

MANUAL DE OPERACIÓN DE LA COLECCIÓN *in vitro*





Presentación Y Agradecimientos

El presente “Manual De Operación De La Colección *in vitro*”, fue elaborado con el apoyo de la Coordinación Nacional De Las Fundaciones Produce A.C. COFUPRO, el Sistema Nacional De Recursos Fitogeneticos SINAREFI, la Universidad Veracruzana a través del Orquidario Universitario U.V. y el apoyo de la Universidad De Guanajuato todo esto bajo la coordinación de la Dra. Rebeca A. Menchaca-García.

Índice

Introducción	3		
MECANISMOS DE POLINIZACIÓN...	5	PROCESOS DE SIEMBRA DE SEMILLAS	28
ORQUIDARIO U.V.	8	Proceso De Siembra De Cápsula Cerrada.....	29
Área De Preparación De Medios De Cultivo	10	Proceso De Siembra De Cápsula Cerrada.....	31
Área De Lavado	11	SUBCULTIVO	34
Área De Siembra	12	Proceso De Subcultivo.....	35
Área De Incubación	13	Rotulación	36
Invernadero O Sombreadero	14	Cuarto De Incubación	37
RECEPCIÓN DE CÁPSULAS	15	ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS <i>in vitro</i>	38
Almacenamiento de Cápsulas Cerradas	18	Sustratos.....	39
Almacenamiento de Cápsulas Abiertas	19	Aclimatación	41
CULTIVO <i>in vitro</i>	20	VINCULACIÓN	43
Medio MS	22		
Preparación	23	Bibliografía	xivi
Suplementos	24	Anexo	48
ESTERILIZACIÓN	26		
Pasos De Esterilización	27		



Introducción

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 20,000 y 30,000 especies conocidas a nivel mundial (CITES, 2002; Dixon, 2003; Hágsater et al., 2005), México cuenta con una gran diversidad y se han registrado en el país cerca de 1,260 especies y 170 géneros (Hágsater et al., 2005), de las cuales 444 especies son endémicas (Soto-Arenas, 1996). Los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas, albergan la mayor riqueza de orquídeas en México (Téllez, 2011).

A pesar de que México posee una gran riqueza en orquideoflora la mayor parte de las poblaciones de orquídeas se han visto seriamente afectadas, principalmente por la extracción masiva e ilegal de la que ha sido objeto, por el interés comercial, en la cual las plantas y las flores de corte se coti-

zan en precios elevados (Ávila y Salgado-Garciglia, 2006; Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007).

Aunado a esta problemática la destrucción de sus hábitats naturales va en aumento, empleado por áreas agropecuarias, forestales y de asentamientos humanos (Castro, 2008; CONABIO, 2010). Además, las poblaciones están declinando por el bajo o escaso reclutamiento de nuevos individuos por lo que muchas especies se encuentran en riesgo de desaparecer, colocando a 186 especies en alguna categoría de riesgo en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SE-MARNAT, 2010).

De aquí la importancia de desarrollar técnicas de conservación *ex situ* específicas para la propagación y conservación de las especies nativas de México, y aprovechar de



Fig. 1.- Cápsula en proceso de cultivo *in vitro* de *Stanhopea oculata*.

manera sustentable el potencial genético de las plantas silvestres de México.

Una alternativa es la técnica de micropropagación o cultivo *in vitro*, utilizada para la conservación y la propagación masiva, del cual se obtienen plantas libres de patógenos y enfermedades, además de obtener una propagación masiva en cortos periodos (Hurtado y Merino, 1987). Por lo tanto, el cultivo *in vitro* representa una herramienta importante para la comercialización de orquídeas reduciendo la presión sobre las poblaciones silvestres.

Las técnicas de cultivo *in vitro* también contribuye a mejorar los porcentajes de germinación, en comparación con la casi escasa germinación en condiciones naturales, conservando la mayor diversidad genética, por lo que es importante para programas de reintroducción de especies nativas en áreas de preservación ecológica (Stewart y Kane, 2006).

Es importante impulsar la propagación mediante la micropropagación de especies amenazadas, endémicas o en peligro de extinción, para cubrir las demandas internas y externas, ya que en conjunto con el desarrollo de invernaderos, puede ser una actividad económicamente importante.

A través del apoyo a productores, las orquídeas como plantas madres pueden ser utilizadas para la micropropagación y aprovechadas en viveros autorizados que cuenten con una tasa de aprovechamiento bajo el esquema de Unidades de Manejo Ambiental (UMA) (Menchaca y Moreno, 2010).

El presente manual de operación muestra los procesos de micropropagación de orquídeas que van desde la polinización de la flor hasta la aclimatación de las plántulas generadas *in vitro* y entrega a productores.

**Fig. 2.-
Cultivo de
*Prosthechea
vitellina*.**



1

Mecanismos De Polinización

Fig. 3.- Abeja del género *Euglossa* polinizando una *Gongora galeata*



La polinización es el proceso de transferencia del polen que se encuentra en la antera de una flor al estigma de la misma (autopolinización) o al estigma de otra (polinización cruzada) Fig. 4.

- **Autopolinización**

Intercambio de polen en la misma flor ya que el estambre y el estigma están en contacto, esto puede acarrear cierta ventaja como la de subsistir en un medio más o menos estable teniendo como desventaja la de perder variabilidad genética y por ende mayor facilidad de extinción.

- **Polinización cruzada**

Intercambio de polen en flores de plantas distintas debido a barreras genéticas o fisiológicas las cuales impiden este intercambio en la misma flor, con la polinización cruzada se da entonces el intercambio de material genético durante el cual se producen nuevas combinaciones genéticas mismas que aseguran la variabilidad de la especie y en consecuencia la posibilidad de sobrevivir a los cambios ambientales.

Las flores presentan una serie de atributos que se relacionan con la atracción y guía del polinizador, lo que se conoce como síndromes de polinización. Dichos mecanismos pueden involucrar el ofrecimiento de una recompensa ya sea real o ficticia. Así mismo otras especies cuentan con diferentes polinizadores como por ejemplo, ratones, murciélagos dípteros, mariposas, polillas y abejas principalmente de la tribu *Euglossini* “con lengua verdadera” (Figura 2) (Principalmente de los géneros *Euglossa*, *Eufriesea* y *Eulaema*).

**Fig. 4.-
Polinización y
desarrollo de
la cápsula.**





**Fig. 5.-
Polinización
natural.**

Los machos de estas abejas solitarias son los que ocasionalmente son atraídos por los compuestos aromáticos de las flores de *Gongora*, *Stanhopea* y *Mormodes* por citar algunos, despiden, lo que les sirve para atraer a las hembras y reproducirse.

Durante este proceso transfieren las polinias de una antera al estigma de otra flor de la misma especie quedando fecundado el ovario y posteriormente se da la formación del tubo polínico, lo que conlleva al engrosamiento y crecimiento del fruto o cápsula que después de cierto tiempo, dependiendo del género, madurará y las semillas serán esparcidas por el viento o por cualquier otro agente dispersor.

