, posteriormente fueron transferidas a 3 sustratos turba+perlita (1:1), Sphagnum y turba+arena (1:1) y fueron llevadas a invernadero durante cuatro meses.

Las variables evaluadas fueron; número final de hojas, número inicial y final de raíces, altura y sobrevivencia de las plántulas.

Los resultados obtenidos demostraron que los tamaños y los sustratos ocupados influyen en el crecimiento de las plántulas. El mejor tamaño para la aclimatación es de más de 3cm, obteniendo con éste los mejores resultados en todas las variables evaluadas. Lo mismo ocurrió con el sustrato turba+perlita, el cual fue el mejor evaluado.

RÉSUMÉ

Dans le schéma de la micropropagation de *Chloraea virescens*, l'acclimatation est la dernière étape où il faut être prudent parce que c'est à ce moment là que les taux de mortalité sont les plus élevés, principalement dans le processus de transplantation. Cette étape est très importante parce que ce sera grâce à elle qu'on verra l'efficacité du processus et la qualité finale des plantes produites *in vitro*. L'objectif général de cette étude est d'évaluer l'influence de la taille des plantes et l'utilisation de divers substrats pour l'acclimatation de *C. virescens*.

On a utilisé des plantes de *C. virescens* obtenue a partir de la micropropagation de protocormos en provenance du laboratoire de Cultivos de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile.

Les plantes ont été subdivisée pour obtenir le nombre approprié. Elles ont ensuite été transférées à des pots dans une pièce du laboratoire, de six, huit et dix en fonction de la taille de la plante (plus de 3 cm, de 2-3 cm et 1-2 cm respectivement), pour deux mois, ensuite elles ont été transférée dans trois substrats tourbe + perlite (1:1), *Sphagnum* et tourbe + sable (1:1) et elles ont été mises dans une serre pour quatre mois.

Les variables à évaluer sont; nombre final de feuilles, nombre de racines au début et à la fin, la hauteur et la survie des plantes.

Les résultats ont montré que la taille et les substrats utilisés ont une influence sur la croissance des jeunes plantes. La taille idéale pour l'acclimatation est plus de 3cm, avec cette dernière on a obtenu les meilleurs résultats dans toutes les variables qui ont été évaluées. Le même résultat s'est produit avec le substrat de tourbe + perlite lequel a aussi montré les meilleurs résultats.

1 INTRODUCCION

La familia *Orchidaceae* (Orquídeas) es la que mayor número de especies comprende en el Reino Vegetal. Se estima que debe haber alrededor de 35.000 especies de Orquídeas en todo el mundo pertenecientes a unos 750 géneros, además de miles de híbridos.

En Chile, esta familia es probablemente el grupo menos estudiado de plantas con flores, y sólo se han realizado estudios en base a su taxonomía, biología reproductiva, fenología y distribución.

La producción de flores de orquídeas ha tomado importancia por la belleza de sus flores, dada la enorme variedad de formas, colores y perfumes. Existen orquídeas terrestres y epífitas, estas últimas representan más del 90% del total de especies y son las que mayoritariamente se encuentran a la venta. Las flores tienen un alto valor ornamental o como flor cortada, ya que éstas pueden permanecer separadas de las plantas sin marchitarse hasta tres o cuatro semanas, y en la planta permanecen hasta tres meses.

La obtención de plantas de orquídeas a partir de semillas es muy difícil ya que éstas son diminutas y de germinación irregular. Como una alternativa de obtención de plantas aparece la micropropagación, pudiendo así aumentar el número de plantas en forma relativamente fácil y rápida. Luego de la etapa de micropropagación viene la etapa de aclimatación, en la cual la manipulación debe ser en extremo cuidadosa ya que es donde se produce el mayor índice de mortandad, principalmente en el proceso de trasplante. Esta etapa es muy importante ya que gracias a ella se verá la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro*.

Considerando la producción de plántulas mediante la micropropagación, en este trabajo se plantea la hipótesis que “el tamaño de plántulas de *Chloraea virescens* (Willd.) Lindl. obtenidas *in vitro* y los distintos sustratos son factores que inciden en el desarrollo y su aclimatación.”

El objetivo general de este trabajo es:

- Evaluar la influencia del tamaño de plántulas y utilización de distintos sustratos en la aclimatación *ex vitro* de plántulas de *C. virescens*.

Los objetivos específicos son:

- Medir el efecto del tamaño de plántulas de *C. virescens* en la sobrevivencia y desarrollo de éstas *ex vitro*.
- Comparar el uso de tres sustratos en el desarrollo y sobrevivencia de plántulas de *C. virescens*.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descripción general

2.1.1 Descripción geográfica. Las orquídeas pertenecen a la familia *Orchidaceae*, clase *Liliopsida*, (monocotiledóneas). Son plantas herbáceas perennes, originarias de regiones tropicales y subtropicales, pero existen también en todos los continentes a excepción de las regiones polares.

La zona donde se encuentran estas plantas está comprendida entre los 68° latitud norte y 56° latitud sur. Es evidente que en los límites extremos de estas latitudes se encuentran pocos géneros y especies, esto va en aumento desde las regiones templadas hasta las regiones intertropicales donde el número es el mayor.

Los territorios más interesantes por su número son:

- América del Sur y América Central
- Asia e India
- Madagascar
- Australia es el continente menos poblado en orquídeas dentro de las regiones del globo.
- Por su parte Europa presenta numerosos géneros y especies de orquídeas terrestres. Sólo en Francia existen 75 especies repartidas en 16 géneros, todas terrestres (LECOUFLE y ROSE, 1956).

2.1.2 Formas de vida. Las zonas donde crecen estas plantas influyen sobre su manera de vivir. Algunas orquídeas son terrestres y se encuentran representadas en todas las regiones. También existen las epífitas (vegetal que fijado a otro no obtiene de éste su alimento). En este caso se necesita que el grado higrométrico y la temperatura permitan este tipo de adaptación. Además existen las orquídeas litofíticas que viven sobre rocas. Las raíces de las epífitas y litofíticas están adaptadas a vivir expuestas al aire o inmersas en materia orgánica, ya que tienen un tejido acumulador de agua llamado velo.

En zonas frías y templado frías, todas las orquídeas son terrestres. En zonas subtropicales o tropicales la gran mayoría es epífita. Otra particularidad, debida seguramente a la influencia de estas zonas es la floración. Es en las zonas tropicales y subtropicales que se dan los mayores tamaños de flores así como también la mayor variedad de colores (LECOUFLE y ROSE, 1956).

2.1.3 Descripción morfológica. Las orquídeas se caracterizan por poseer flores muy vistosas, hermafroditas (ambos sexos en la misma flor), zigomorfas (con un solo plano de simetría), trímeras (tres sépalos y tres pétalos) y una columna central que sustenta las estructuras reproductivas masculinas, anteras, y femeninas, pistilo, llamada ginostemo.

El pétalo inferior se llama labelo y su morfología define a los distintos géneros de orquídeas. Las flores pueden ser aisladas o en inflorescencia y son polinizadas por insectos. El polen se encuentra aglomerado, formando una masa llamada polinio el que tiene un extremo con un ensanchamiento glandular, pegajoso, que sirve para que el

polinio se adhiera al cuerpo del insecto polinizador. El fruto es una cápsula seca con muchas semillas pequeñas, sin endosperma y con embrión no diferenciado.

Tienen dos tipos básicos de crecimiento. Simpodial, en las que el nuevo crecimiento se produce en sentido horizontal, a partir de un tallo subterráneo o rizoma, generando una sub-unidad capaz de producir una flor o inflorescencia y de ser eventualmente separada de la planta (ej. *Cattleya*). Monopodial, en las que el nuevo crecimiento se produce en sentido vertical, con lo cual la planta crece constantemente en altura (ej. *Phalaenopsis*) (ORQUIDEAS, 2007).

2.1.4 Géneros y especies chilenas. Según NOVOA, *et al*, (2006) en la familia Orchidaceae se encuentran 49 especies de flora nativa, dentro de las cuales se encuentra *Chloraea virescens* (Willd.) Lindl.

Los géneros de *Orchidaceae* en Chile son 7:

- *Aa*, *Bipinnula*, *Brachystele*, *Codonorchis*, *Chloraea*, *Gavilea* y *Habenaria*.

Dentro del género *Chloraea* existen 31 especies:

- *Chloraea alpina* Poepp.
- *Chloraea barbata* Lindl.
- *Chloraea bidentata* (Poepp y Endl.) Correa.
- *Chloraea bletioides* Lindl.
- *Chloraea cuneata* Lindl.
- *Chloraea chica* Speg.
- *Chloraea chrysantha* Poepp.
- *Chloraea crispa* Lindl.
- *Chloraea cristata* Lindl.
- *Chloraea cylindrostachya* Poepp.
- *Chloraea disoides* Lindl.
- *Chloraea galeata* Lindl.
- *Chloraea gaudichaudii* Brongn.
- *Chloraea gaviu* Lindl
- *Chloraea grandiflora* Lindl.
- *Chloraea heteroglossa* Rchb.f.
- *Chloraea incisa* Poepp.
- *Chloraea lamellata* Lindl.
- *Chloraea lechleri* Lindl.
- *Chloraea leptopetala* Reiche.
- *Chloraea longipetala* Lindl.
- *Chloraea magellanica* Hook.f
- *Chloraea multiflora* Lindl.
- *Chloraea nudilabia* Lindl
- *Chloraea philippii* Reichb.f.
- *Chloraea picta* Phil.
- *Chloraea prodigiosa* Reichb.f.
- *Chloraea speciosa* Poepp.
- *Chloraea virescens* Lindl.
- *Chloraea viridiflora* Poepp.

- *Chloraea volkmanni* Phil. (NOVOA *et al*, 2006).

2.1.4.1 *Chloraea virescens*. Planta perenne, de 40-90 cm de altura. Sus hojas son de 5-12cm de largo por 1,5-2,5cm de ancho, estrechas, lanceoladas, agudas, dispuestas en roseta basal, generalmente marchitas al final de la antesis. Su escapo floral tiene vainas caulinares lanceoladas, agudas y distantes. La inflorescencia es de 8-20cm de largo, densa, con 10-15 flores erguidas. Sus flores son blancas con estrías y ápices verdes. El sépalo dorsal es de 16-33mm de largo por 4-6mm de ancho, oblongo, lanceolado, obtuso, algo cóncavo, a veces ligeramente estrechado al centro, ápice algo carnoso. Los sépalos laterales de 18-33mm de largo por 4-5mm de ancho, son ensiformes con ápice obtuso, engrosado, verde negruzco, a veces, espatulado y dentado, a veces verrugoso. Los pétalos son de 15-23mm de largo por 5-5,8mm de ancho, estrechamente aovados, obtusos, verrugosos, con más frecuencia solo la mitad inferior, a veces el borde denticulado y carnoso. El labelo de 15-26mm de largo por 10-20mm de ancho, es más o menos romboidal a levemente trilobulado. El lóbulo central tiene 5-7 nervios longitudinales recorridos por laminillas interrumpidas, membranáceas con segmentos falciformes de borde carnoso de color verde. Los nervios laterales que se ramifican oblicuamente hacia el ápice; en los lóbulos laterales, tienen pequeñas laminillas y verrugas, y su borde es laciniado, inciso en la mitad apical, hacia la base denticulado, ápice generalmente engrosado. La columna es de 12-18mm de largo, delgada, blanca, con estrías anaranjada. La base de la zona nectarífera tiene un color amarillo-limón con máculas anaranjadas, orificio nectarario verde. El ala de la columna es recta y estrecha. El estigma es triangular y globoso.

La distribución geográfica de esta especie es desde la Vª (Viña del Mar) hasta la XIª Región (Aysén). Es común en terrenos arenosos, pedregosos, terraplenes y en los bosques. Vive en las provincias centrales de Chile. Sin embargo, es posible que tenga una distribución más restringida por que se le ha confundido con *Chloraea incisa*. Su floración es desde noviembre a febrero y su estado de conservación no está evaluado (NOVOA *et al*, 2006).

En el Anexo 14 se incluyen antecedentes sobre su distribución y época de floración.



FIGURA 1 *Chloraea virescens*.

FUENTE: NOVOA *et al* (2006).

2.2 Requerimientos de las orquídeas

Para tener éxito en el cultivo de orquídeas hay que tomar en cuenta factores de importancia como son:

2.2.1 Agua. El riego correcto es el principio y el fin del cuidado de orquídeas (ROLLKE, 2005). Este elemento es primordial para las orquídeas así como también para todo tipo de plantas. En el caso de éstas se dice muchas veces que la calidad del agua usada es el factor más importante en el cultivo de orquídeas, ya que el porcentaje más alto de muerte se produce por el exceso de este factor (SHEEHAN, 1980).

Hay que tomar en cuenta que la mayoría de las orquídeas son epífitas, lo que significa que tienen sus raíces a la vista, gracias a las cuales absorben el agua de lluvia. Se recomienda un sustrato poroso y de reacción neutra ya que de esta manera el agua escurre sin acumularse no permitiendo la pudrición de las raíces. Para las orquídeas terrestres es lo mismo solo que se pueden regar con más frecuencia pero sin mantenerlas saturadas (OSPINA y DRESSLER, 1979).

Según DUMOIS (2007), el agua es lo más difícil de controlar ya que depende de muchas variables como por ejemplo humedad relativa, tipo de sustrato, intensidad luminosa, temperatura y circulación de aire.

Además, muchas orquídeas necesitan un período de receso vegetativo que, si no es respetado, resulta en ausencia de floración. En general, hay que añadir agua en abundancia cuando la planta se encuentra en crecimiento activo, y reducirla después de la floración.

Las especies con pseudobulbos almacenan agua y están preparadas para su período de receso. Otras que no cuentan con estos órganos requieren de humedad más constante.

2.2.2 Luz. Ninguna planta puede crecer sin la iluminación adecuada. Muchas orquídeas viven en las alturas de los árboles y están expuestas a plena luz del sol, otras crecen en el suelo selvático, protegidas del sol por espesos follajes (ROLLKE, 2005). La función principal de la luz es activar el proceso de fotosíntesis. Los cultivadores han estudiado la luz y han descubierto que hay orquídeas que florecen con día largo y otras con día corto (OSPINA y DRESSLER, 1979).

Gracias a la fotosíntesis se convierten los minerales presentes en el ambiente en savia y nutrientes. Hojas oscuras y falta de floración indican falta de luz; hojas amarillas e incluso quemadas apuntan hacia un exceso de sol (DUMOIS, 2007).

2.2.3 Fertilización. Las orquídeas necesitan los mismos nutrientes que otras plantas. Un abono para orquídeas debe contener los nutrientes principales; nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), así como también oligoelementos como hierro (Fe), magnesio (Mg), zinc (Zn), estaño (Sn) y manganeso (Mn) (ROLLKE, 2005).

Por otra parte, la fertilización depende de varios factores, dentro de los cuales, los más críticos son:

- El medio utilizado
- La edad de las plantas
- Estado de las plantas ya sea floración, crecimiento, reposo.

En cuanto a absorción se ha demostrado que es igual de eficiente por vía foliar como a través de las raíces.

Es necesario tener en cuenta algunas reglas básicas a la hora de fertilizar las orquídeas: (Asociación Costarricense de Orquideología, A.C.O, 1970)

1. Regar las plantas antes de fertilizar,
2. Fraccionar las dosis,
3. Aplicar el fertilizante de forma líquida,
4. No usar fertilizantes sólidos,
5. No fertilizar las plantas recién plantadas,
6. No fertilizar plantas en reposo,
7. No abonar plantas enfermas.

2.2.4 Temperatura. Es conocido el hecho de que cada planta tiene límites de temperatura, dentro de los cuales prospera o perece. De ahí la necesidad de conocer las temperaturas correspondientes al lugar de donde viene cada especie de orquídea, pudiendo proporcionarle la temperatura adecuada (OSPINA y DRESSLER, 1979).