Cuando ha pasado el tiempo de maduración del fruto comienza el proceso de dehiscencia o abertura y con ayuda del viento, principalmente, las semillas se esparcirán hasta que lleguen al lugar en donde se encuentran las micorrizas y germinarán. En este caso la germinación de las semillas se llevará a cabo mediante técnicas de propagación *in vitro* en condiciones de laboratorio controladas.

**Fig. 6.-
Proceso de
maduración
y dispersión
de semillas.**



2

Orquidario U.V.

Fig. 8.- Instalaciones
del Orquidario U.V.





Fig. 9.- Cuarto de incubación del Orquidario U.V.

De acuerdo a la demanda de los productores de orquídeas por plántulas para producción, el Orquidario U.V perteneciente al Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO), realiza la micropropagación por medio de la siembra de semillas en un medio nutritivo, para obtener un porcentaje alto de germinación y apoyarlos con la entrega de plántulas. Así como también se realizan estudios de conservación en la realización de protocolos de cultivo *in vitro* de especies de la familia Orchidaceae y atreves del mantenimiento del banco de germoplasma, el cual conserva y resguarda 5 especies mexicanas del genero *Vanilla* (*Vanilla planifolia*, *V. pompona*, *V. insignis*, *V. inodora*, y *V. odorata*) y 2 híbridos (*V. planifolia* X *pompona* y *V. planifolia* X *insignis*), estos 2 últimos realizados para estudios de mejoramiento genético.

El Orquidario U.V se mantiene una infraestructura de laboratorio que facilite el proceso de micropropagación manteniendo condiciones de asepsia, para disminuir la contaminación de microorganismos como bacterias u hongos en el proceso de cultivo *in vitro*.

Área De Preparación De Medios De Cultivo

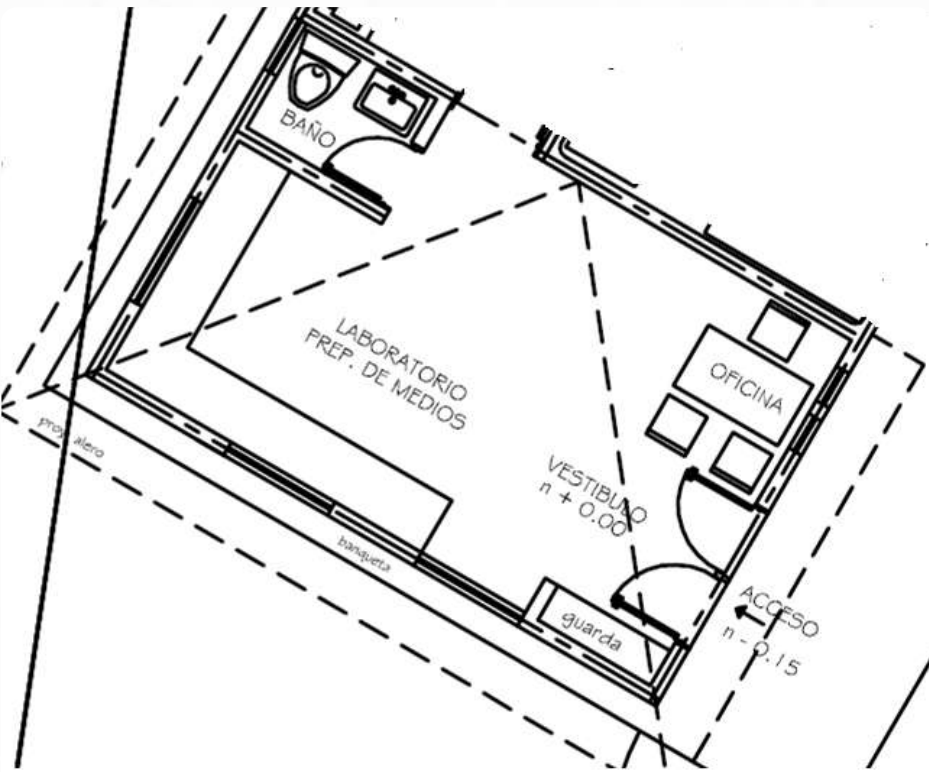


Fig. 10.- Área de preparación de medios de cultivo

Izquierda.- plano arquitectónico

Derecha.- fotografía

Preparación de medios de cultivo, que serán utilizados en el transcurso de la siembra y subcultivo del material vegetativo. Esta área cuenta con gabinetes, para el almacenamiento de reactivos, cristalería y frascos, potenciómetros, balanza analíticas, parrillas de agitación y calentamiento, agitadores magnéticos y barras de agitación magnética.

Área De Lavado

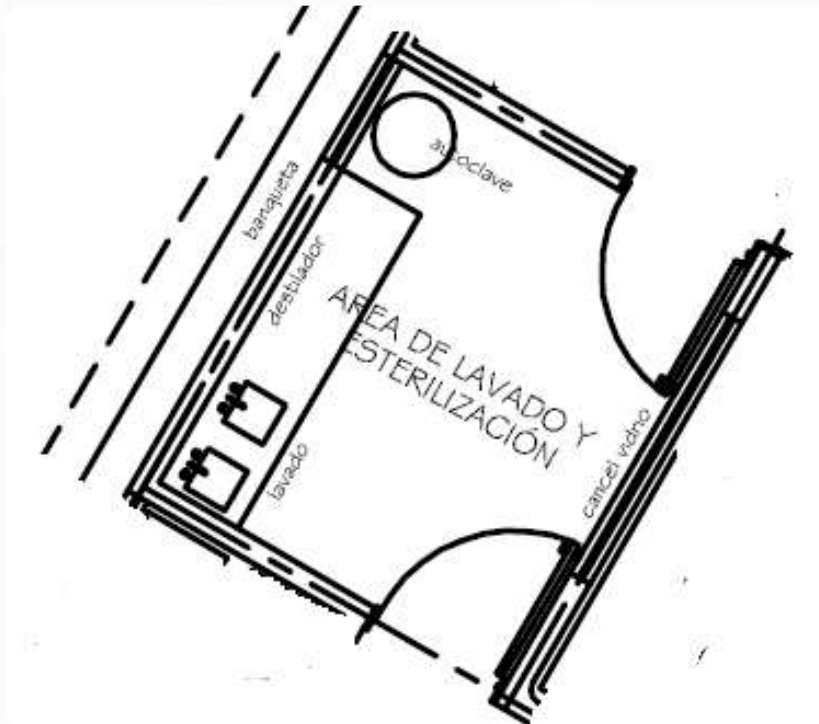


Fig. 11.- Área de lavado

Izquierda.- plano arquitectónico

Derecha.- fotografía

En esta área se realiza el lavado de frascos, material de cristalería, el primer lavado de material vegetal, destilación de agua para preparación de los medios y esterilización en autoclave de los frascos de cultivo. Está acondicionado con un calentador solar para proporcionar el agua en la temperatura ideal para lavado de los restos de agar de la cristalería y así como el lavado de las raíces de las plántulas que serán liberadas a invernadero. El sistema de drenaje está conectado a un biodigestor y una planta de tratamiento de aguas residuales.