Se puede clasificar a las orquídeas como de clima cálido (temperatura nocturna mínima de 20°C); templado (mínimo de 13 a 18°C), y de ambiente frío (de 10 a 13°C) (DUMOIS, 2007).

Según SHEEHAN (1980), las temperaturas ideales para las orquídeas de origen tropical son 10°C en la noche y entre 21° - 24°C durante el día.

2.3 Germinación *in vitro* de semillas de orquídeas

La micropropagación de orquídeas está en vanguardia hoy en día. El estudio de cultivo de tejido de orquídeas se lleva a cabo en muchos laboratorios de todo el mundo (ARDITTI and ERNST, 1992).

2.3.1 Biología de las semillas. Las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas polvo porque son minúsculas y contienen pocas reservas de alimento. Estas semillas por lo general no germinan en el medio natural, a menos que sean infectadas por un hongo micorrízico. Este hongo abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento. Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo. Manteniendo las condiciones normales, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años, dependiendo de la especie, hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas. En el caso de orquídeas terrestres, es de vital importancia que la relación orquídea-hongo se conserve durante los estados tempranos del ciclo de vida de la planta ya que el protocormo enterrado no puede fabricar alimento por sí mismo. Por otro lado, los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento. La relación orquídea-hongo no ha sido en su totalidad investigada para el caso de las orquídeas tropicales (McKENDRICK, 2000).

2.3.2 Germinación simbiótica y no simbiótica de semillas. Mediante la germinación *in vitro* las semillas germinan en frascos de vidrio o plástico. Estos frascos contienen en su interior un medio nutritivo solidificado con agar, con todos los azúcares y minerales necesarios para la germinación y crecimiento de las semillas. Hay dos tipos de germinación, la simbiótica y la asimbiótica.

En la germinación simbiótica las semillas se siembran junto con una pequeña cantidad del hongo micorriza adecuado. Dicho hongo crece en el medio, coloniza a las semillas que están en proceso de germinación y se produce una relación simbiótica, la cual alimentará al protocormo hasta que este sea capaz de producir sus hojas y se vuelva autotrófico. Esta técnica es usada principalmente en propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas.

La germinación asimbiótica se usa principalmente en propagación de orquídeas tropicales, que crecen más rápido que sus parientes de zonas templadas. Para este tipo de germinación se necesita un medio de cultivo más complejo, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos así como también, los azúcares deben estar en forma disponible pues no existe la intermediación del hongo (McKENDRICK, 2000).

2.3.3 Condiciones de esterilidad. Tanto para la germinación simbiótica, como para la asimbiótica es de vital importancia que los frascos, las semillas, aparatos y el medio estén estériles desde el principio del proceso. Esto debido a que cualquier hongo o bacteria que se introduzca crecerá más rápido que las semillas ocupando su espacio hasta matarlas. Esto se evita gracias al autoclave, el cual, regulado a 1,2 atm. y 120°C por 20 minutos mata hongos o bacterias presentes en el medio (McKENDRICK, 2000).

2.3.3.1 Siembra de las semillas. Las semillas pueden ser recolectadas desde cápsulas verdes o maduras. La cápsula verde, que está madurando, está llena de semillas y no se deforma cuando se aprieta con las pinzas. Estas semillas pueden ser almacenadas por algunas semanas en un lugar refrigerado con bastante aireación.

Las semillas se pueden sembrar a partir de cápsulas verdes o semillas secas.

A continuación se muestran las ventajas y desventajas de ambos métodos:

- Siembra a partir de cápsulas verdes: Si las cápsulas se mantienen intactas, el interior (las semillas) se mantiene estéril. Por lo tanto si se esteriliza la parte exterior de las mismas, donde hongos y bacterias pueden desarrollarse, y se abren las cápsulas bajo condiciones estériles y las semillas podrán mantenerse desinfectadas.

La ventaja de este método es que no se requiere de esterilización de las semillas, lo que provoca su deterioro. Otro punto a favor es que algunas semillas podrían germinar más rápido que las provenientes de cápsulas maduras por los mecanismos de dormancia. La desventaja es que en este caso todas las semillas deben ser utilizadas o eliminadas, mientras que las semillas maduras se pueden almacenar. También se debe considerar que las semillas sembradas a partir de cápsulas que no han madurado lo suficiente podrían germinar lentamente o simplemente no germinar.

- Siembra a partir de semillas secas: En este caso una vez que la cápsula es abierta, las semillas dejan de ser estériles y requieren de un proceso de esterilización. Comúnmente, se utiliza una solución de hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio o peróxido de hidrógeno. Las semillas se agitan dentro de la solución que además contiene una gota de detergente para "humedecerlas", luego se las enjuaga con agua destilada y se las siembra en el medio preparado. La ventaja de este método es que las semillas pueden ser colectadas, secadas al aire, almacenadas por varios meses en el refrigerador y utilizarlas cuando sea necesario.

Se debe considerar que la siembra, ya sea de cápsulas verdes o de semillas secas, está determinado por la época en que se colectan (McKENDRICK, 2000).

2.3.4 Trasplante. En la cámara de incubación las plántulas se han desarrollado en condiciones limpias y en un ambiente cerrado, por lo que deben acostumbrarse gradualmente al ambiente exterior antes de ser trasplantadas a las macetas. También la temperatura y la luz, la cual es baja, han sido constantes durante el cultivo *in vitro*. En el medio natural la temperatura y la luz varían constantemente por lo que las nuevas plantas deben estar protegidas de la fuerte luz solar, la cual puede quemar las hojas con sólo una pequeña cantidad de ésta. La humedad en los frascos es alta y las plantas están protegidas de ataques por hongos o bacterias. Además, las plántulas han crecido bajo condiciones de alta humedad y por lo tanto, tendrán cutículas débiles, por lo que necesitan acostumbrarse a medios menos húmedos antes de ser trasplantadas.

Para el trasplante se deben colocar los frascos en un lugar protegido de la lluvia para que se aclimaticen a las nuevas condiciones de luz y temperatura. Se deben dejar por 2 a 4 semanas en los frascos tapados. Luego se debe ir aflojando las tapas para dejar entrar pequeñas cantidades de aire hasta el punto de dejarlas descubiertas. Se debe revisar si hay hojas marchitas y ver que el sustrato esté húmedo.

Lo ideal es dejarlas sin tapa durante una semana antes de pasarlas a las macetas. Para el trasplante se debe elegir un sustrato adecuado para el tipo de planta, humedecerlo y transplantar las plantas con cuidado de no dañar las raíces y evitando la deshidratación. En esta etapa también se debe dejar las macetas selladas para evitar una rápida deshidratación e ir abriéndolas paulatinamente (McKENDRICK, 2000).

2.4 Propagación de orquídeas selectas

2.4.1 Orquídeas terrestres.

2.4.1.1 *Cypripedium*. Esta es una orquídea terrestre de zonas templadas, se desarrolla en el Hemisferio Norte, como por ejemplo en Guatemala y en Honduras, pero donde se encuentra principalmente, es en China. Su forma más común de propagación es *in vitro*, a partir de semillas. La forma más eficiente es a partir de semillas inmaduras.

Existe un intervalo de tiempo entre la polinización y la fertilización, éste dependerá de la especie y de la zona donde se desarrolle. Se asume que existen aproximadamente cuatro semanas entre la polinización y la fertilización. El óptimo para una buena germinación de *Cypripedium* es entre 42 y 60 días después de la polinización, y entre 14 y 32 días después de la fertilización.

La germinación ocurre entre la segunda y cuarta semana, después de ser sembradas y los protocormos deberían ser cambiados de medio de cultivo cada dos a cuatro meses, si no se corre el riesgo de sufrir agotamiento de nutrientes. Los rizomas y las raíces se empiezan a desarrollar a partir de los siete meses, para luego dar lugar a las primeras hojas.

Para obtener un buen trasplante se deben tener raíces de mínimo un centímetro de largo. El desarrollo de raíces se ve potenciado al tener un período corto de bajas temperaturas (10°C), exposición a la luz, reducción en la concentración de iones del medio de cultivo o transferirlas a un compost estéril. Al tener raíces suficientes y el tamaño adecuado se podrán llevar las plantas al lugar donde crecerán definitivamente. En el momento del trasplante, las plantas son muy susceptibles al desecamiento, por lo cual, lo ideal es que los brotes sean más chicos que las raíces. El mejor sustrato sería aquel donde crece naturalmente la orquídea (RÄNNBÄCK, 2007).

2.4.1.2 Preservación *in vitro* de orquídeas terrestres poco frecuentes. Este estudio fue hecho para establecer que parte de tejido es viable para la micropropagación de orquídeas terrestres poco frecuentes del noreste de Europa, pudiendo así reestablecer dichas orquídeas a sus áreas correspondientes. La propagación *in vitro* de orquídeas

terrestres de clima templado es más difícil que las orquídeas epífitas de clima subtropical y tropical. Las orquídeas terrestres tienen requerimientos más estrictos que las epífitas y se conoce menos sobre sus necesidades específicas (VAASA y ROSENBERG 2004).

En Estonia existen 36 especies de orquídeas terrestres pero solo tres están bajo protección, *Dactylorhiza baltica*, *Dactylorhiza ruthei*, *Dactylorhiza praetermissa*. Como explantes para este estudio en el caso de *D. baltica*, se ocuparon protocormos, en los otros dos casos se utilizaron semillas semi maduras, las cuales fueron colectadas siete y diez semanas después de ser polinizadas. Para *D. baltica* se ocupó el medio Murashige y Skoog, suplementado con 0,5 mg/L de ácido naftalén acético (ANA) y 2 mg/L de isonpentenyl adenina. Para el caso de las semillas semi maduras se ocuparon los medios de Lindemann, de Heller, de Norstog y de Murashige y Skoog, como control.

La composición del medio y la madurez de las semillas influye mucho en el desarrollo de las orquídeas *in vitro*. Se ha demostrado que se necesita una alta concentración de microelementos para obtener una correcta germinación de las semillas. También se puede decir que los primeros tres meses son los de mayor crecimiento, luego de este tiempo el crecimiento se vuelve más lento (VAASA y ROSENBERG 2004).

Luego de cuatro semanas de crecimiento de *D. baltica*, el 60% de los explantes de meristemas apicales empezaron a crecer, en cambio los de meristemas laterales no expresaron ningún tipo de crecimiento. Las raíces empezaron su desarrollo luego de dos meses después de la siembra.

En el caso de *D. ruthei* y *D. praetermissa* la germinación se produjo después de dos meses desde la inoculación. Luego de cuatro y seis meses el mayor crecimiento fue observado en el medio Norstog, superando en 14% al medio testigo Murashige y Skoog, (VAASA y ROSENBERG 2004).

2.4.1.3 Longevidad de semillas de orquídeas terrestres. Por lo general, las orquídeas producen muchas, pero pequeñas semillas que contienen muy pocas reservas de alimento. Dichas semillas están estructuralmente adaptadas para ser dispersadas por el viento pero poco se sabe del destino de éstas luego de ser dispersadas.

Algunos estudios de viabilidad de semillas indican una sobrevivencia de uno a dos años en orquídeas de clima templado. Las semillas que son guardadas en laboratorio duran mucho más tiempo. Se estudió la viabilidad de siete especies de orquídeas norteamericanas, dentro de las cuales se encuentran *Goodyera pubescens* y *Liparis liliifolia*. Las semillas de éstas se colocaron en bolsas con suelo y sustratos de bosques provenientes de sus hábitats naturales (WHIGHAM *et al*, 2005).

En *Goodyera pubescens* la mayoría de las semillas germinaron en un año. Cuatro otras especies germinaron durante el período de observación, pero algunas semillas no germinadas después de siete años seguían siendo viables. En la especie, *Liparis liliifolia*, semillas que han estado cuatro años bajo observación, han tenido una tasa de

germinación de un 68% al ser sembradas *in vitro* junto con el hongo micorrízico adecuado.

Las dos especies restantes no germinaron durante el período de observación pero las semillas fueron evaluadas como intactas y testeadas positivamente en cuanto a su viabilidad después de cuatro años en el suelo.

Estas observaciones fueron interpretadas como diferentes estrategias para especies específicas de germinación *in situ* (WHIGHAM *et al*, 2005).

2.4.1.4 Sobrevivencia de orquídeas terrestres transplantadas a sectores urbanos.

La conservación de poblaciones de orquídeas silvestres depende del establecimiento de las orquídeas propagadas a los campos. Sin embargo, se conoce muy poco de los factores bióticos que influyen el establecimiento de orquídeas terrestres a sus hábitats naturales.

Un experimento fue establecido para medir la sobrevivencia de seis especies durante su primer período de crecimiento seguido del trasplante a un sector urbano en Australia (SCADE *et al*, 2006).

Las orquídeas germinadas simbióticamente crecieron en laboratorio durante cinco meses antes de establecer la plantación en sitios adyacentes con alta o baja cobertura de malezas. Existió una muerte gradual de las plántulas durante el primer período de crecimiento, primeramente por ataque de insectos, no siendo evitado por la presencia de una malla cobertora. Los índices de sobrevivencia varían desde 49% para *Microtis media* una especie capaz de crecer en un ambiente atípico, hasta un 21% para *Caladenia arenicola*, la orquídea nativa más común de esos sitios. Sin embargo, no todas las orquídeas sobrevivientes producen tubérculos, por lo que la tasa de sobrevivencia después del primer período seco disminuye.

La sobrevivencia de las orquídeas sembradas no puede ser comparada con orquídeas de la misma especie que crecieron en los mismos lugares ya que no existió la presencia del hongo compatible para estas orquídeas (SCADE *et al*, 2006).

2.4.1.5 Micropropagación de orquídeas terrestres. En India dos orquídeas muy importantes para la horticultura, del género *Anoectochilus*, fueron exitosamente propagadas. Nódulos aislados de *A. sikkimensis* colectadas en Himalaya y *A. regalis* colectadas en India fueron cultivadas *in vitro* durante 12 semanas para obtener un máximo de 4,8 a 5,6 protocormos y brotes obteniendo como resultado, un 95 y 98% de eficiencia respectivamente.

Durante el repicado de los explantes *in vitro* de *A. regalis* se observó que el número total de brotes obtenidos a partir de nódulos fue 21,4 así como también 8,2 puntas de brotes. En cambio para *A. sikkimensis* fueron mucho más bajos, 12,3 y 4,3 respectivamente, teniendo un crecimiento más lento pero plantas más fuertes. Las raíces de 4 a 6cm crecieron con la presencia de NAA (2.70 μM) en el medio, así como también con carbono activado (0,2%). Durante la aclimatación, la tasa de establecimiento fue entre 95 y 98%. Luego de seis meses en invernadero las plantas de *A. regalis* fueron transferidas a bosque nativo donde se obtuvo una tasa de

sobrevivencia de entre 70 y 95% después de 12 meses. Estas plantas establecidas en bosque nativo están libres de cualquier defecto morfológico y de crecimiento (GANGAPRASAD *et al*, 2000).

2.4.2 Orquídeas epífitas. Estas orquídeas viven en los árboles pero no obtienen de éste su alimento, no son parásitas.

2.4.2.1 Preservación de *Cattleya walkeriana* usando propagación *in vitro*. El género *Cattleya* se encuentra en México y América Central, así como también en Venezuela, Colombia y las laderas de los Andes.

Esta orquídea, también se encuentra en varias regiones del Brasil creciendo en árboles, rocas, cerca de ríos, lagos y pantanos. Las flores de esta orquídea son conocidas debido a su hermosura, y a causa de la destrucción de su hábitat y a la excesiva colección de éstas, se encuentra en extinción.

La composición del medio de cultivo es esencial para la propagación *in vitro* ya que supe todos los nutrientes necesarios para el desarrollo, y será distinto dependiendo de cada especie, en este caso se utilizó la mitad de los macronutrientes del medio. Muchos autores sugieren el uso de carbón activado en el medio, ya que por lo general, en muchas especies, aumenta el desarrollo de las raíces. En este estudio se probaron distintas dosis de carbón activado, 1, 2, 4 y 6g/L, con un pH de 6 (TADEU DE FARIA *et al*, 2002).

Las semillas se obtuvieron de flores artificialmente polinizadas en invernadero. Plántulas de aproximadamente un centímetro fueron seleccionadas y cultivadas nuevamente en el medio de cultivo Murashige y Skoog pero esta vez con las diferentes dosis de carbón activado. Se evaluó el número de raíces, el número de brotes y el peso de la materia verde total.

Durante el autoclavado se produce normalmente una hidrólisis de sacarina, la cual es de 10% aproximadamente, este porcentaje aumenta considerablemente al agregar un 1% de carbón activado, llegando a ser de 95%.

El desarrollo de las plántulas de *C. walkeriana* aumentan con una mayor concentración de carbón activado así como también un mayor tiempo de cultivo.

El resultado fue que la dosis ideal para el desarrollo de esta orquídea es 2g/L de carbón activado (TADEU DE FARIA *et al*, 2002).

2.4.2.2 Establecimiento de cultivos *in vitro* y micropropagación de *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Lindl.). Por medio de siembra *in vitro* se logró el establecimiento de *C. aurantiaca* con alto porcentaje de germinación y desarrollo de protocormos. Para la óptima formación de callo y para la proliferación de protocormos se determinaron los medios óptimos (MS 1.0 mg/L ANA, 1.0 mg/L BA), así como también de manera directa sobre explantes de hoja y pseudobulbos (MS 0.1 mg/L ANA, 0.1 mg/L GA₃).

Con este último medio, también se logró una óptima regeneración y desarrollo de plántulas. Los medios líquidos (sin agitación) son una buena opción para conseguir la producción masiva de protocormos, ya que con ellos se optimizó la micropropagación de *C. aurantiaca*. Las plántulas micropropagadas, presentaron alto porcentaje de sobrevivencia y buen desarrollo después de su trasplante y aclimatación, lo cual demuestra que es un buen sistema de propagación para *C. aurantiaca* (GUTIERREZ y SALGADO, 2007).

En cuanto a transplante y aclimatación, después de 45 días de desarrollo *in vitro*, las plántulas de un tamaño entre 3 y 5 cm, con raíces bien desarrolladas fueron llevadas a condiciones *ex vitro*, eliminando los restos de medio de cultivo con agua potable y ocupando un sustrato de partes iguales de tezontle y corteza de encino cubierta con hojarasca de encino finamente molida. Se mantuvieron cubiertas durante 15 días abriendo cada dos días hasta poder retirar la tapa en 30 días. Después de dos meses de haber sido retiradas del cultivo *in vitro*, las plántulas presentaron 70% de sobrevivencia y alcanzaron una altura de hasta 7 cm, presentando nuevas hojas y raíces; las plantas se muestran vigorosas y capaces de continuar su crecimiento en condiciones ambientales de invernadero (GUTIERREZ y SALGADO, 2007).

2.4.2.3 Establecimiento *in vitro* y regeneración de plantas de *Laelia autumnalis* (Llave y Lex.) Lindl. Para este estudio se obtuvieron las semillas de una cápsula desarrollada después de 6 meses de la floración, las cuales se sembraron *in vitro* sin presentar contaminación ya que la siembra por este método es muy eficiente en comparación al cultivo de semillas libres, donde algunas veces se presenta la contaminación.

Las observaciones se realizaron cada 15 días, la germinación se detectó en los primeros 15 días en la mayoría de los medios de cultivos probados, con la presencia de protocormos de 1mm de diámetro (HUAPEO y SALGADO, 2004).

El porcentaje de germinación que se obtuvo de las semillas cultivadas *in vitro* de *L. autumnalis* fue de 95 a 100% en todos los medios de cultivo, la única diferencia fue el tiempo entre las germinaciones. A excepción de las semillas cultivadas en el medio MS 100%, la germinación del 100% se obtuvo hasta los 30 días de cultivo, mientras que en el primero, la germinación fue a los 15 días del cultivo. Las plántulas con raíz y un par de hojas se lograron a los 90 días de cultivo en el medio MS 100%, alcanzando 0.7 mm de altura. Estas plántulas fueron subcultivadas en medio MS con 0.5 mg/l de ANA y 0.1 mg/l de GA₃ para tener plántulas fuente de explante (segmentos de hojas), un medio óptimo de desarrollo de plántulas de *L. speciosa*. No fue necesario probar otros medios de cultivos ya que se hicieron pruebas anteriores que demostraron que era el adecuado.

Las plántulas de 6 meses de cultivo *in vitro* después de su germinación, presentaron una altura promedio de 5 cm, con raíces con velamen y hasta dos pares de hojas. Segmentos de hoja de éstas fueron cultivadas en el medio MS conteniendo ANA, BA y GA₃ en diferentes concentraciones y se realizaron observaciones cada 30 días, para determinar medios inductores de callo, protocormos y raíces. La mejor respuesta en formación de callo fue observada en los segmentos de hoja de plántulas de *L. autumnalis* cultivados en MS con 1 mg/l de ANA, BA y GA₃, iniciando la inducción de

éste desde los 30 días de cultivo, solamente en un 70% de los explantes cultivados. El 100% se logró a los 90 días de cultivo, observando callo abundante alrededor de todo el tejido, de color blanco con puntos pigmentados de color verde. La regeneración de protocormos de esta orquídea se estableció con la siembra de segmentos de hoja de plántulas de 6 meses de edad, de manera directa o a partir de callos. En callos la producción fue óptima en el medio MS con 0.1 mg/l de ANA/BA/GA₃, ya que a los 60 días se obtuvieron 50 protocormos por segmento de callo. Solamente se produjeron 10 protocormos por explante al cultivarse los segmentos de hoja en MS con 0.1 mg/l de ANA/BA/GA₃, a los 120 días de cultivo (HUAPEO y SALGADO, 2004).

2.5 Aclimatación

Aclimatación significa que el hombre intercede y guía el proceso de acondicionamiento de las plantas hasta que éstas sean aptas para crecer en el campo y/o invernadero.

Un alto número de plantas micropropagadas no sobreviven al cambio desde el cultivo *in vitro* hacia el ambiente exterior, ya sea en campo o invernadero. Éstos dos últimos tienen menor humedad relativa, niveles más altos de luminosidad y un ambiente séptico los cuales son más estresantes para las plantas micropropagadas. La mayoría de las especies que crecen *in vitro* necesitan un proceso de aclimatación, pudiendo obtener así un número suficiente de plantas vivas y vigorosas para trasplantar al suelo (DEBERGH and ZIMMERMAN, 1991).

La aclimatación no es únicamente para micropropagación, siendo usada además en propagación convencional durante años. Después de cortar las hojas y de haber formado raíces, por lo general, son aclimatadas antes de ser llevadas al campo o invernadero. Ejemplos de dos técnicas comunes son bajar gradualmente la humedad y mantener el nivel de luz con un 50% de sombra antes de trasladarlos al campo. Las raíces que han sido cortadas y mal limpiadas, muchas veces son focos de infección. En estos casos las plantas muestran signos de marchitez, hojas necrosadas y también se puede llegar a la muerte de éstas.

El cultivo *in vitro* reduce la necesidad de fotosíntesis ya que las condiciones de la cámara de incubación proveen a la planta de sacarosa u otro azúcar. También en estas condiciones se reduce el *stress* por patógenos al ser un ambiente aséptico. Todo esto se traduce en que las plantas micropropagadas no son aptas para el campo y/o invernadero (DEBERGH and ZIMMERMAN, 1991).

2.5.1 Stress hídrico. El *stress* hídrico puede ser el resultado de una excesiva transpiración de las diferentes partes aéreas de las plantas, especialmente de las hojas, o por una inadecuada absorción de agua por parte de las raíces. La cutícula y los estomas son la ruta primaria de pérdida de agua desde de las hojas provenientes de esta técnica reproductiva.

2.5.1.1 Cutícula. La cutícula es una membrana compuesta por una matriz de cutina que a su vez se encuentra cubierta en su superficie por ceras cuya función primaria consiste en limitar la pérdida de agua por transpiración. La permeabilidad del agua a través de la cutícula se ve influenciada principalmente por la estructura y la cantidad de

ceras cuticulares y epicuticulares, no viéndose afectada la pérdida de agua por el grosor de ésta o la naturaleza química de la matriz de la cutina.

La estructura cristalina de la parte encerada de las hojas es distinta en las plantas micropropagadas con respecto a las plantas que crecen en el campo.

La cera epicuticular de las hojas de plantas *in vitro* tienen una proporción más alta de esteroides y de componentes polares, por el contrario tienen unas cadenas de hidrocarburos mucho más cortas. Esto hace que las plantas *in vitro* pierdan más agua que las cultivadas en campo o invernadero.

Las plantas que han crecido en el campo son naturalmente de color verde, pero el color de las plantas cultivadas *in vitro* es diferente y se puede ver a simple vista. Las plantas que son pasadas a invernadero, y que tengan un color verde se aclimatan de mejor forma al ambiente exterior (DEBERGH and ZIMMERMAN, 1991).

2.5.1.2 Estomas. La estructura estomática y su funcionamiento han sido implicados recurrentemente en el desbalance de agua exhibido por plantas micropropagadas al momento de ser removidas del cultivo *in vitro*. Estudios con microscopía de scanner electrónico han indicado que la estructura estomática presente en algunas especies de plantas cultivadas *in vitro* difieren marcadamente de las cultivadas en invernadero o en el suelo. Debido a que las primeras presentan estomas de mayor tamaño y más redondos, a diferencia de las plantas cultivadas de manera normal que presentan estomas más pequeños y elípticos lo que resulta en una deshidratación más rápida en el caso de las provenientes de cultivo *in vitro* (DEBERGH and ZIMMERMAN, 1991).

2.5.2 Humedad. Debido a la anatomía y la condición fisiológica de las plantas desarrolladas *in vitro*, donde se ha mantenido una alta humedad relativa, es necesario regar al momento del traslado para obtener una alta sobrevivencia. Muchos laboratorios aseguran que hay que evitar tener un sistema de aspersión, ya que se produce el ambiente necesario (muy húmedo) para la aparición de hongos, algas o bacterias. Otros métodos incluyen el uso de humidificadores o poner las macetas en un lugar cerrado donde se retenga vapor, para esto se pueden usar, por ejemplo, tapas de polietileno. Este método es relativamente económico pero se debe tener control del calor y monitorear la falta de agua (DEBERGH and ZIMMERMAN, 1991).

2.5.3 Luz. Durante la etapa *in vitro* las plantas están expuestas a altos niveles de luminosidad, lo que se traduce en hojas delgadas. Antes del traslado, se recomienda mantener las plantas con un 50% de sombra para así poder aclimatarlas de mejor manera, esto debido a que las plantas micropropagadas tienen un bajo control sobre la transpiración y un inadecuado mecanismo de fotosíntesis. La sombra reduce la transpiración evitando excesivas pérdidas de agua, así como también el exceso de luz destruye las moléculas de clorofila. Luego del período bajo sombra se deben mover las macetas gradualmente hacia el nivel de luz al cual será llevado para su crecimiento final (DEBERGH and ZIMMERMAN, 1991).

2.5.4 Temperatura. La temperatura del aire y del medio o sustrato de crecimiento está generalmente controlado durante el período de aclimatación. El calor es necesario en los meses de invierno y el frío (enfriar) es esencial en los meses de verano. Ajustando la cantidad de sombra y humedad se obtiene un control sobre la temperatura. El

enfriamiento se puede obtener gracias a ventilación, abanicos, niebla o aire acondicionado. El calor puede provenir del sistema existente en el edificio o invernadero donde estén ubicadas las macetas o por las lámparas ocupadas para el control del fotoperíodo. El rango de temperatura que se mantiene, por lo general, es entre los 13 y 30°C y esta determinado principalmente por la especie en cuestión.

La temperatura de la zona donde se encuentran las raíces es muy importante para el crecimiento, lo ideal es que dicho sector tenga una mayor temperatura que el aire, fomentando el crecimiento de las raíces e incrementando la humedad alrededor de la planta. Durante el verano esto es difícil de obtener ya que la temperatura del aire es muy alta debido a la alta radiación solar. Terminado el proceso de aclimatación esto ya no es necesario (DEBERGH and ZIMMERMAN, 1991).

2.5.5 Fotosíntesis. Las plantas sufren un cambio radical cuando son removidas desde cultivo *in vitro*, ya que son forzadas a cambiar de heterotróficas a autotróficas y la fotosíntesis se vuelve fundamental para la sobrevivencia. Las hojas de las plantas *in vitro* no están formadas para hacer fotosíntesis, ya que en la cámara de incubación no se produce un fuerte intercambio gaseoso, esto debido a que la sacarosa es entregada a través del medio de cultivo. Las hojas de las plantas que son trasladadas al campo o invernadero, sufren deterioro, debido a que no están formadas para la fijación de carbono. Esto se produce por un tiempo aproximado de cuatro semanas, después de las cuales las hojas nuevas suplen a las viejas.

Otro punto es que las hojas de las plantas cultivadas *in vitro* contienen menor proporción de clorofila que las plantas que han crecido normalmente en el campo.

En un estudio de coliflor cultivado *in vitro*, se midió el CO₂ y se obtuvo un balance negativo el cual se mantuvo durante dos semanas después del transplante. Algo similar ocurrió con frutilla, después del transplante las hojas se deterioraron rápidamente, lo que quiere decir que no hubo incremento en la fijación de carbono, indicando falta de desarrollo en la competencia fotosintética.

El bajo nivel de CO₂ durante el cultivo *in vitro* limita el proceso de fotosíntesis, lo cual se puede compensar usando sacarosa en el medio de cultivo. También se puede incrementar el nivel de luz y CO₂, obteniendo un fuerte aumento en el crecimiento de varias especies como orquídeas, clavel, etc. (DEBERGH and ZIMMERMAN, 1991).

2.5.6 Sustrato. Un sustrato es todo material sólido distinto del suelo, natural, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, desempeñando, por lo tanto, un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta (INFOAGRO, 2007).

El sustrato y los contenedores dentro de los cuales se van a transplantar las plántulas *in vitro* son importantes para una buena sobrevivencia.

Los sustratos ejercen una influencia significativa en la arquitectura del sistema radical de las plantas y en las asociaciones biológicas de este con el suelo, influenciando el

estado nutricional y la translocación de agua en el sistema suelo-planta-atmósfera. Uno de los requisitos fundamentales que debe cumplir el sustrato para su utilización es la sanidad.

Cuando estos no se elaboran, almacenan o manejan correctamente, pueden contaminarse y provocar serios daños a las plantas durante la aclimatación, por esta razón son preferidos, como componentes para su elaboración, materiales inertes o aquellos en las cuales el proceso de obtención garantice la mayor desinfección posible.

Uno de los factores de mayor importancia a la hora de seleccionar los materiales que pueden constituir el sustrato, es su disponibilidad, tanto en términos de facilidad de obtención o suministro, como de su costo (VILCHEZ, *et al*, 2007).

La presencia de inhibidores o también cambios en el pH del sustrato pueden afectar el crecimiento de las raíces y consecuentemente el éxito del transplante.

Muchos laboratorios y viveros transplantan a un sustrato uniforme, debiendo ser éste adecuado en cuanto a: soporte de las plantas, pH, porosidad, aireación y drenaje (DEBERGH y ZIMMERMAN, 1991).

3 MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización de este trabajo se utilizó el siguiente material y método.

3.1 Material

La investigación se realizó en el laboratorio e invernadero de Cultivos de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

3.1.1 Material vegetal. Se utilizaron plántulas de *C. virescens*, cultivadas *in vitro* a partir de semillas, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio, estas plántulas fueron separadas y repicadas para aumentar la población y obtener la cantidad necesaria para el ensayo.