Área De Siembra

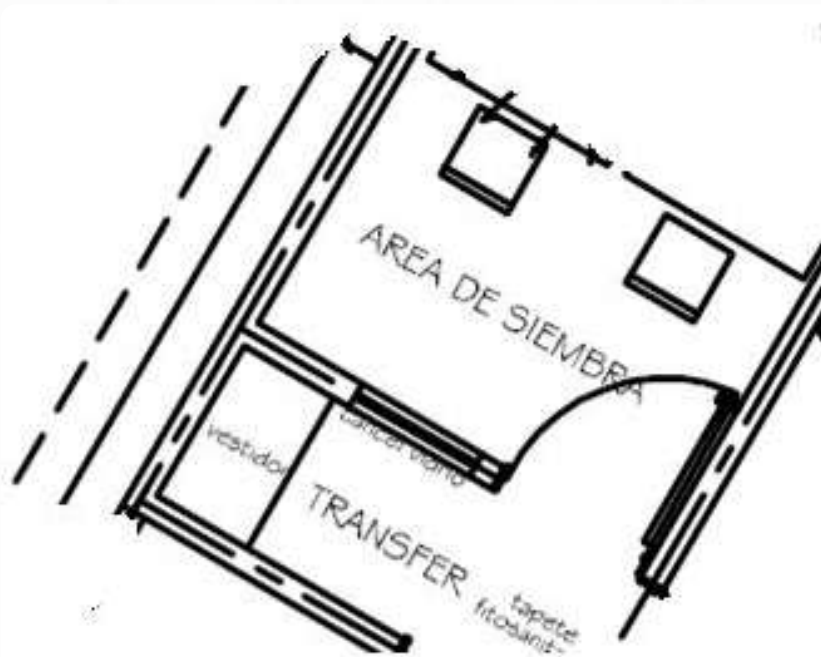


Fig. 12.- Área de siembra
Izquierda.- plano arquitectónico
Derecha.- fotografía

El área de siembra es el espacio más aislado del laboratorio, protegido de corrientes de aire del exterior, el acceso es a través de un área de transfer para cambiado de batas, la pared de este cuarto es lisa y con pintura lavable, en esta área están establecidas las campanas de flujo laminar con luz ultravioleta que proporciona además aire estéril para la siembra de los frutos de vainilla y orquídeas amenazadas. Se cuenta con un stock de frascos con medio de cultivo listos para la siembra de los frutos que entregan los productores

Área De Incubación

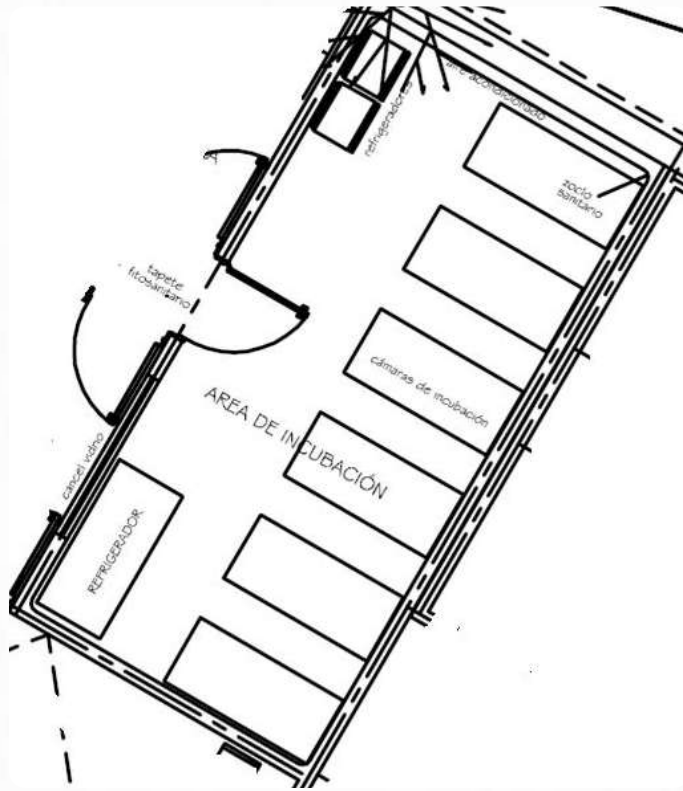


Fig. 13.- Área de incubación
Izquierda.- plano arquitectónico
Derecha.- fotografía

Una de las mayores fortalezas del laboratorio es el cuarto de incubación equipado con control de temperatura y fotoperiodo de luz automático que puede tener en resguardo y micropropagación una gran cantidad de especies amenazadas como banco de germoplasma, donde se propagan orquídeas bajo alguna categoría de riesgo y *Vanilla planifolia* como una orquídea amenazada de gran interés para su conservación.

Cuenta con un sistema de control de la temperatura a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, control de fotoperiodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a través de timers de apagado automático y estantería con lámparas de luz blanca donde se encuentran los frascos de cultivos en incubación.

Invernadero O Sombreadero



**Fig. 14.-
Invernadero**

El vivero o sombreadero, es un vivero de malla sombra que cuenta con mesas para el establecimiento de las plantas, una bodega para el equipo, materiales y sustancias utilizadas para el mantenimiento del vivero, y un área de liberación y crecimiento de las plántulas provenientes del laboratorio, el vivero está protegido alrededor por malla ciclónica y cuenta con un sistema de alarma inalámbrico que mantiene bien resguardadas a las plantas.

3

Recepción De Cápsulas

Fig. 15.- Cápsulas de *Laelia anceps*.





Fig. 16.-
Izquierda.-
Cápsula cerrada
de *Stanhopea*
oculata
Derecha.-
Cápsula abierta
de *Sobralia*
***macrantha*.**

Las semillas pueden ser colectadas a partir de cápsulas cerradas o abiertas. La cápsula verde que está madurando, ya puede ser sembrada, ya que en su interior se encuentra llena de semillas y es más fácil su manejo para el cultivo *in vitro*, es aconsejable utilizar semillas frescas.

El registro de la cápsula, ya sea proveniente de vivero, campo o productor debe ser reportada, con el fin de llevar un registro de la especie y conocer si se encuentra en alguna categoría de riesgo (de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT, 2010), procedencia, tipo de polinización (cruzada u autopolinización) y estado de la cápsula, es decir, si presenta algún daño causado por insectos, bacterias u hongos (Anexo).