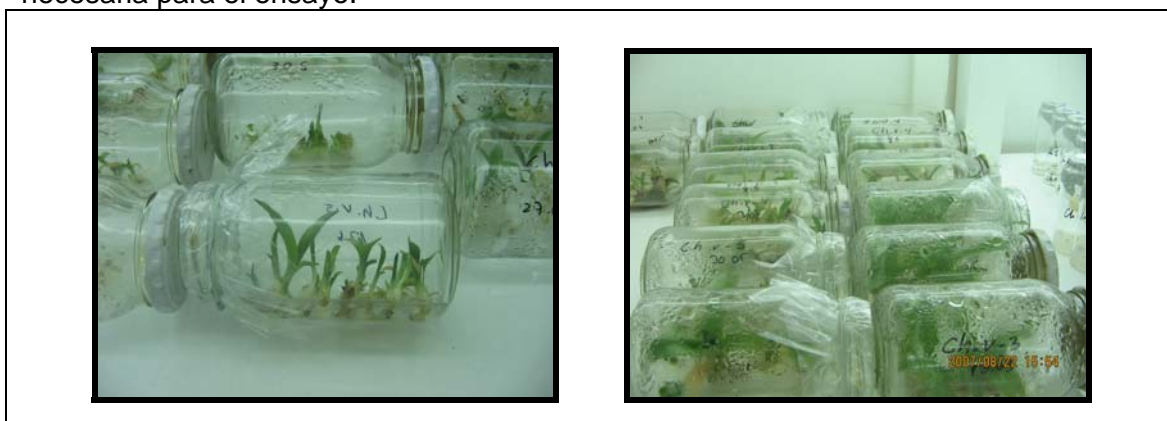


FIGURA 2 Plántulas de *C. virescens* en cámara de crecimiento *in vitro*.

3.1.2 Materiales. Los materiales que se utilizaron fueron los siguientes:

- Equipos: autoclave, cámara de flujo laminar, dispensador de medios, medidor de pH, agitador magnético, horno microondas, balanza, mechero, termómetro.
- Materiales: vasos de precipitado, matraces, probetas, pipetas, papel de aluminio, frascos de vidrio, placas Petri, pinzas, bisturí, macetas, regadera.
- Soluciones: soluciones madre (Medio MS), gelificante, etanol 70 y 95%.

3.2 Método

A continuación se da a conocer la metodología con la cual se trabajó:

3.2.1 Preparación del medio de cultivo. Para la obtención de plantas a través de la micropropagación, se ocupó el medio basal de MURASHIGE y SKOOG (1962), también llamado medio MS. Este medio tiene un pH de entre 5,6-5,7. Posteriormente se dosificó con el dispensador de medios, para que cada frasco tenga una cantidad adecuada (25 mL) y se llevó a autoclave para esterilizar a 1,2 atm. 120° C por 20 min.

3.2.2 Obtención del material vegetal. Al tener el medio esterilizado se procedió a la separación y repicado de plántulas existentes en el laboratorio. Las siembras se realizaron en el mes de mayo del 2007.

Estas siembras se realizaron en la cámara de flujo laminar, de modo de asegurar que la siembra sea 100% aséptica.

Estas plántulas fueron mantenidas en la cámara de incubación hasta obtener los tamaños requeridos para el ensayo, donde las condiciones fueron las siguientes:

- Temperatura ambiental de 23-25° C.
- Fotoperíodo de 16 horas.
- Intensidad lumínica controlada de 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.2.3 Sustratos. Se utilizaron tres tipos de sustratos, el primero corresponde a una mezcla de turba + perlita (1:1), el segundo corresponde a *Sphagnum* (100%) y el tercero corresponde a una mezcla de turba + arena (1:1). Una vez realizadas las mezclas se procedió a una esterilización en un autoclave a 121° C por 20 minutos a 1,2 atmósfera.

De esta forma se trabajó con material limpio y sano, evitando ataque de hongos o bacterias.

El análisis químico de los sustratos se muestra en el Anexo 2.

3.2.4 Plantación. Las plántulas con un promedio de cuatro meses en condiciones de cámara de crecimiento *in vitro*, obtuvieron el tamaño adecuado para ser utilizadas. Se sacaron de los frascos y se plantaron en las macetas de plástico transparente con los sustratos. Posteriormente fueron dejadas en la sala del laboratorio, donde se debió asperjar con solución nutritiva Hoagland y fungicida Captan.

CUADRO 1 Composición de solución nutritiva Hoagland:

KNO ₃	1,02 g/L
Ca(NO ₃), 4 H ₂ O	0,492 g/L
NH ₄ H ₂ (PO ₄)	0,23 g/L
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,49 g/L
H ₃ BO ₃	2,86 mg/L
MnCl ₂ , 2 H ₂ O	1,81 mg/L
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,08 mg/L
ZnSO ₄ , 5 H ₂ O	0,22 mg/L
Na ₂ MoO ₄ , H ₂ O	0,09 mg/L
FeSO ₄ , 7 H ₂ O 0,5 %	0,6 mL

FUENTE: FINCK, 1988.

3.2.5 Diseño de los ensayos. Este trabajo de investigación constó de un ensayo con dos etapas. Antes que todo, se realizó la separación y repicado *in vitro* de plántulas de *C. virescens*, para la obtención del número necesario de plantas.

En la etapa 1 se utilizaron tres tamaños de plántulas obtenidas *in vitro*: de 1-2cm, de 2-3cm y de más de 3cm de altura, que se transplantaron a tres sustratos: turba + perlita 1:1(v/v), *Sphagnum* (100%) y turba + arena 1:1 (v/v). La turba provino de la Sociedad

Minera Patagonia Peat S.A. en Hijuelas, el *Sphagnum* de la empresa Lonquen Chile, de Puerto Montt y la perlita se obtuvo a través del sitio web www.jardisen.cl. (representante legal: Walter Rathgeb Penza, Ingeniero Agrónomo, Santiago).

Las plántulas se plantaron de acuerdo a su tamaño, las de más de 3cm se colocaron de 6 por maceta, las de 2 a 3cm de a 8 por maceta y las más chicas de a 10 por maceta. Estas macetas fueron dejadas en una sala de aclimatación con una temperatura promedio de 20° C, intensidad lumínica de 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 14-16 hrs. de fotoperíodo. Se fertilizó asperjando cada cinco días con solución nutritiva Hoagland. Esta etapa se llevó a cabo durante dos meses, desde el cinco de septiembre hasta el cinco de noviembre de 2007.

En la etapa 2 se continuó el proceso de aclimatación en invernadero de las plántulas obtenidas en la etapa 1, que después de dos meses tenían un mayor tamaño y se habían acondicionado al ambiente exterior (fuera de la cámara de crecimiento). Las plantas se mantuvieron en las macetas durante tres semanas para aclimatarlas y luego las plantas sobrevivientes fueron transplantadas a macetas más grandes individuales durante tres meses aproximadamente, hasta el cinco de marzo 2008. Estas nuevas macetas tuvieron como sustrato turba y suelo (trumao) en igual proporción (Anexo 2).

La temperatura promedio de invernadero fluctuó de 13 a 35 °C, según el mes. En enero el promedio fue de 25 (Anexo 3). Para bajar la temperatura alrededor de 5° C se instaló una malla Rachel.

3.2.6 Diseño experimental. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, ordenado como experimento factorial con dos factores; tamaño (3) y sustrato (3). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones con un mínimo de 6 plantas por recipiente.

3.2.7 Variables a evaluar. Durante los dos meses en que las macetas estuvieron en la sala de aclimatación, se evaluó el desarrollo foliar contando el número de hojas una vez al mes.

Posteriormente se trasladaron las mismas macetas a invernadero durante tres semanas, para continuar con la aclimatación de las plántulas. Transcurrido este tiempo se transplantaron las plántulas sobrevivientes a macetas individuales, y continuó mensualmente la evaluación de éstas (número de hojas) hasta la obtención de plantas establecidas.

Al momento del transplante y al final del ensayo se evaluó el número de raíces, así como también al final del ensayo se evaluó el crecimiento en altura (cm).

La sobrevivencia fue evaluada al final del ensayo por maceta.

Tanto en la sala de aclimatación, cómo en el invernadero se registró la temperatura con la ayuda de un termómetro de máxima y mínima (Anexo 3).

3.2.8 Análisis estadístico. Una vez obtenidos los datos se procedió a comprobar si estos cumplían con los supuestos de aleatoriedad, normalidad y homogeneidad de varianzas, que exige este tipo de análisis. En el caso de no cumplirse estos supuestos, los datos se transformaron utilizando $\log_{10}(x+0,5)$, raíz(x+0,5) o $1/x$ para normalizarlos

y enseguida se sometió los datos a un análisis estadístico (ANDEVA). Posteriormente, en los casos en que se observó diferencias significativas en el ANDEVA, se aplicó una prueba de rangos múltiples (Tukey) al 5% de significancia.

Para las variables no paramétricas, que no cumplieron con los supuestos para un análisis de varianza, se realizó la prueba de Kruskal–Wallis, y las comparaciones múltiples a través del test de Dunn, con un nivel de 5% de significancia.

Se utilizaron los programas estadísticos: STATGRAPHICS 2.0 y GRAPHPAD PRISM 5, para el análisis de datos.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS.

En los siguientes puntos se discuten los resultados obtenidos en la aclimatación de plántulas de *Chloraea virescens*.

En la Figura 3 se observan plántulas de *C. virescens* micropropagadas en medio MS en cámara de crecimiento al inicio del ensayo (A) y en invernadero después de 180 días de aclimatación (B).

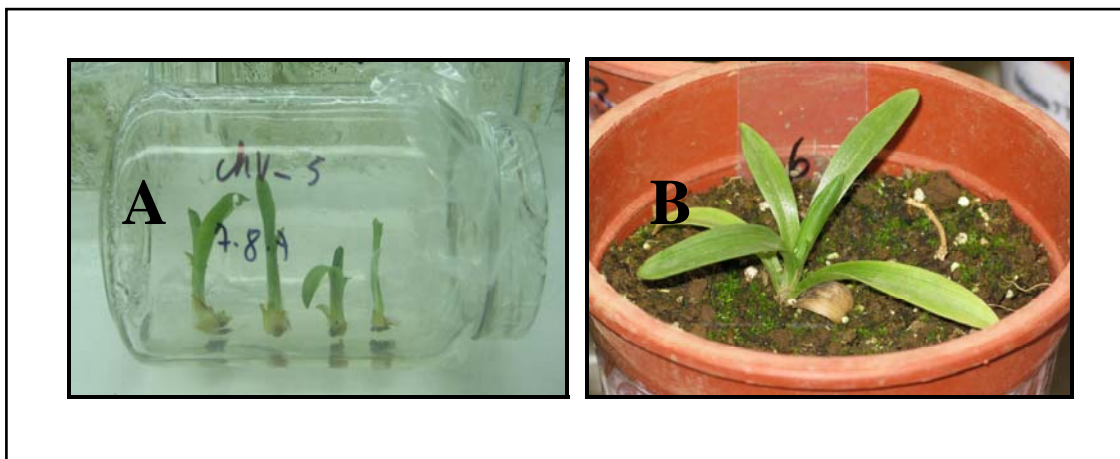


FIGURA 3 A: Plántulas micropropagadas de *Chloraea virescens* en medio MS. B: Plántulas después de 180 días de aclimatación.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las variables analizadas (Cuadro 2 y 3), de esta manera se pueden visualizar en general los resultados obtenidos en el proceso de aclimatación durante seis meses.

CUADRO 2 Variables no paramétricas: número final de hojas, número de raíces inicial y final.

	Variables		
	Hojas finales (número)	Raíces iniciales (número)	Raíces finales (número)
Tamaño de plántulas			
Pequeñas (1-2cm)	3,6*	2,4*	3,7*
Medianas (2-3 cm)	4,7*	2,9*	4,6*
Grandes (> 3 cm)	6,1*	4,3*	7,6*
Sustratos			
Turba+perlita (A)	5,3*	3,6*	5,6
Sphagnum (B)	4,3*	2,9*	5,1
Arena+turba (C)	4,6*	2,7*	4,9

* Significa que hay diferencias significativas al 95%, Test de Dunn.

Las variables no paramétricas evaluadas según tamaño de plántulas y sustrato presentaron diferencias significativas en hojas finales y raíces iniciales en sus rangos de distribución. Las raíces finales no presentaron diferencias según el sustrato utilizado, pero de acuerdo al tamaño hubo diferencias en su distribución.

CUADRO 3 Variables paramétricas: altura final de plántulas y sobrevivencia de plántulas.

	Variables	
	Altura final de plántulas (cm)	Sobrevivencia %
Tamaño de plántulas		
Pequeñas (1-2cm)	3,6 c	56,7 b
Medianas (2-3 cm)	4,7 b	82,1 a
Grandes (> 3 cm)	5,9 a	90,8 a
Sustratos		
Turba+perlita (A)	5,2 a	93,3 a
Sphagnum (B)	4,1 ab	59 b
Arena+turba (C)	4,9 b	77,2 a

Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas al 5% TUKEY.

Las variables paramétricas evaluadas según tamaño de plántulas y sustrato presentaron diferencias significativas en altura final de hojas y en sobrevivencia.

4.1 Número de hojas finales

A continuación se presenta la influencia de los diferentes tamaños de plántulas y de sustratos, para la variable número final de hojas.

4.1.1 Efecto del tamaño de plántula. Según el Cuadro 2 y Figura 4, las plántulas presentaron diferencias estadísticas significativas sobre el número final de hojas.

Las plántulas pequeñas, de 1-2 cm, obtuvieron el número más bajo de hojas finales, con una media de 3,6 hojas por plántula lo cual es la mitad de las hojas finales que se obtuvo con las plántulas de mayor tamaño (6,1 hojas aproximado por plántula). Para las plántulas medianas de 2-3 cm se obtuvo una media de 4,7 hojas por plántula (Figura 4).

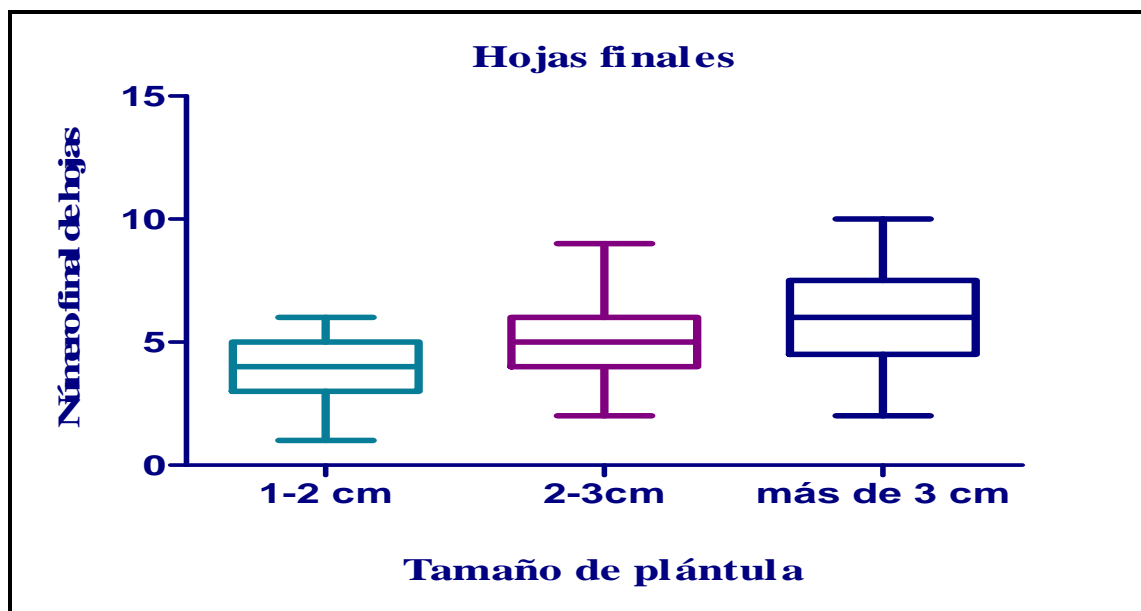


FIGURA 4 Efecto del tamaño de plántula sobre la variable no paramétrica número final de hojas (Test de Dunn).

BLANCO (2006), señala que plántulas cultivadas *in vitro* crecen bajo condiciones especiales como alta humedad relativa y baja luminosidad, además son suplidas con sacarosa. Estas condiciones fueron proporcionadas en una cámara de crecimiento en el laboratorio, donde, las plantas micropropagadas no son dependientes por completo de su fotosíntesis, son heterótrofas. Parece ser necesario un estímulo para convertirse en organismos totalmente capaces de sustentar sus propios requisitos de carbono y nitrógeno reducido, pasando de esta manera a ser autótrofos.

Al ser sacadas de un medio *in vitro* las hojas no están preparadas para producir su propio alimento, y sobreviven gracias a que el medio de cultivo le proporciona los nutrientes necesarios para vivir. En este punto muchas de las hojas mueren y nacen hojas nuevas capaces de generar su alimento, supliendo así las hojas viejas (SEELYE *et al*, 2003). En este ensayo las plántulas de *Chlorella virescens*, presentaron en general una buena adaptación al ser sacadas de un medio *in vitro*.

Se observó que plántulas con menor tamaño, al ser aclimatadas y tener menor tejido, fue más difícil y más lento que empezaran a generar nuevos tejidos y materia orgánica a partir de dióxido de carbono. POSPÍŠILOVÁ *et al*, (1999) señala que al tener los estomas con desarrollo incompleto, más grandes y de forma más redonda, pierden más agua, lo cual puede provocar una pérdida de hojas, muriendo así la plántula. Por esta razón las plántulas pequeñas se demoran más tiempo en generar hojas nuevas, es por ello que al finalizar este estudio muestran el menor número final de hojas.

4.1.2 Efecto del tipo de sustrato. Al analizar la influencia del tipo de sustrato se encontraron diferencias significativas entre los tres sustratos utilizados. Según el Cuadro 2 y la Figura 5 el sustrato donde se obtuvo mejores resultados fue

turba+perlita, en el cual se observó un promedio de 5,3 hojas por plántula, siendo *Sphagnum* el más bajo con 4,3 hojas por plántula.

De acuerdo a los resultados del análisis químico de los sustratos ocupados, el sustrato turba+perlita tiene mayor cantidad de nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio y azufre disponible comparativamente con los otros dos sustratos (*Sphagnum* y arena+turba) (Anexo 2).

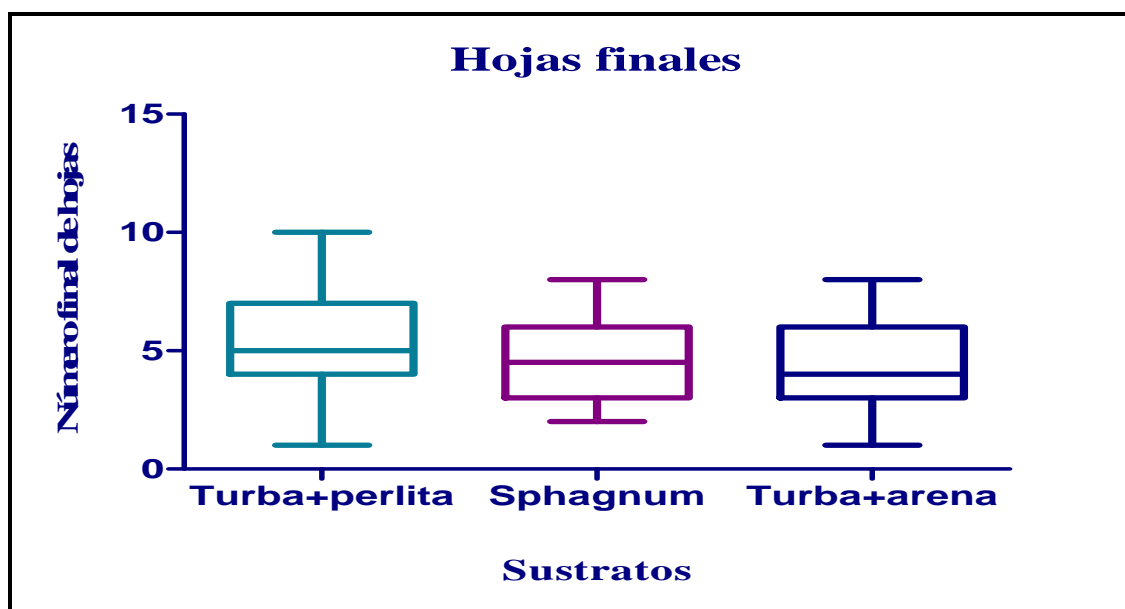


FIGURA 5 Efecto del sustrato sobre la variable no paramétrica número final de hojas (Test de Dunn).

Para la brotación y el crecimiento de las plantas, se necesita agua y Nitrógeno lo que favorece a una mayor tasa de aparición de hojas lo que se traduce en una mayor cantidad de hojas finales. El Nitrógeno se encuentra en mayor cantidad en el sustrato turba+perlita, debido a lo cual los mejores resultados se obtienen en dicho sustrato.

4.1.3 Interacción entre tamaño de plántula y sustrato. Después de analizados los efectos individuales del tamaño y del sustrato, al interactuar ambos factores existen diferencias significativas. La mejor interacción se obtuvo con el sustrato turba+perlita y con el mayor tamaño de la plántula (Figura 6).

Debido a la buena estructura (porosa) de dicho sustrato, se podría decir que se favoreció la absorción radicular de nutrientes obteniendo por ello un mayor número de hojas finales.

Para los menores tamaños no se observan diferencias significativas obteniendo como promedio 4,1 hojas por plántula. Para el mayor tamaño el promedio fue de 6 hojas por plántula.

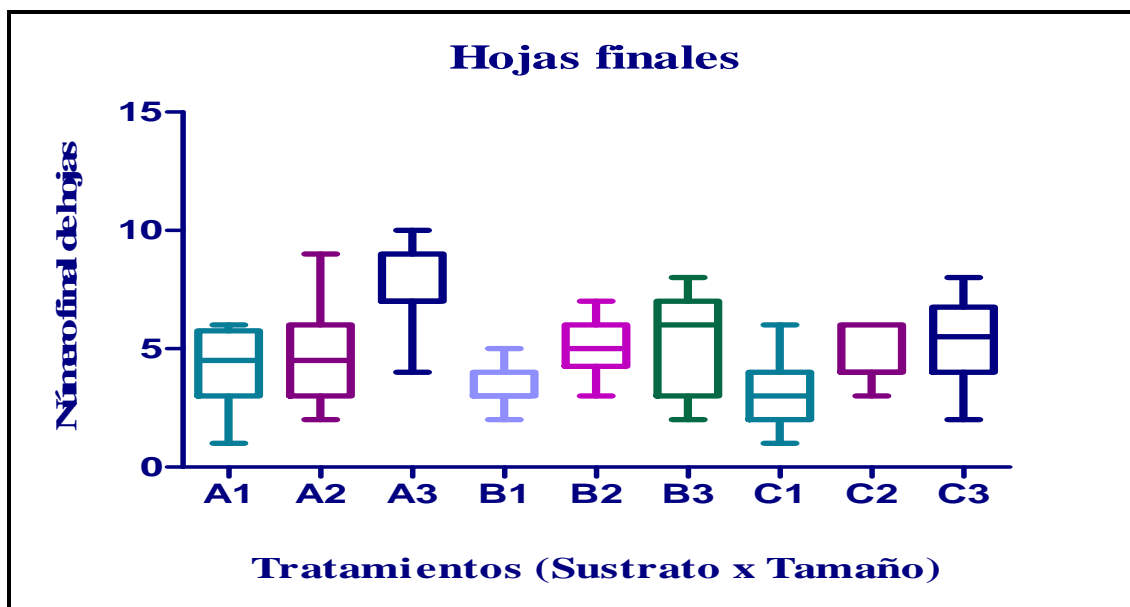


FIGURA 6 Efecto del tamaño y del sustrato sobre la variable no paramétrica número de hojas finales (Test de Dunn).

4.2 Raíces iniciales

Este parámetro se evaluó luego de la primera etapa de aclimatación la cual se realizó en una sala de aclimatación del laboratorio.

Se analizó la influencia de diferentes tamaños de plántula y de sustratos, sobre la variable número raíces iniciales (Análisis de Kruskal-Wallis en Anexo 7).



FIGURA 7 Desarrollo de raíces y número de hojas después de dos meses de pre aclimatación.

En la Figura 7 se puede observar los resultados de pre aclimatación en sala de laboratorio. En esta etapa ya es posible ver la presencia de raíces desarrolladas.

4.2.1 Efecto del tamaño de plántula. En el Cuadro 2, se puede observar que las plántulas presentaron diferencias estadísticas significativas sobre el número inicial de raíces y en la Figura 8 se puede comprobar que para los dos tamaños de plántula más pequeños, no se observa gran cantidad de raíces, esto no impidió el desarrollo posterior de las plántulas, las cuales lograron enraizar al final del estudio. Esto se contrapone a lo observado en un estudio de *Lapageria rosea*, donde la presencia de raíz y brote para lograr una multiplicación exitosa de plantas es de vital importancia. Incluso algunas plántulas de *L. rosea* no brotan en condiciones *in vitro*, en donde tienen las mejores condiciones nutricionales y hormonales para hacerlo. Esto se debe a factores internos de la plántula, siendo muy difícil que broten inmediatamente en cámara de aclimatación, donde ya dejan de recibir los nutrientes necesarios de manera directa y requieren de balances de energía para poder seguir elongando raíces, absorber nutrientes y brotar para poder obtener los carbohidratos necesarios para seguir su crecimiento (BLANCO, 2006).

El tamaño de plántula tiene importancia para el desarrollo de raíces, se distingue notoriamente que en los tamaños más grandes el número de raíces es mayor comparativamente con los tamaños pequeños, donde el número de raíces fue escaso. Debido a la presencia de más hojas, existe una mayor cantidad de área fotosintética, esta situación estimula el crecimiento de las raíces para la obtención de agua y nutrientes.

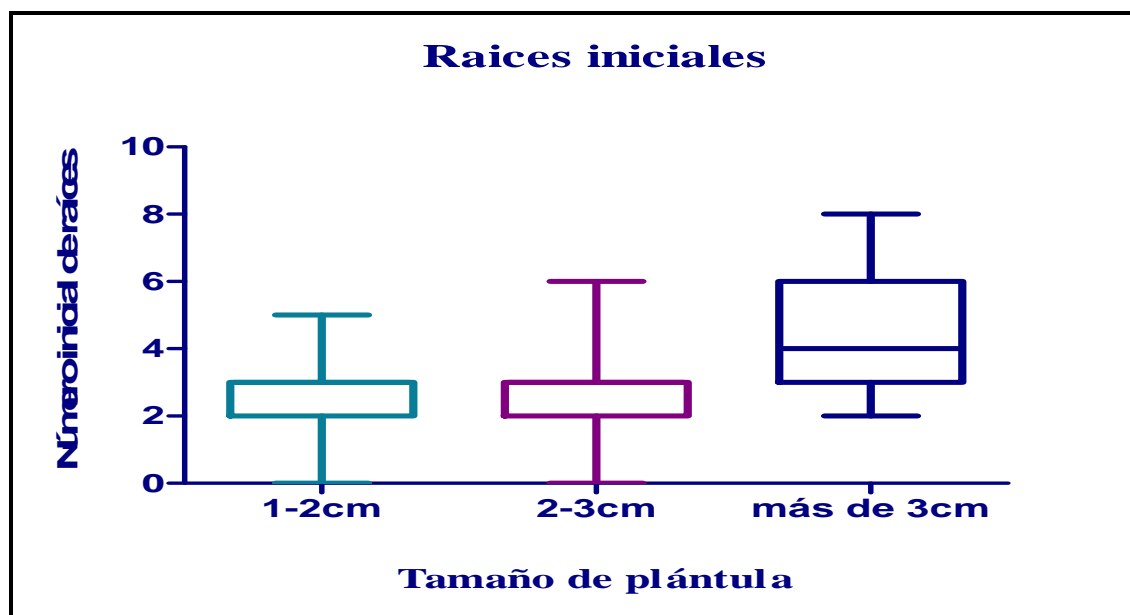


FIGURA 8 Efecto del tamaño de plántula sobre la variable no paramétrica número inicial de raíces (Test de Dunn).

4.2.2 Efecto del tipo de sustrato. Para el sustrato turba+perlita se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de raíces con respecto a los dos otros sustratos, esto se puede ver en el Figura 9 donde se observa que se obtuvieron los mayores resultados.

En cualquier medio de crecimiento, el espacio no ocupado por un sólido se llama porosidad, este espacio puede ser ocupado en parte para retener agua y en parte para proporcionarle aire a las raíces. La ausencia de uno de estos elementos es perjudicial para las plantas. La turba es conocida por tener estas propiedades y la perlita también, por esta razón se sabe que la mezcla turba-perlita provee propiedades físicas excelentes como medio de crecimiento y propagación (INFOAGRO, 2007).

Estos resultados con turba-perlita (29,8% de materia orgánica) coinciden con los obtenidos por DIAZ *et al* (2004), quienes al utilizar un sustrato compuesto por 100% de humus de lombriz para aclimatar caña de azúcar, obtuvieron el mayor número de raíces. Esto puede atribuirse al importante aporte de materia orgánica del humus (47%) lo que le confiere una mejor estructura obteniéndose una excelente porosidad del sustrato. La aireación del suelo es necesaria para favorecer la máxima absorción de nutrientes por las raíces. Esto también sucede en el sustrato turba+perlita el cual posee la mayor cantidad de materia orgánica de los tres sustratos utilizados.

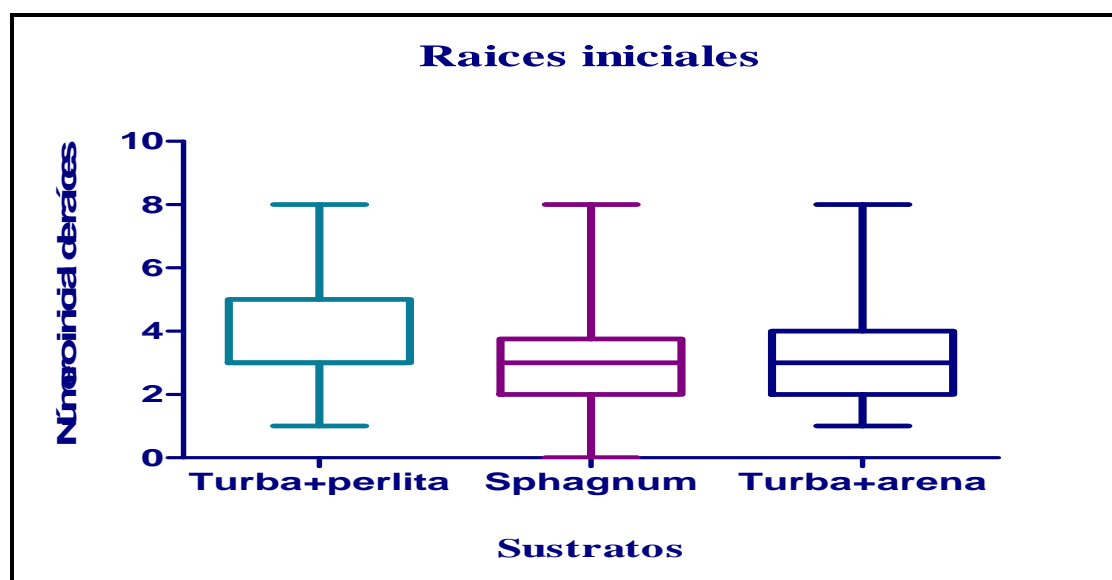


FIGURA 9 Efecto del sustrato sobre la variable no paramétrica número inicial de raíces (Test de Dunn).

4.2.3 Interacción entre tamaño de plántula y sustrato. En los análisis para la variable número de raíces, se puede decir que la mejor interacción se presentó para el sustrato de turba+perlita junto con el mayor tamaño de plántulas, obteniendo los valores más altos entre los nueve tratamientos.