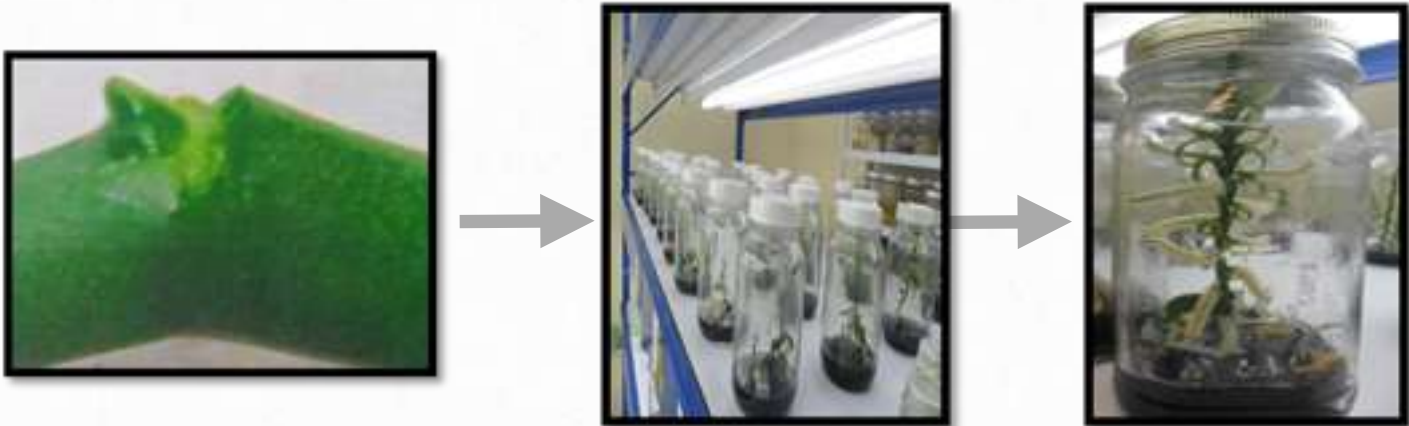
Es importante conocer el tiempo de maduración de las cápsulas, para evitar la pérdida de las semillas durante la dehiscencia y reducir el riesgo de contaminación durante el cultivo *in vitro*. A continuación se anexa una tabla con el tiempo estimado de maduración de los frutos de los principales géneros de orquídeas (Tabla 1)

Tabla 1.
Tiempo de
maduración
de cápsulas
de orquídeas

Género o especie	Meses	Género o especie	Meses
<i>Acineta</i>	7-9	<i>Laelia anceps</i>	4-5
<i>Brassia verrucosa</i>	4-5	<i>Licaste aromatica/deppei</i>	5
<i>Cattleya</i>	11	<i>Miltonia</i>	9
<i>Cymbidium</i>	10	<i>Mormodes</i>	7
<i>Cypripedium</i>	3-5	<i>Odontoglossum</i>	7
<i>Dendrobium</i>	12	<i>Oncidium sphacelatum</i>	7-9
<i>Prosthechea citrina</i>	8-9	<i>Oncidium stramineum</i>	8-9
<i>Prosthechea vitellina</i>	6	<i>Oncidium cavendeshianum</i>	7-9
<i>Epidendrum parkinsonianum</i>	12	<i>Paphiopedilum</i>	10
<i>Brassavola</i>	6-9	<i>Chysis</i>	5-6
<i>Encyclia</i>	5-6	<i>Epidendrum</i>	4-5
<i>Gongora armeniaca</i>	3-4	<i>Stanhopea oculata</i>	6-7
<i>Vanilla planifolia</i>	9-12	<i>Maxillaria</i>	4-6
<i>Bulbophyllum</i>	3	<i>Calanthe</i>	4
<i>Prosthechea citrina</i>	10	<i>Ryncholaelia glauca</i>	12-14

Por otro lado, para el banco de germoplasma (Género *Vanilla*), se realiza cultivo de tejidos en la cual, por medio de meristemos laterales (sin el intercambio genético que se presentan en las semillas) se obtiene clones de especies silvestres para asegurar el resguardo del material genético, como una alternativa de conservación. Así mismo, si existiera la pérdida del ejemplar silvestre por acciones antropogénicas, existe un replica en laboratorio para asegurar su conservación.

Fig. 17.-
Izquierda.-
Yema axilar
de *Vanilla planifolia*
Centro.-
Plantulas de *Vanilla planifolia*
Derecha.-
Banco de germoplasma.



Almacenamiento De Cápsulas Cerradas

El ingreso de alguna cápsula cerrada (que aún no ha presentado dehiscencia), deberá pasar por un proceso de limpieza con agua y jabón, para evitar plagas o pudriciones, la cual puede ser almacenada por algunas semanas, de preferencia en bolsas de papel previamente etiquetadas a 4° C en un refrigerador, reduciendo el tiempo de maduración y así evitar que se abra, como también evitar la pudrición temprana. Mantenerlas en observación y evitar que estén mucho tiempo almacenadas en bolsas de plástico, ya que la cápsula al ser muy succulenta, suda y aumenta el riesgo de pudrición.

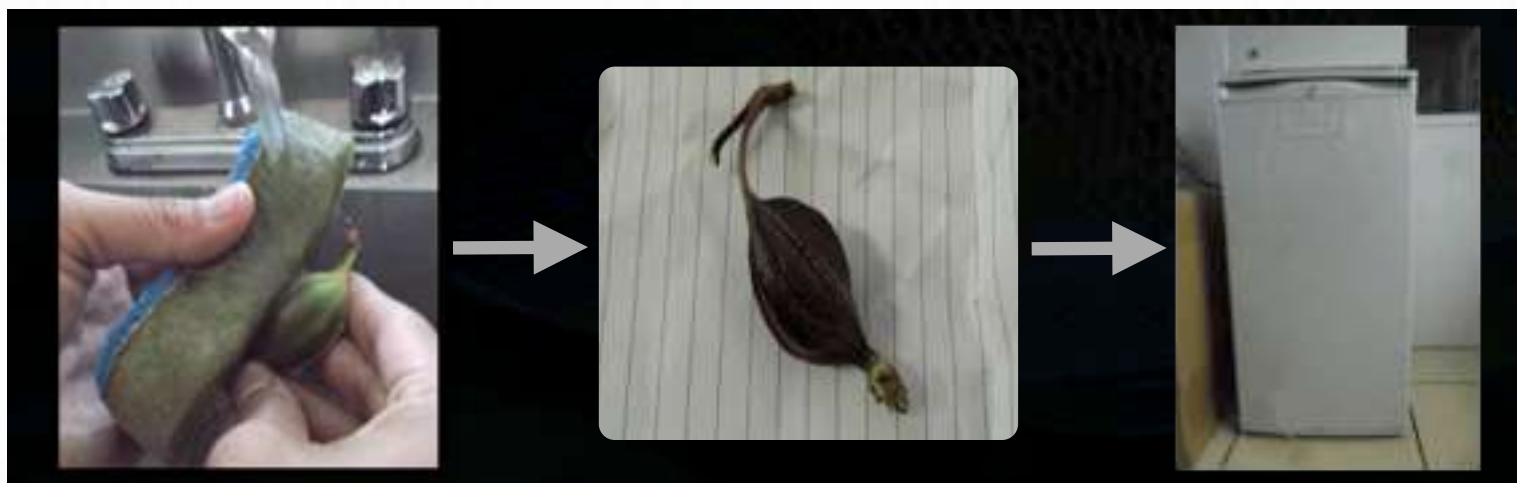


Fig. 18.1.- Almacenamiento de cápsula cerrada

Eliminar la parte apical y basal sobrantes de la cápsula, para reducir la probabilidad de contaminación.

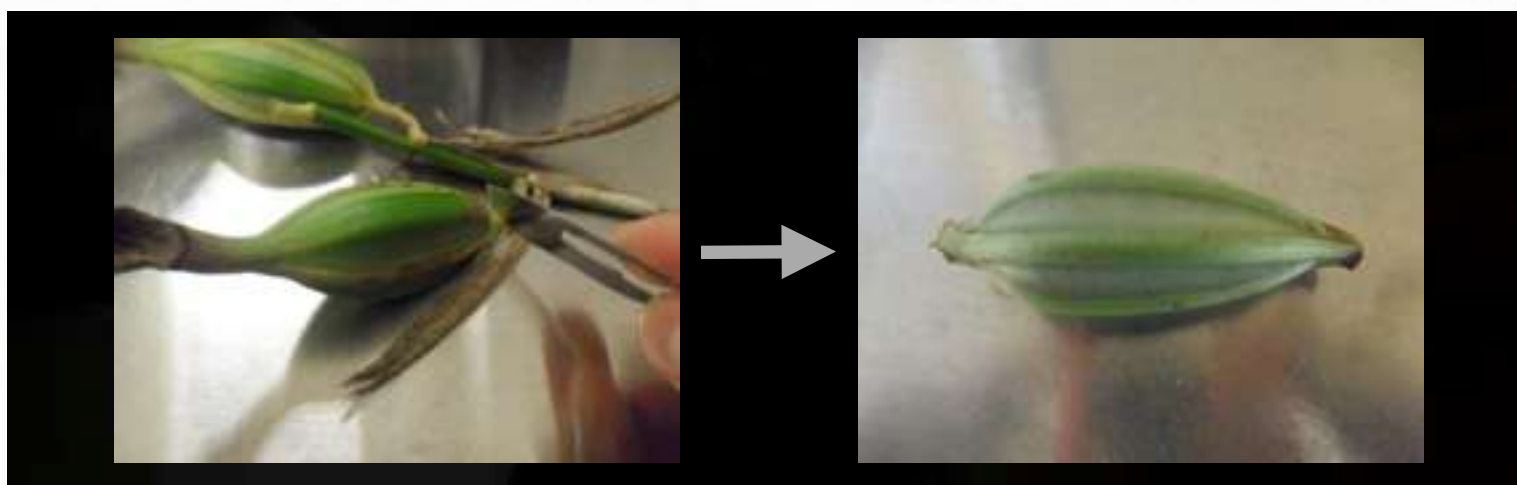


Fig. 18.2- Almacenamiento de cápsula cerrada

Almacenamiento De Cápsulas Abiertas

1.- La cápsula se coloca en una bolsa de papel, con silica gel (se recomienda usarlo por corto plazo), almacenarla en el cuarto de incubación a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, previamente etiquetado con el nombre o simplemente dejar secar a la temperatura ambiente de una habitación, en clima seco, reduciendo la humedad, evitar la pudrición por la aparición de hongos o bacterias que afecten las semillas, y evitar la contaminación en la siembra *in vitro*.

2.- Se pueden retirar las semillas de las cápsulas y colocarlas en pequeños sobres de papel o en frascos cerrados (con etiqueta), las cuales pueden ser almacenadas por meses en el refrigerador.

Se puede conocer la viabilidad de las semillas antes de sembrarlas con Cloruro de 2-3-5 trifeníl- tetrazolio (TTC), considerado uno de los mejores indicadores para la viabilidad. En una caja petri se coloca una pequeña porción de semillas y al agregar el TTC, se tornan de color rojo, el cual indica que son viables, si no se observa ninguna coloración las semillas no son viables.