La presencia de raíces luego de la micropropagación, aumenta la posibilidad de éxito en el transplante ya que se crea un favorable balance de agua. Pero esto no quiere

decir que sin dicha presencia no se produzca un transplante exitoso (POSPÍŠILOVÁ *et al*, 1999).

Esto se puede observar en la Figura 10 donde se ve que en los menores tamaños sin importar el tipo de sustrato hay escaso crecimiento radical no significando esto una muerte de las plántulas.

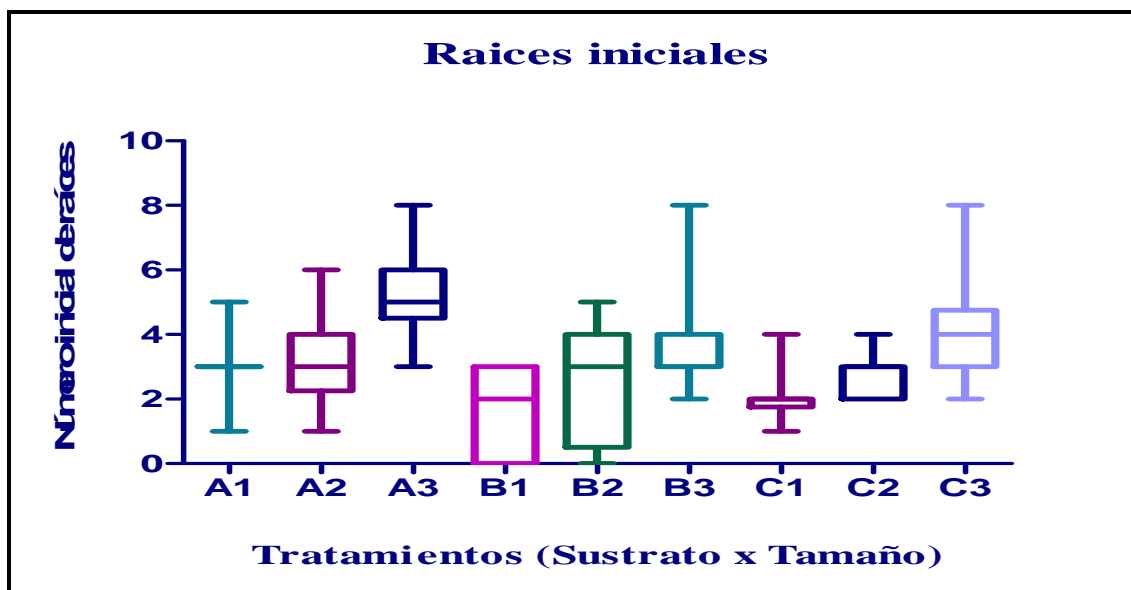


FIGURA 10 Efecto del tamaño y del sustrato sobre la variable no paramétrica raíces iniciales (Test de Dunn).

4.3 Raíces finales

A continuación se presenta la influencia de los diferentes tamaños de plántula y de sustratos, para la variable raíces finales.



FIGURA 11 Desarrollo de raíces y número de hojas después de tres meses de aclimatación.

En la Figura 11 se puede observar el desarrollo radical y foliar que presentaron las plántulas al final del estudio.

4.3.1 Efecto del tamaño de plántula. La influencia del tamaño de plántula, en el número de raíces finales muestra diferencias estadísticas significativas. Al utilizar el mayor tamaño de plántulas (más de 3 cm) se obtuvieron los mejores resultados, donde se desarrollaron 7,6 raíces promedio por plántula. Para las plántulas pequeñas fue inferior, se desarrollaron 3,7 raíces promedio por plántula (Cuadro 2).

Las plántulas de mayor tamaño, presentaron mayor cantidad de raíces iniciales, esta tendencia se mantuvo y las plántulas se desarrollan de mejor manera obteniéndose así el mayor número de raíces finales con el mismo tamaño.

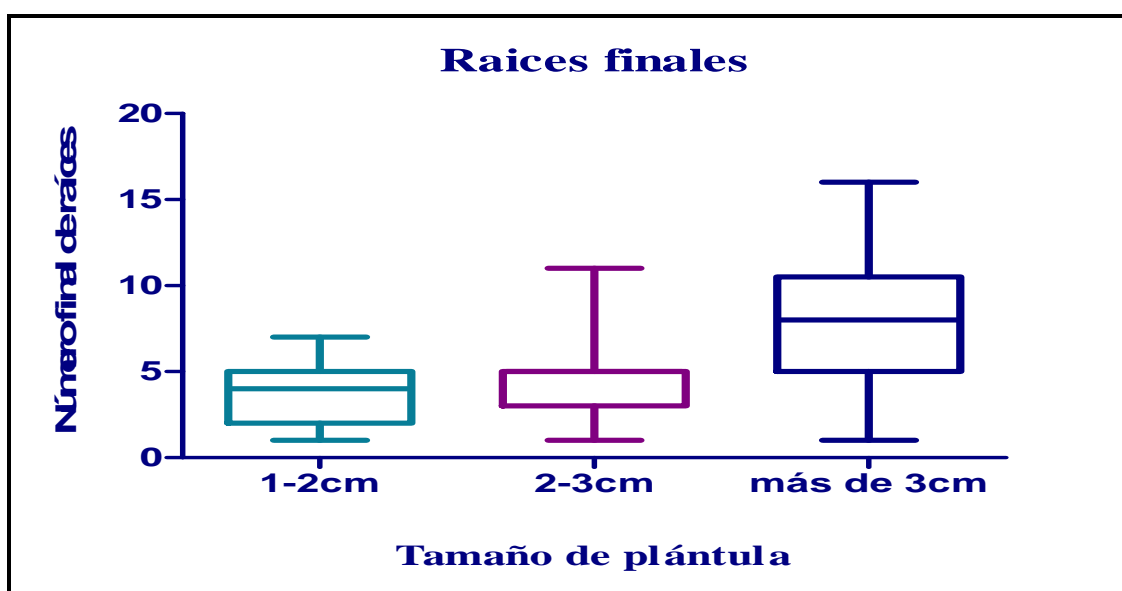


FIGURA 12 Efecto del tamaño de plántula sobre la variable no paramétrica número final de raíces (Test de Dunn).

4.3.2 Efecto del tipo de sustrato. Se analizó el número de raíces finales con respecto a los tres sustratos aplicados. Mediante la Prueba de Kruskal-Wallis (Anexo 8) se determinó que no existen diferencias significativas.

Esto difiere de los resultados obtenidos por DIAZ *et al*, 2004 que encontraron diferencias al utilizar como sustrato humus de lombriz con 47% de materia orgánica en la aclimatación de caña de azúcar. Comparativamente al usar en este estudio, sustrato turba+perlita que posee un 29,8% no existieron diferencias entre los demás sustratos utilizados que contienen menor cantidad de materia orgánica.

El rango de raíces fue bastante homogéneo, aproximadamente cinco raíces por plántula, solo se observa un leve aumento no significativo en el número de raíces para el sustrato turba+perlita.

Una serie de factores del medio ambiente favorecen la rizogénesis, entre ellos la oxigenación del medio. La elección del sustrato responde a la doble necesidad de asegurar a la vez humedad y drenaje.

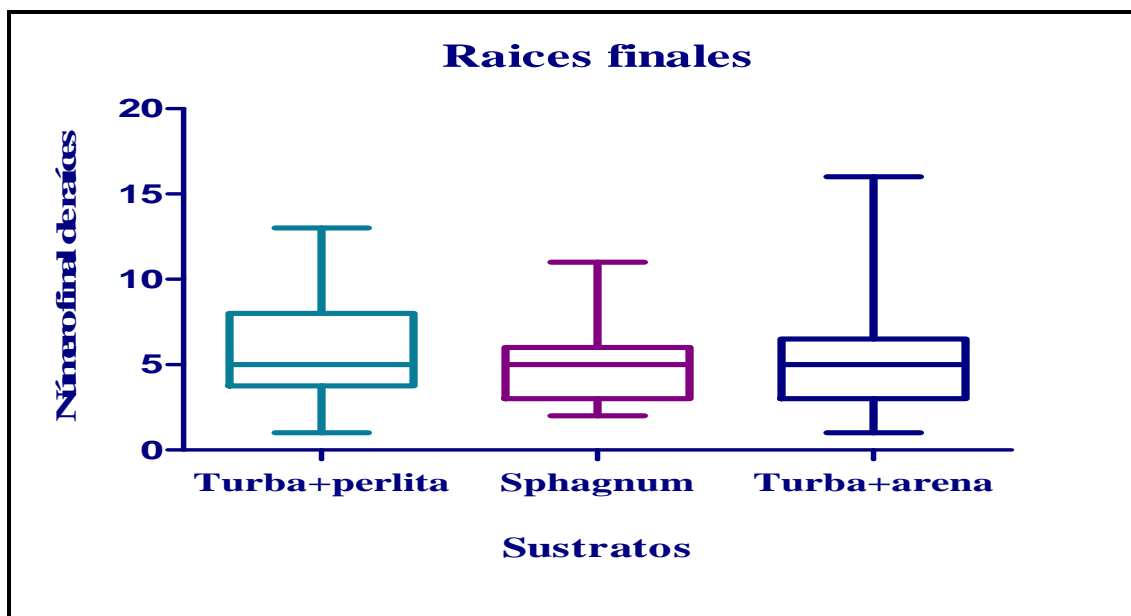


FIGURA 13 Efecto del sustrato sobre la variable no paramétrica número final de raíces (Test de Dunn).

4.3.3 Interacción entre tamaño de plántula y sustrato. Para la interacción entre los dos factores, se observa que la mejor es para el sustrato turba+perlita con el mayor tamaño y no tiene diferencia significativa con el sustrato arena+turba para el mismo tamaño.

En la Figura 14 se observa que las plántulas del sustrato turba+perlita y arena+turba con el mayor tamaño, mantienen la predominancia en el número final de raíces, con un promedio de 9,6 y 7,8 respectivamente. En el sustrato Sphagnum se puede apreciar que el tamaño de plántulas no influye en el número final de raíces.

Para el menor tamaño se observa que el sustrato arena+turba fue donde se obtuvo el menor desarrollo radical.

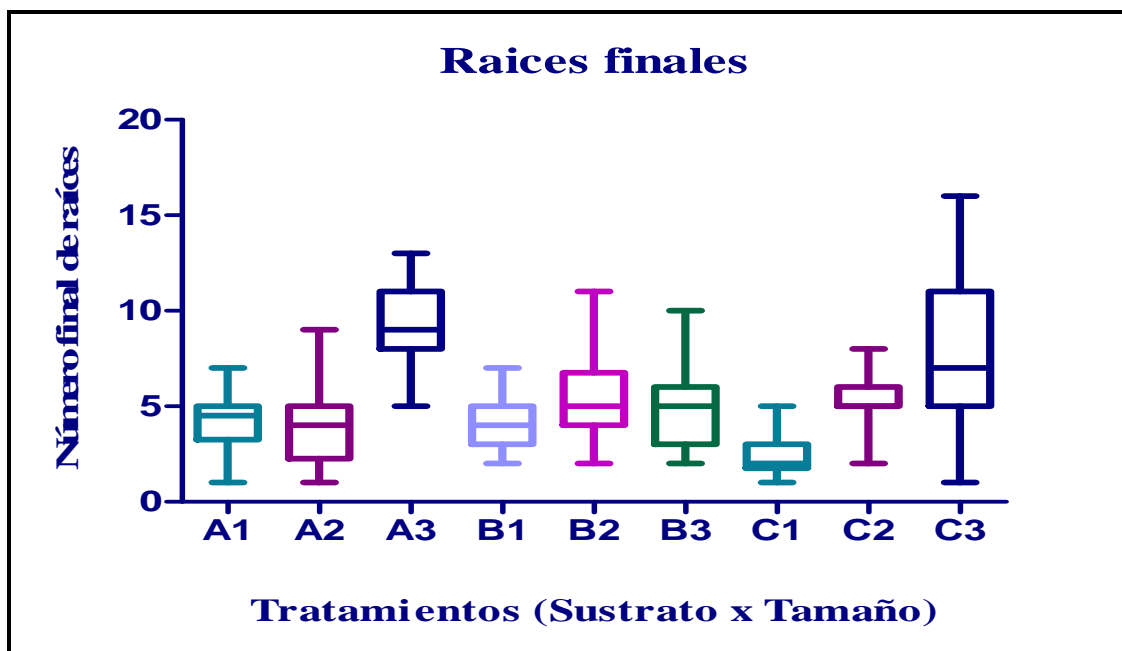


FIGURA 14 Efecto del tamaño y del sustrato sobre la variable no paramétrica raíces finales (Test de Dunn).

4.4 Altura de la planta al término de la aclimatación

A continuación se presenta la influencia de los diferentes tamaños de plántula y de sustratos, para la variable altura de plántulas (Figura 15, a y b).

Se determinó la influencia del sustrato y tamaño en la altura de las plántulas. En el sustrato turba + perlita se obtuvo la mayor altura, 5,2cm, pero no presentó diferencias significativas con el sustrato arena + turba que obtuvo 4,9 cm. El sustrato compuesto de *Sphagnun* presentó diferencias significativas con respecto a los dos otros sustratos obteniendo solo 4,1 cm. (Fig. 15 a).

Al evaluar la altura según el tamaño inicial de la plántula (Fig. 15 b), se obtuvieron las mayores alturas con los tamaños 2 y 3, que corresponden a plántulas de un tamaño mayor de 2cm.

En la Figura 16 se observa que las plántulas del sustrato turba+perlita con el mayor tamaño, mantienen la predominancia en altura final (7,6 cm) lograda por la plántula después de seis meses de crecimiento. Esto no sucede de igual forma con las plántulas del sustrato *Sphagnun* con el menor tamaño, que logran alcanzar la mínima altura final entre los tres sustratos evaluados (2,7 cm), ver Anexo 11.

Es decir que se puede aseverar que existió una influencia de los sustratos y los tamaños en el desarrollo promedio de las plántulas en la fase de aclimatación.

Con un nivel de confianza del 95% podemos afirmar que la altura promedio poblacional obtenida al final de la aclimatación en el sustrato turba+perlita se encuentra entre 4,1 cm y 7,6 cm siendo superior a las obtenidas en los otros dos sustratos (Anexo 11).