Fig. 19.1.- Almacenamiento de cápsula



Fig. 19.2.- Almacenamiento de cápsula

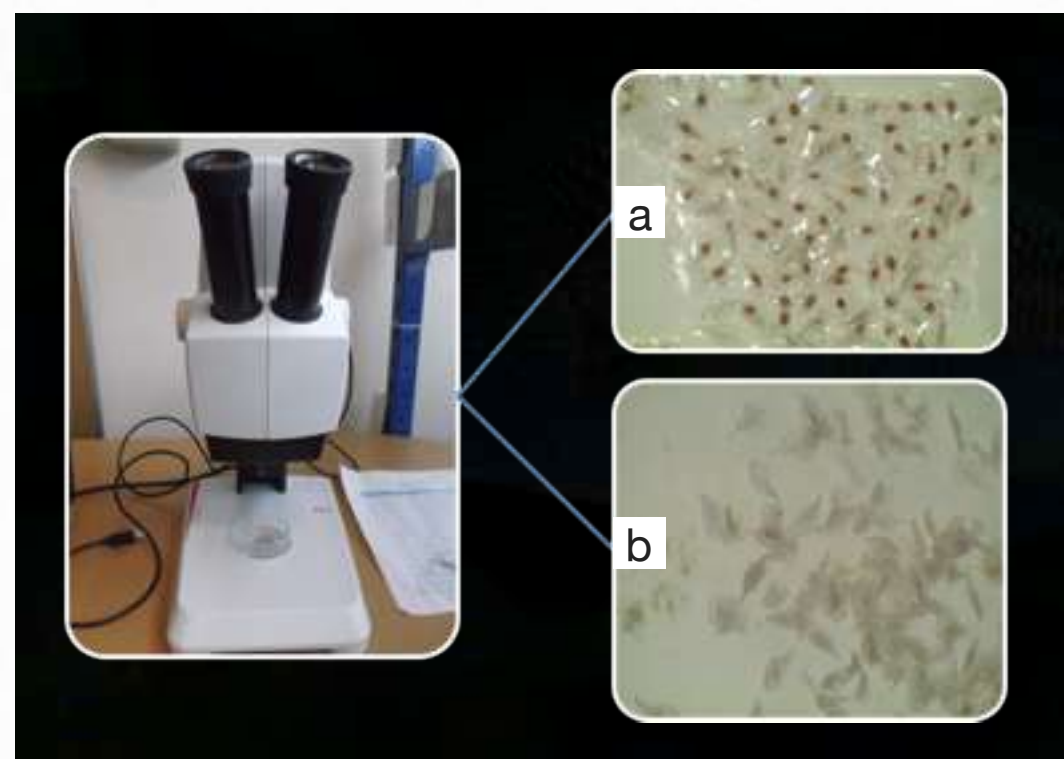
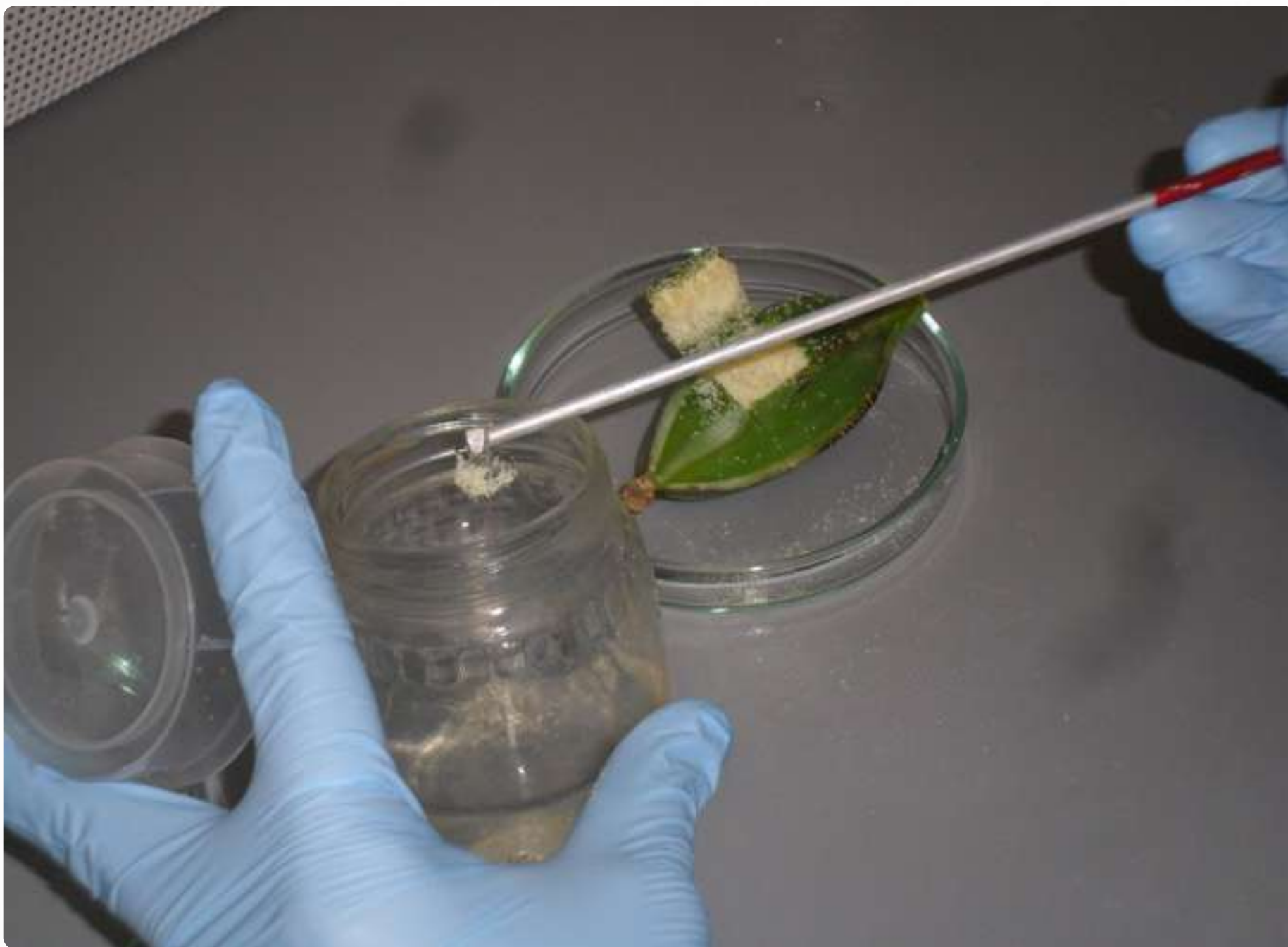


Fig. 20.- Prueba de viabilidad con TTC a) semillas viable, b) semillas no viables.

4

Cultivo *in vitro*

Fig. 21.- Siembra *in vitro* de semillas



La micropropagación es un conjunto de técnicas o métodos de cultivo *in vitro*, usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales bajo condiciones asépticas controladas y libres de microorganismos

(Street, 1977; Calva y Ríos, 1999); a partir de una fragmento o explante (yemas, semillas, raíz, hojas, etc.) se multiplican o propagan plantas nuevas en grandes cantidades en poco tiempo y libres de enfermedades.

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas y contienen poca o ninguna reserva alimenticia que le sirva para la germinación, por lo que mediante la técnica *in vitro*, se germinan las semillas asépticamente en frascos de vidrio o plástico sobre un medio nutritivo gelificado que contiene azúcares y sales minerales necesarios para una exitosa germinación y buen desarrollo de las plántulas.

La germinación *in vitro* puede ser: simbiótica (presencia del hongo que realiza la asociación micorrízica) o asimbiótica (sin la presencia del hongo). Esta última es utilizada en la propagación de orquídeas, ya que tienden a crecer fácilmente en un medio complejo que contiene los nutrientes orgánicos e inorgánicos, y azúcares disponibles para la orquídea (Téllez, 2011).

Obteniendo la ventaja de usar semillas como explante, las orquídeas nativas de importancia ecológica, alimentaria, ornamen-

tal, medicinal, en alguna categoría de riesgo, etc., pueden mantener el pool genético, situación que no sucede con la micropropagación clonal (Stenberg et al, 1998). Al usar dicha técnica se pueden obtener plántulas en menor tiempo y mayor número de ejemplares libres de enfermedades.

Los factores que determinan la germinación, el desarrollo y el crecimiento de las plántulas de orquídeas *in vitro* de acuerdo con Arditti(1993) y Hurtado y Merino (2001) son:

- La genética de las plantas.
- Tiempo y viabilidad de las semillas.
- Nutrientes, agua, macronutrientes y micronutrientes.
- Luz, temperatura y humedad.
- pH, concentraciones de oxígeno y bióxido de carbono.
- Sustancias orgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos, etc.

Fig. 22.- Plántulas en desarrollo *in vitro*



Medio MS

Para la micropropagación, es necesario realizar medios de cultivo que ayuden a optimizar la germinación, regeneración y desarrollo de las plantas, para lo cual es necesario brindarles a las semillas los nutrientes necesarios para su germinación sin la presencia de un hongo micorrizico. El medio de cultivo más utilizado es MS (PhytoTechnology Laboratories, LLC™), el cual se compone de diversos macro y micro-nutrientes (tabla 2).

M519 Murashige & Skoog (MS) Basal Medium w/ Vitamins	Formula (mg/L)
Macronutrientes	
Sulfato de magnesio ·H2O	180.7
Cloruro de Calcio	332.2
Nitrato de Potasio	1900
Nitrato de Amonio	1650
Fosfato de Potasio Monobásico	170
Sulfato de Amonio	170
Micronutrientes	
Sulfato Ferroso·7H2O	27.8
Sulfato Manganeso	16.9
Sulfato de Zic·7H2O	8.6
Sulfato Cúprico ·5H2O	0.025
Ioduro de Potasio	0.83
Cloruro de Cobalto·6H2O	0.025
Acido Bórico	6.2
Molibdato de Sodio	0.025
Vitaminas	
Myo-Inositol	100
Thiamina	0.1
Acido nicotínico	0.5
Pyridoxina	0.5
Glicina	2

Tabla 2.- Macro y micronutrientes de medio MS

Preparación

En una probeta de un litro se miden 500 ml de agua destilada, se vacía en un vaso de precipitado, (el vaso de precipitado se rotula dependiendo el medio de cultivo que contenga) y se coloca en un parrilla de agitación con una barra magnética.

1. Pesar los 4.43 gL⁻¹ del medio MS
2. Pesar 20 gL⁻¹ de sacarosa o 25 gL⁻¹ de azúcar morena comercial en una balanza analítica calibrada.
3. Vaciar el medio y la sacarosa en el vaso de precipitado*(suplementos orgánicos).
4. Verter la solución en la probeta y aforar a 1 litro con agua destilada.

5. Medir el pH a 5.6 con un potenciómetro, el pH se regula con HCL (-) 1N y NaOH 1.0 N. (+).

6. Pesar y agregar 3 gL⁻¹ de gelrite a la solución o la cantidad recomendada según la marca.

7. Se toman 25 ml de la solución con una jeringa y se vacía en frascos de vidrio y se tapan (rotulados con el nombre del medio utilizado y porcentaje).

8. Se colocan en la autoclave.

Nota: Para la sub-cultivo de plántulas se le agrega al medio de cultivo 2gL⁻¹ de carbón activado.

Fig. 23.- Pasos para la preparación de medio de cultivo



Suplementos

La adición de compuestos orgánicos en el cultivo *in vitro*, como la homogenizado de plátano, agua de coco, peptona, triptona, levadura de fermentación, hidrolizado de caseína, jugo de piña, jugo de tomate y extracto de papa, de los cuales los más utilizados es la pulpa de plátano y el agua de coco, por su alto contenido de azúcares, aminoácidos, y agentes promotores del crecimiento (Arditti, 1993), beneficiando el crecimiento y desarrollo de las semillas así como también aumenta el porcentaje de la supervivencia *ex vitro* de las orquídeas, (Moreno y Menchaca, 2007), sin embargo la composición exacta de aminoácidos, vitaminas y hormonas no es definida.

**Tabla 3.-
Suplementos
orgánicos y
sus
sustancias
orgánicas.**

SUPLEMENTO ORGÁNICO	SUSTANCIAS ORGANICAS.
AGUA DE COCO	Rica en Magnesio y fosfatos. Alto contenido en azúcares indispensables para el desarrollo de las plántulas, como también aminoácidos, vitaminas, hormonas, ácidos orgánicos, enzimas y factores de crecimiento.
JUGO DE PIÑA	Alto contenido de ácido cítrico, el cual previene o reduce la oxidación de semillas o protocormos. Contiene azúcares como fructuosas y glucosa las cuales son fuente importante de energía indispensable para el crecimiento.
JUGO DE TOMATE	Fuente importante de ácido cítrico y vitaminas, que favorecen el crecimiento de las plántulas. Debe ser utilizado simultáneamente con el carbono activado para evitar su oxidación.
MACERADO DE PLÁTANO	Es fuente importante de carbohidratos como almidones y fructuosa. Debe ser suplementado con ácido cítrico, ácido ascórbico o carbón activado para reducir la oxidación.

Para hacer uso de los suplementos orgánicos, se debe de seguir el mismo procedimiento mencionado en la sección previa (preparación del MS) modificando el paso 3 ya que es aquí donde se agregan, al después de hacerlo se debe de aforar y continuar con el procedimiento.



- En el caso de la pulpa de **plátano** se agregan 100g/L previamente machacado y hervido.



- Agregar el **agua de coco** 120 ml/L previamente filtrada



- Ambas preparaciones son por separado aunque se pueden combinar con las mismas medidas antes mencionadas

Nota: Todo este proceso se debe mantener en agitación constante con la barra magnética para disolver y evitar la sedimentación.

Fig. 24.- Plántulas en medio de cultivo con sustratos orgánicos, piña (1), fécula de maíz (2) y combinado (3)



5

Esterilización

Fig. 25.- Métodos de esterilización utilizados durante el proceso de la siembra *in vitro*.



El proceso de esterilización, es aquel en el cual se elimina todo microorganismo, ya que al utilizar medios nutritivos, hongos o bacterias pueden aprovecharse de este, liberando toxinas provocando la inhibición de la germinación de las semillas y en su caso el crecimiento o desarrollo de las es-

pecies, por lo que es necesario cuidar todos los procesos de asepsia, durante el proceso de micropropagación. Existen diferentes formas de esterilización, sin embargo la más utilizada en este proceso es el de calor húmedo, a través de la autoclave.

Campana De Flujo Laminar

Los pasos a seguir para realizar la esterilización del material que se usara en la campana de flujo laminar son:

1.-Seleccionar el material que será esterilizado (pinzas, asas, bisturí, agujas, cajas petri) y serán envueltos en papel aluminio (papel craft ó bolsas de polipapel) suficiente para cubrir cada material.

2.- El material se colocara en un Autoclave de 1.5 kg/cm² y 120-121 °C

- Medio de cultivo 15-20 min.
- Instrumentos pinzas y bisturíes y cristalería 20 min.
- Sustratos (tierra, tepezil, etc.) 20-25 min.

3.- Se tapa y cierra la autoclave. Posteriormente se enciende la autoclave a temperatura máxima esperando un alcance de 5 PSI. Se libera la presión abriendo la válvula hasta que el aire salga caliente, este proceso es conocido como “purgado”. Se vuelve a cerrar la válvula.

4.- Cuando la autoclave alcance 1.5 kg/cm² y una temperatura de 120 °C, se regula a temperatura media y se toma un tiempo de 15- 20 minutos, una vez concluido los 15- 20 minutos se apaga y se desconecta la autoclave.