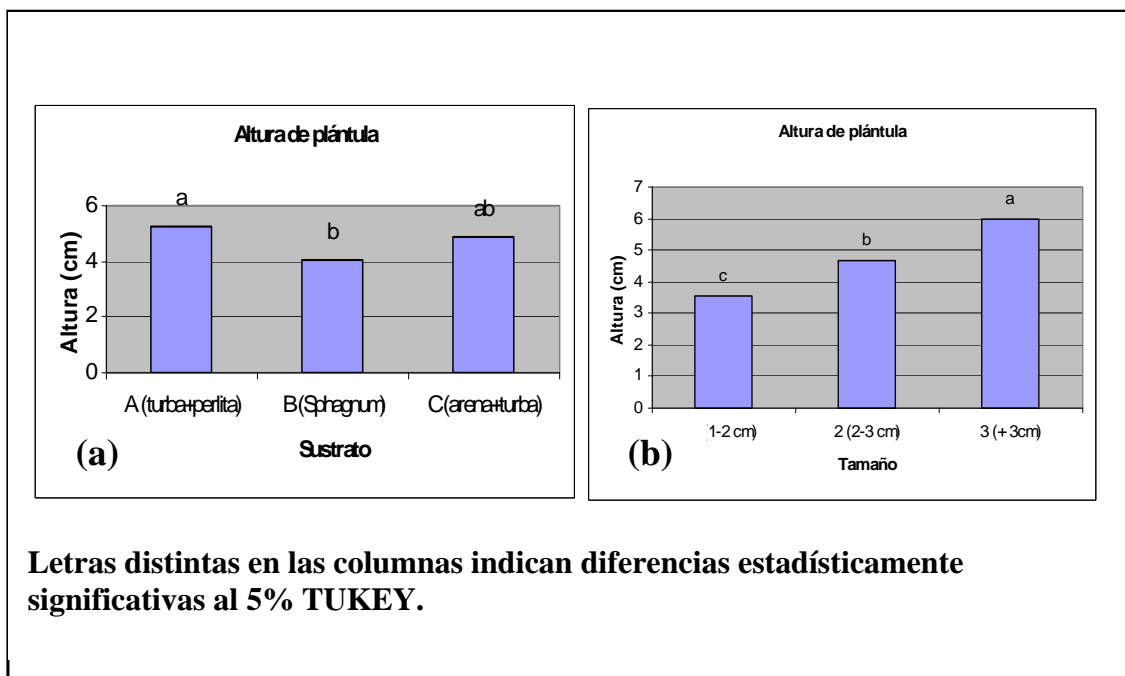
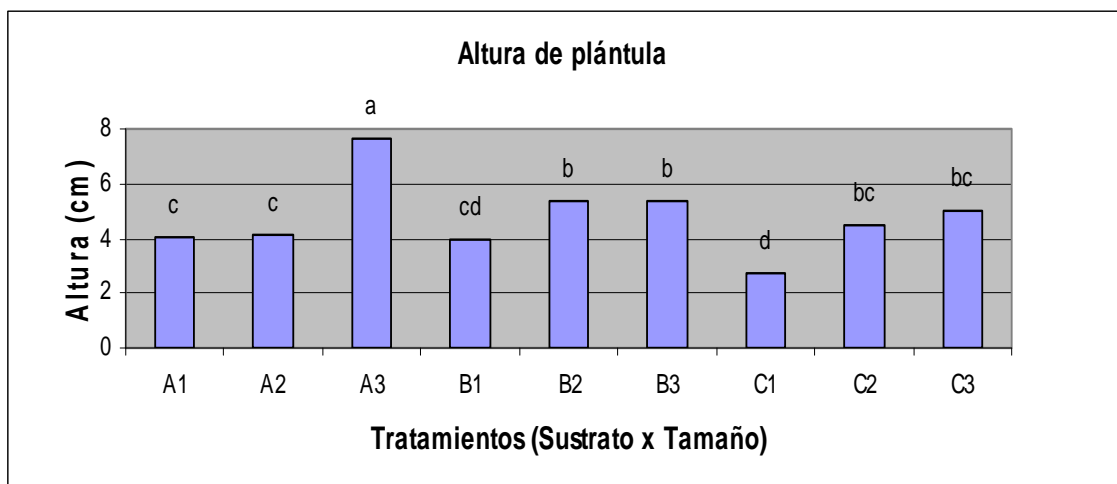


FIGURA 15 Altura final de plántula según sustrato (a) y tamaño (b).



Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas al 5% TUKEY.

FIGURA 16 Análisis de Varianza con un 95% de confianza para la variable paramétrica altura final de plántulas.

4.5 Supervivencia

A continuación se presenta en la Figura 17, la influencia de los factores, tamaños de plántula y sustratos, para la variable supervivencia de plántulas y en la Figura 18, la interacción de ambas variables.

Se determinó la influencia del sustrato y tamaño en la supervivencia de las plántulas. En el sustrato turba + perlita se obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia (93%), pero no presentó diferencias significativas con el sustrato arena + turba que obtuvo un 77% de plántulas vivas. El sustrato compuesto de *Sphagnum* presentó diferencias significativas en la supervivencia con respecto a los dos otros sustratos.

Al evaluar la supervivencia según el tamaño inicial de la plántula, se obtuvieron los mayores porcentajes de supervivencia con los tamaños 2 y 3, que corresponden a plántulas de un tamaño mayor de 2cm. Las plantas producidas en estas condiciones y con estos tamaños pueden resultar de fácil aclimatación tomando en cuenta todos los factores que influyen en su desarrollo. Esto permite indicar que el tamaño de plántula inicial 1 (1-2 cm), no es adecuado para aclimatar esta especie, ya que presentó diferencias significativas y el menor porcentaje de supervivencia. La mortandad de plántulas en esta etapa es un factor de alto riesgo si no se tiene establecido los tamaños y condiciones adecuadas para este proceso de adaptación y el estrés de cambio puede afectar en pocas horas la supervivencia de la planta.

En cuanto a la supervivencia porcentual en la interacción de ambos factores, se repite la misma tendencia anterior, donde los sustratos arena + turba y turba + perlita en los tamaños mediano y grande obtuvieron los mayores porcentajes de supervivencia.

Sotolongo citado por DOMÍNGUEZ y DONAYRE (2006), explica que el éxito de la propagación *in vitro* radica en lograr la aclimatación de las plántulas a las condiciones ambientales. Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico de las plántulas, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales, asimismo, en esta etapa las plántulas sufren un estrés provocado por el cambio en las condiciones de humedad y temperatura, por lo que la transferencia debe realizarse de forma gradual.

En el caso de las plántulas de *Uncaria tomentosa* perteneciente a la familia Rubiaceae (Uña de gato) éstas son incapaces de sobrevivir al trasplante directo al invernadero o campo (DOMINGUEZ y DONAYRE, 2006).

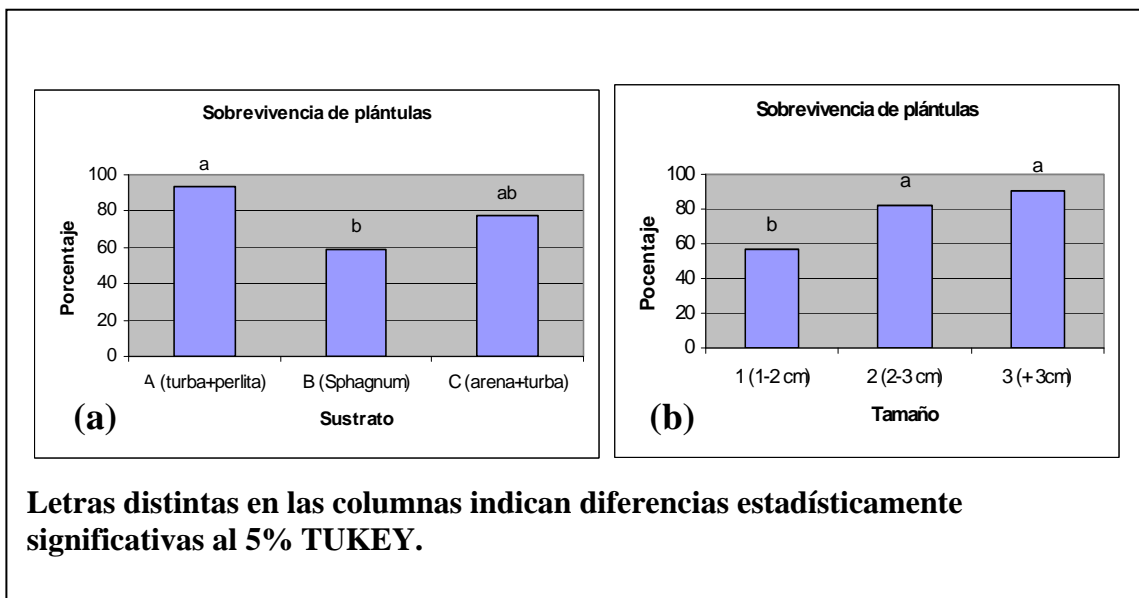
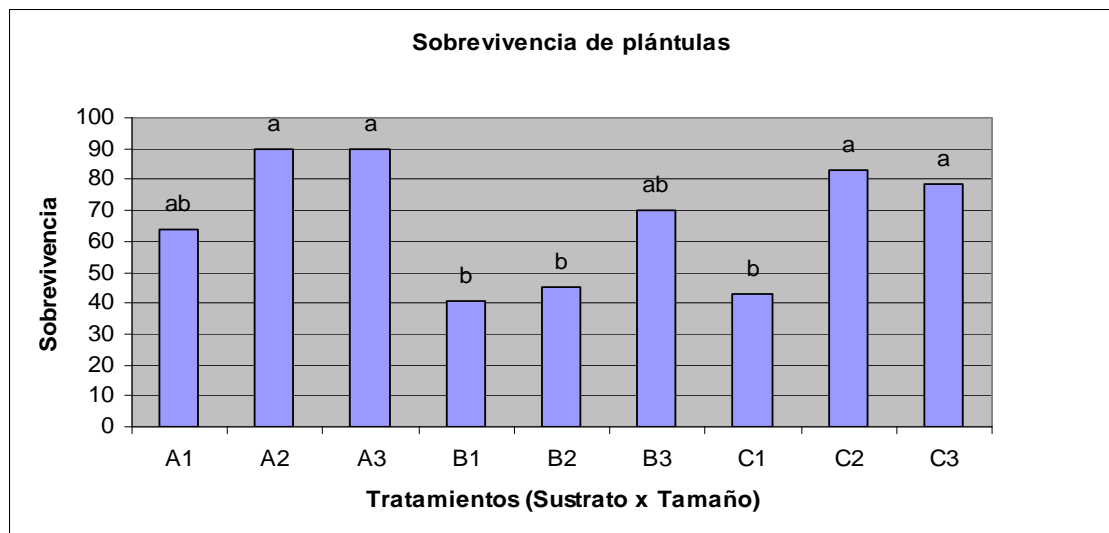


FIGURA 17 Sobrevivencia de plántulas según sustrato (a) y tamaño (b).

En la Figura 18 se observa la interacción entre ambos factores:



Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas al 5% TUKEY.

FIGURA 18 Análisis de Varianza con un 95% de confianza para la variable paramétrica de sobrevivencia.

5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que:

- Se confirma la hipótesis de trabajo, ya que en la aclimatación de plántulas de *Chloraea virescens* (Willd.) Lindl obtenidas *in vitro*, si influyen los tamaños de plántula y los sustratos utilizados.
- El mejor de los tamaños utilizados para aclimatar plántulas de *C. virescens* es de más de tres centímetros y el sustrato más adecuado fue turba+perlita obteniendo en todos los parámetros los mejores resultados, bajo las condiciones del presente ensayo.
- Existen diferentes respuestas de sobrevivencia de plántulas, de acuerdo al material vegetal empleado, especialmente durante la etapa de establecimiento *ex vitro*, donde los porcentajes de sobrevivencia oscilaron entre 27 y 90 %.
- Se logró un incremento en el tamaño de las plántulas, el crecimiento promedio alcanzado en los tres sustratos al final de la aclimatación fue de 4,7cm y el número promedio de hojas (4-7) han sido adecuadas para el desarrollo posterior.

6 BIBLIOGRAFIA

- A.C.O, 1970. Asociación Costarricense de Orquideología. (on line) <http://www.ticorquideas>. (6 junio 2007).
- ARDITTI, J and ERNST, R. 1992. Micropropagation of Orchids. John Wiley and Sons, New York, E.E.U.U 665p.
- BLANCO, A. 2006. Validación y Desarrollo de Protocolos de Multiplicación *in vitro* de *Alstroemeria sp.* y *Lapageria rosea*. Tesis Lic. Agr. Santiago. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. 60 p.
- DEBERGH, P y R.H. ZIMMERMAN, 1991. Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands p.71-93.
- DIAZ, L., MEDINA, L., LATIFE, J., DIGONZELLI, P y SOSA, S. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. Revista de Investigaciones Agropecuarias (INIA, Argentina) 33 (2): 115-128.
- DOMINGUEZ, G Y DONAYRE, M. 2006. Aclimatization of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. produced *in vitro*. Revista Ecología Aplicada 5(1-2):67-74. Lima, Perú.
- DUMOIS, L. 2007. Orquídea. Mexico Connect. (on line). http://www.mexconnect.com/mex_/travel/ldumois/orquidea.html (28 mayo 2007).
- FINCK, A. 1988. Fertilizantes y fertilización. Fundamentos y métodos para la fertilización de cultivos. Reverté. Barcelona, España. 439p.
- GANGAPRASAD, A., LATHA, PG y SEENI, S. 2000. Micropropagation of terrestrial orchids, *Anoectochilus sikkimensis* and *Anoectochilus regalis*. Indian Journal of Experimental Biology 38(2):149-54. ISSN 0019-5189. Original no consultado, CAB abstracts.
- GUTIERREZ, S. y SALGADO, R. 2007. Establecimiento de cultivos *in vitro* y micropropagación de *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Lindl.). Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. México. 58 p.
- HUAPEO, Y. y SALGADO, R. 2004. Establecimiento *in vitro* y regeneración de plantas de *Laelia autumnalis* (Llave y Lex.) Lindl. (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. México. 57 p.

- INFOAGRO, 2007. Tipos de sustratos de cultivo. Infoagro Systems, S.L Madrid, España. (on line) www.infoagro.com (15 octubre 2007)
- JARA, G. y SEEMANN, P. 2007. Manual de procedimientos, uso de equipos e Instrumentos de Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. 60 p.
- LECOUFLE, M. y ROSE, H. 1956. Orquidéas. La Maison Rustique. Paris. France. 167p.
- McKENDRICK, S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Scotland, United Kingdom. 17p.
- NOVOA, P.; ESPEJO, J.; CISTERNAS, M.; RUBIO, M. y DOMINGUEZ, E. 2006. Guía de Campo de las Orquídeas Chilenas. Ed. Corporación Chilena de la Madera. Concepción, Chile 120p.
- ORQUIDEAS, 2007. Orquídeas.cl. Información sobre orquídeas. (on line) www.orquideas.cl (5 de mayo 2007).
- OSPINA, M y DRESSLER, R. 1979. Orquídeas de las Américas. Litografía Arco, Bogota, Colombia. 495p.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLEČEK, P.; HAISEL, D.; y PLZÁKOVÁ, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481-497.
- RÄNNBÄCK, M. 2007. Propagation, cultivation, and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium spp.* Sveriges Lantbruks Universitet. 50p.
- ROLLKE, L. 2005. Orquídeas, coloridas, exóticas, impactantes. Albatros. Buenos Aires, Argentina. 63p.
- SCADE, A.; BRUNDRETT, M.; BATTY, A.; DIXON, K. y SIVASITHAMPARAM, K. 2006. Survival of transplanted terrestrial orchid seedlings in urban bushland habitats with high or low weed cover. *Australian Journal of Botany* 54(4):383–389.
- SEELYE, J., BURGE, G., y MORGAN, E. 2003. Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society* 53 : 85-90.
- SHEEHAN, T. 1980. Orchids. In: Larson, R (Ed). *Introduction to Floriculture*. Academic Press. New York, United State of America. p.135-164.
- TADEU DE FARIA, R.; SANTIAGO, C.; PANAYOTES, D.; BRIGATTO, U. y ARAUJO, R. 2002. Preservation of de brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2 (3): 489-492.

- VAASA, A y ROSENBERG, V. 2004. Preservation of the rare terrestrial orchids *in vitro*. *Acta Universitatis Latviensis, Biology* 676: 243–246.
- VILCHEZ, J.; RAMIREZ, E.; VILLASMIL, M.; ALBANY, N.; LEON de SIERRALTA, S y MOLINA, M. 2007. Aclimatación de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f): efectos del sustrato. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia. República Bolivariana de Venezuela. 5p.
- WHIGHAM, D.; O'NEILL, J.; RASMUSSEN, H.; CALDWELL, B. y McCORMICK, M. 2005. Seed longevity in terrestrial orchids – Potential for persistent *in situ* seed banks. *Biological conservation* 129 (1): 24-30. ISSN 0006-3207. Original no consultado, CAB abstracts.

7 ANEXOS

ANEXO 1 Composición del medio basal MURASHIGE y SKOOG (1962) y suplementos orgánicos.

Nutrientes	(mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ * 2H ₂ O	440
MgSO ₄ * 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	37.25
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27.85
MnSO ₄ * H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.025
Vitaminas	
Tiamina	0.4
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina HCL	0.5
Glicina	2
Myo-inositol	100
Sacarosa	20000
Gelrite	3500

FUENTE: JARA, G. y SEEMANN, P. 2007.

ANEXO 2 Análisis químico de los sustratos ocupados en el estudio.

	Turba+perlita	Arena+Turba	Sphagnum	Turba+suelo trumao
pH en agua (1:2,5)	5,9	5,9	4,2	5,4
pH CaCl ₂ 0,01M	5,4	5,4	-	5
Materia orgánica (%)	29,8	13,6	-	21,7
N- mineral (N-NO ₃ +NH ₄) (mg/kg)	308	19,6	-	126
Fósforo Olsen (mg/kg)	194	44,6	53,8	17
Potasio intercambiable (mg/kg)	673	266	661	391
Sodio intercambiable (cmol+/kg)	0,55	0,10	4,45	0,42
Calcio intercambiable (cmol+/kg)	16,35	8,47	9,02	6,15
Magnesio intercambiable (cmol+/kg)	8,98	3,25	7,96	4,57
Suma de bases (cmol+/kg)	27,60	12,5	23,12	12,14
Aluminio intercambiable (cmol+/kg)	0,03	0,08	0,25	0,09
CICE (cmol+/kg)	27,63	12,58	23,38	12,23
Saturación de Al (%)	0,1	0,65	1,1	0,7
Azufre disponible (mg/kg)	259,2	55,2	57,3	51,9
Zinc disponible (mg/kg)	4,56	1,75	83,5	1,09
Fierro disponible (mg/kg)	183,2	-	-	-
Cobre disponible (mg/kg)	11,7	-	-	-
Manganeso disponible (mg/kg)	15,1	-	-	-
Boro disponible (mg/kg)	-	1,14	5,07	0,86

FUENTE: INSTITUTO DE INGENIERIA AGRARIA Y SUELOS, UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE (11 DE DICIEMBRE 2007)

ANEXO 3 Registro de temperaturas mínimas, máximas y promedios durante el estudio, en sala de aclimatación y en invernadero.

Promedio mensual en sala de aclimatación	T° mínima	T° máxima	T° promedio
Septiembre	20	24	22
Octubre	21	23	22
Noviembre	21	24	23

Promedio mensual en invernadero	T° mínima	T° máxima	T° promedio
Diciembre	11	29	20
Enero	14	37	26
Febrero	14	39	27
Marzo	12	35	24

ANEXO 4 Test no-paramétrico de Kruskal Wallis para la variable hojas finales.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Sustrato	6,55*	0,004*
Tamaño	30,11*	0,000*
Sustrato x Tamaño	58,11*	0,000*

* significa que hay diferencias significativas al 95%

ANEXO 5 Tabla de medias para la variable no paramétrica hojas finales.

Nivel	Frecuencia	Media	Error estándar	Limite inferior	Limite superior
Sustrato					
A (turba+perlita)	66	5,3	0,2	5,0	5,6
C (arena+turba)	40	4,6	0,2	4,2	5,0
B (Sphagnum)	53	4,3	0,2	3,9	4,6
Tamaño					
1 (1-2 cm)	51	3,6	0,2	3,3	4,0
2 (2-3 cm)	59	4,7	0,2	4,4	5,0
3 (+ 3cm)	49	6,1	0,2	5,8	6,5
Sustrato según tamaño					
A1	24	4,3	0,3	3,9	4,7
A2	24	4,6	0,3	4,1	5,0
A3	18	7,6	0,3	7,1	8,1
B1	13	3,3	0,4	2,7	3,8
B2	12	5,1	0,4	4,5	5,7
B3	15	5,4	0,3	4,8	5,9
C1	14	2,9	0,4	2,3	3,4
C2	23	4,5	0,3	4,1	5,0
C3	16	5,2	0,3	4,7	5,7

ANEXO 6 Test no-paramétrico de Kruskal Wallis para la variable raíces iniciales.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Sustrato	9,93*	0,007*
Tamaño	43,38*	0,000*
Sustrato x Tamaño	60,76*	0,000*

* significa que hay diferencias significativas al 95%

ANEXO 7 Tabla de medias para la variable no-paramétrica raíces iniciales.

Nivel	Frecuencia	Media	Error estándar	Limite inferior	Limite superior
Sustrato					
A (turba+perlita)	66	3,6	0,1	3,3	3,9
C (arena+turba)	40	2,7	0,2	2,4	3,0
B (Sphagnum)	53	2,9	0,2	2,6	3,2
Tamaño					
1 (1-2 cm)	51	2,4	0,1	2,1	2,6
2 (2-3 cm)	59	2,9	0,1	2,6	3,1
3 (+ 3cm)	49	4,3	0,1	4,1	4,6
Sustrato según tamaño					
A1	24	3,0	0,2	2,6	3,3
A2	24	3,2	0,2	2,8	3,5
A3	18	5,1	0,2	4,7	5,5
B1	13	1,7	0,3	1,2	2,2
B2	12	2,6	0,3	2,1	3,1
B3	15	3,6	0,3	3,2	4,1
C1	14	2,0	0,3	1,5	2,4
C2	23	2,7	2,5	2,3	3,0
C3	16	4,1	0,3	3,7	4,6

ANEXO 8 Test no-paramétrico de Kruskal Wallis para la variable raíces finales.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Sustrato	0,78	0,68
Tamaño	43,10*	0,000*
Sustrato x Tamaño	71,33*	0,000*

* significa que hay diferencias significativas al 95%

ANEXO 9 Tabla de medias para la variable no-paramétrica raíces finales.

Nivel	Frecuencia	Media	Error estándar	Limite inferior	Limite superior
Sustrato					
A (turba+perlita)	66	5,6	0,3	5,1	6,0
C (arena+turba)	40	4,9	0,4	4,2	5,5
B (Sphagnum)	53	5,1	0,3	4,6	5,6
Tamaño					
1 (1-2 cm)	51	3,7	0,3	3,2	4,2
2 (2-3 cm)	59	4,6	0,3	4,2	5,0
3 (+ 3cm)	49	7,6	0,3	7,1	8,1
Sustrato según tamaño					
A1	24	4,3	0,4	3,7	4,9
A2	24	3,9	0,4	3,3	4,5
A3	18	9,5	0,4	8,8	10,2
B1	13	4,2	0,5	3,4	5,0
B2	12	5,3	0,5	4,5	6,1
B3	15	5,1	0,5	4,3	5,8
C1	14	2,2	0,5	1,5	3,0
C2	23	5,0	0,4	4,4	5,6
C3	16	7,8	0,5	7,0	8,5

ANEXO 10 Análisis de varianza del parámetro altura de plántula en aclimatación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coefficiente F	Valor P
A=Sustrato	41,43	2	20,71	7,96	0,0005**
B=Tamaño	139,80	2	69,90	26,86	0,000**
Interacciones AB	67,79	4	16,95	6,51	0,0001**
Residuos	390,37	150	2,60		
Total	635,34	158			

** indican diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 11 Tabla de medias para la variable paramétrica altura.

Nivel	Frecuencia	Media	Error estándar	Limite inferior	Limite superior
Media total	159	4,7			
Sustrato					
A (turba+perlita)	66	5,2	0,2	4,7	5,8
C (arena+turba)	40	4,9	0,3	4,1	5,5
B (Sphagnum)	53	4,1	0,2	3,4	4,7
Tamaño					
1 (1-2 cm)	51	3,6	0,2	2,9	4,2
2 (2-3 cm)	59	4,7	0,2	4,1	5,2
3 (+ 3cm)	49	5,9	0,2	5,3	6,6
Sustrato según tamaño					
A1	24	4,1	0,3	3,2	4,9
A2	24	4,1	0,3	3,2	5,0
A3	18	7,6	0,3	6,6	8,6
B1	13	3,9	0,4	2,7	5,1
B2	12	5,3	0,5	4,1	6,5
B3	15	5,3	0,4	4,2	6,4
C1	14	2,7	0,4	1,5	3,8
C2	23	4,5	0,3	3,6	5,4
C3	16	5,0	0,4	3,9	6,1

ANEXO 12 Análisis de varianza para el parámetro sobrevivencia de plántulas en el período de aclimatación.




** indican diferencias significativas al 95% de confianza.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coefficiente F	Valor P
A=Sustrato	3879	2	1939	11,75	0,0005*
B=Tamaño	4567	2	2284	13,84	0,0002*
Interacciones AB	1233	4	308	1,87	0,16*
Residuos	2971	16	165		
Total	12650	26			






ANEXO 13 Tabla de medias para la variable paramétrica sobrevivencia.





Nivel	Frecuencia	Media	Error estándar	Limite inferior	Limite superior
Media total	27	67,1			
Sustrato					
A (turba+perlita)	9	93,3	4,2	72,3	90,3
C (arena+turba)	9	77,2	4,2	43	60,9
B (Sphagnum)	9	59	4,2	59,1	77,1
Tamaño					
1 (1-2 cm)	9	56,7	4,2	40,1	58,1
2 (2-3 cm)	9	82,1	4,2	63,7	81,7
3 (+ 3cm)	9	90,8	4,2	70,5	88,5
Sustrato según tamaño					
A1	3	63,9	7,4	48,3	79,5
A2	3	90	7,4	74,4	105,5
A3	3	90	7,4	74,4	105,5
B1	3	40,7	7,4	25,2	56,3
B2	3	45	7,4	29,4	60,6
B3	3	70,2	7,4	54,6	85,7
C1	3	42,7	7,4	27,2	58,3
C2	3	83,2	7,4	67,6	98,8
C3	3	78,3	7,4	62,7	93,8

ANEXO 14 Cuadro descriptivo del género *Chloraea*.





<p><i>Chloraea alpina</i> Poepp.</p> 	<p>Planta perenne. Su ubicación geográfica es desde la Región Metropolitana hasta la XI Región. Su floración es desde octubre a diciembre.</p>
<p><i>Chloraea barbata</i> Lindl.</p> 	<p>Planta perenne. Su ubicación geográfica es en las provincias centrales de Chile, desde Valparaíso hasta Nahuelbuta. Su floración es desde septiembre a noviembre.</p>
<p><i>Chloraea bidentata</i> (Poepp. et Endl.) Correa.</p> 	<p>Planta perenne. Su ubicación geográfica es en la precordillera entre Chillán y Malleco. Florece en verano.</p>
<p><i>Chloraea bletioides</i> Lindl.</p> 	<p>Planta perenne. Su ubicación geográfica es desde Los Vilos hasta Concepción. Su floración es desde septiembre a diciembre.</p>



<p><i>Chloraea cuneata</i> Lindl.</p> 	<p>Su distribución geográfica es en algunos sectores de la Cordillera de Nahuelbuta. Su floración es desde noviembre a diciembre.</p>
<p><i>Chloraea chica</i> Speg. et Kraenzlin.</p> 	<p>Planta perenne. Vive en Chile desde la IV hasta la XII Región. Florece entre noviembre y enero.</p>
<p><i>Chloraea chrysantha</i> Poepp.</p> 	<p>Vive entre Valparaíso y Talca. Su floración es entre septiembre y noviembre.</p>
<p><i>Chloraea crispa</i> Lindl.</p> 	<p>Planta perenne. Se ubica desde Concepción a Valdivia, preferentemente en la VIII Región en sitios arenosos tanto en valle como en la costa. Su floración es desde octubre hasta enero.</p>

<p><i>Chloraea cristata</i> Lindl.</p> 	<p>Existe desde el sur de Los Vilos hasta Concepción. Su floración es desde octubre a noviembre.</p>
<p><i>Chloraea cylindrostachya</i> Poepp.</p> 	<p>Planta perenne. Se encuentra entre la V y X región. Su floración es desde diciembre a enero.</p>
<p><i>Chloraea disoides</i> Lindl.</p> 	<p>Planta perenne. Se encuentra solamente en algunos cerros del litoral chileno. Su floración es desde agosto hasta septiembre. Su estado de conservación es vulnerable.</p>
<p><i>Chloraea galeata</i> Lindl.</p> 	<p>Planta perenne. Crece desde Ovalle hasta Concepción y su floración es desde agosto a septiembre.</p>
<p><i>Chloraea gaudichaudii</i> Brongn.</p> 	<p>Planta perenne. Vive desde las VIII hasta la XII Región y su floración es desde diciembre a enero.</p>

<p><i>Chloraea gaviu</i> Lindl.</p> 	<p>Su ubicación geográfica es desde la V hasta la X Región. Florece en primavera.</p>
<p><i>Chloraea grandiflora</i> Poepp.</p> 	<p>Planta perenne. Crece desde la V hasta la IX Región. Florece entre diciembre y enero.</p>
<p><i>Chloraea heteroglossa</i> Rchb.</p> 	<p>Planta pequeña perenne. Especie al parecer endémica de la zona de Valparaíso, sin embargo últimos estudios indican que podría encontrarse en Nancagua (VI Región). Florece entre noviembre y diciembre. Su estado de conservación es vulnerable.</p>
<p><i>Chloraea incisa</i> Poepp.</p> 	<p>Planta perenne. Su ubicación va desde Valparaíso hasta Valdivia. Florece desde diciembre a enero.</p>
<p><i>Chloraea lamellata</i> Lindl.</p> 	<p>Existe desde San Fernando hasta Valdivia. Florece desde septiembre a noviembre.</p>

<p><i>Chloraea lechleri</i> Lindl.</p> 	<p>Ubicación geográfica desde Concepción a Valdivia. Su floración es desde noviembre a enero. Su origen es nativo.</p>
<p><i>Chloraea leptopetala</i> Reiche.</p> 	<p>Planta perenne. Crece en los faldeos del Volcán Antuco y en la Cordillera de la Araucanía. Aparentemente se encontraría en los alrededores del Parque Nacional Torres del Paine. Florece de diciembre a enero.</p>
<p><i>Chloraea longipetala</i> Lindl.</p> 	<p>Planta perenne. Desde la VIII hasta la X Región. (Llanquihue). Florece en verano.</p>
<p><i>Chloraea magellanica</i> Hook.</p> 	<p>Planta perenne. Crece desde la VII hasta la XII Región. Florece desde diciembre hasta febrero.</p>
<p><i>Chloraea multiflora</i> Lindl.</p> 	<p>Su ubicación es desde Valparaíso hasta Cautín. Su floración es desde agosto hasta octubre.</p>

<p><i>Chloraea nudilabia</i> Poepp.</p> 	<p>Planta perenne. Crece desde la VII hasta la X (Lanco) Región. Florece entre diciembre y enero.</p>
<p><i>Chloraea philippii</i> Reichb.</p> 	<p>Hierba perenne. Se ubica desde Concepción a Valdivia. Su floración es de noviembre a diciembre. Es una orquídea nativa.</p>
<p><i>Chloraea disioides</i> var. <i>picta</i> (Kranzl) Correa.</p> 	<p>Se encuentra en la Precordillera y Cordillera de los Andes. Florece en noviembre. Su origen es nativo.</p>
<p><i>Chloraea prodigiosa</i> Reichb.</p> 	<p>Planta perenne. Crece desde La Rufina-San Fernando hasta Chiloé- isla Chonos. Su floración es desde septiembre a noviembre y es endémica.</p>

<p><i>Chloraea speciosa</i> Poepp.</p> 	<p>Se encuentra en la Cordillera de Antuco y Lonquimay. Florece de septiembre a noviembre. Es endémica.</p>
<p><i>Chloraea virescens</i> Lindl.</p> 	<p>La distribución geográfica de esta especie es desde la V (Viña del Mar) hasta la XI Región (Aysén). Es común en terrenos arenosos, pedregosos, terraplenes y en los bosques. Vive en las provincias centrales de Chile.</p>
<p><i>Chloraea viridiflora</i> Poepp.</p> 	<p>Planta perenne. Se ubica en la Cordillera de la VIII Región. Florece desde diciembre a febrero.</p>
<p><i>Chloraea volkmanni</i> Phil. ex Kranzl.</p> 	<p>Planta perenne. Su distribución es restringida desde la VII hasta la IX Región. Florece desde diciembre a enero. Es endémica y su estado de conservación es muy poco conocido (NOVOA, et al, 2006).</p>