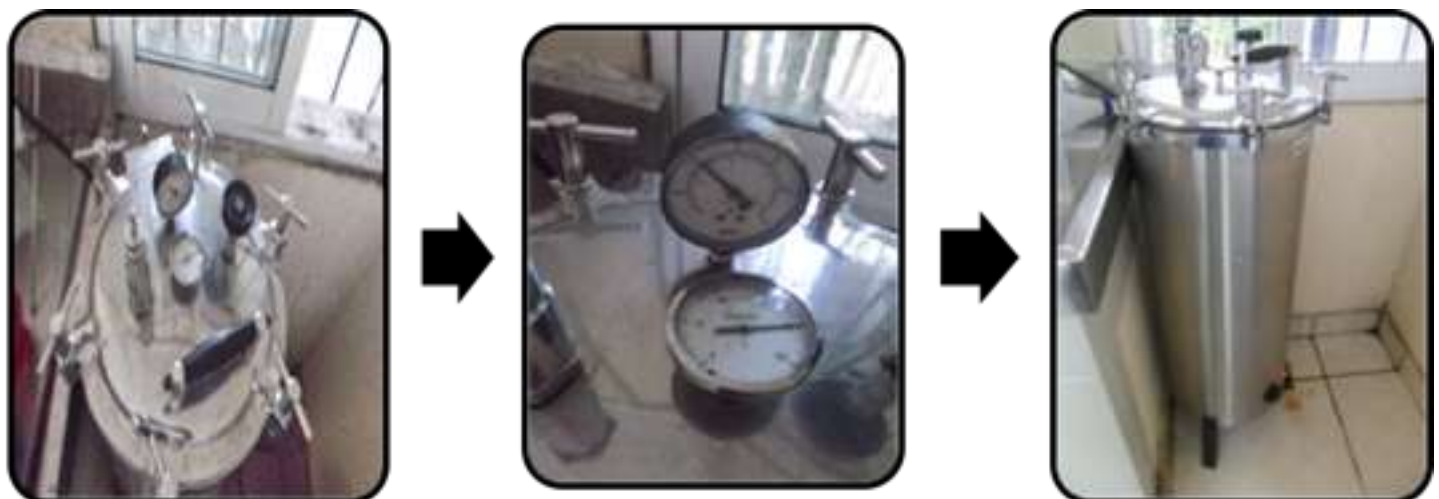
5.-Esperar y no liberar la presión inmediatamente

6.- Se deja enfriar liberando la presión lentamente, sacar el material (rociarlo con alcohol al 70%) y colocarlo en una campana de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70% o con luz UV de 20- 30 min.

7.- Los recipientes con medio de cultivo, se sellan con clean pack para evitar que estos se contaminen.

El medio se puede almacenar a temperatura ambiente por 2 semanas o aumentar el tiempo de almacenamiento en refrigerador. Se debe preparar el medio fresco siempre que sea posible.

**Fig. 26.-
Esterilización
de material y
medio de
cultivo.**



6

Procesos De Siembra De Semillas

Fig. 27.- Flameado de cápsula



El cultivo *in vitro*, inicia con la desinfección superficial de las semillas con hipoclorito de sodio para la eliminación de contaminantes externos como lo son hongo y bacterias, por lo que es necesario aplicar distintos métodos, dependiendo de las condiciones de la cápsula y del material vegetal disponible.

Una vez desinfectadas las semillas, es necesario mantener las condiciones de asepsia, posteriormente en el cuarto de siembra, bajo condiciones de esterilidad apropiadas se procede a la siembra *in vitro* de semillas, el trabajo realizado en un área estéril, proporcionado por una cámara de flujo laminar de aire, reduce la probabilidad de contaminación.

Proceso De Siembra De Cápsula Cerrada

Para la previa desinfestación del fruto, este deberá ser lavado con una solución jabonosa, con la ayuda de un cepillo suave o fibra para trastos y será secado.

Preparación de solución de hipoclorito de sodio para desinfección de la cápsula.

1. En una probeta graduada se miden 20 ml de hipoclorito de sodio (NaClO) y se afora a 100 ml con agua destilada, añadir 2 gota de tween (Polyoxyethylenesorbitan mono-laurate) por cada 100 ml de solución, de 15 – 20 min.

2.- Posteriormente se prepara una solución de alcohol al 70 % (en un probeta graduada se miden 70 ml de alcohol y se afora con agua destilada a 100 ml) y se vierte en un vaso de precipitado por 1 min.

Siembra de semillas

1. Prender la luz UV de 20- 30 min de la campana de flujo laminar (se recomienda que este apagada).

2. Apagar la luz UV y prender la campana 20 minutos antes de sembrar.

3. Desinfectar la campana con alcohol al 70%.

4. Prender el mechero.





5. El operador de siembra deberá desinfectarse las manos y antebrazos con alcohol del 70%, usar cubre bocas (evitar hablar lo menos posible), gorro y bata de laboratorio.

6. Los frascos con medio se rocían con alcohol al 70% dejar secar el alcohol y pasar por la flama.

7. Los frascos se deben de abrir en dirección al filtro de la campana de flujo laminar.

Siembra de semillas de un fruto verde.

1. Una vez desinfestado el fruto se lleva a campana

2. Se rocía con alcohol al 96% y se flama.

3. Colocar el fruto en una caja petri, cortar la parte basal y floral, posteriormente realizar un corte longitudinal a lo largo del exocarpo del fruto dejando expuestas las semillas.

4. Con un asa bacteriológica, se toman las semillas de la capsula y se colocan en el medio.

Nota: La tapa y boca del frasco se pasaran por la flama antes y después de la siembra.



Proceso De Siembra De Cápsula Abierta

Método de sobre

1. Con un papel filtro se elabora un sobre de aproximadamente 5 cm, (este dependerá de la cantidad de semillas disponibles en la cápsula) se colocan las semillas dentro del sobre sellándolo con grapas
2. En un vaso de precipitado se coloca el sobre en una solución de hipoclorito de sodio al 1% adicionado 2 gotas de Tween por cada 100 ml. Durante 20 minutos se mantiene en agitación constante.
3. Pasar el vaso de precipitado a la campana de flujo laminar previamente desinfectada con Etanol al 70%.
4. Se transfiere el sobre a un vaso con agua destilada estéril agitando por cinco minutos, (Repetir este procedimiento 3 veces).
5. Al concluir el paso 4, el sobre se pasa a una caja petri estéril, abrirlo y sembrar en medio de cultivo.



Método por filtración

1. Mantener el material estéril dentro de la Campana de flujo laminar encendida.
2. Colocar las semillas directamente en una solución de Hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos, manteniéndola en constante agitación.





3. Pasando los 15 minutos verter las semillas con la solución de hipoclorito de sodio en un embudo de cristal con papel filtro estéril. Y enjuagar con agua destilada estéril. Repetir este proceso 2 veces

4. Colocar el papel filtro con las semillas en una caja petri desinfectada.

5. Con un asa bacteriológica se toma una pequeña porción de las semillas y se coloca en el medio de cultivo correspondiente.

Método de la “jeringuilla”.

Se debe tomar una jeringa de 5 ml y colocar un filtro en la punta a base de algodón, envuelto de tela y amarrado con una liga. Posteriormente se inserta el embolo para asegurarse de que no está completamente taponeado.

1. Sacar el embolo de la jeringa, verter una pequeña cantidad de semillas e insertar nuevamente.

2. Preparar una solución de Hipoclorito de sodio al 1% añadiendo una gota de Tween

3. Absorber con la jeringa 4 ml de la solución antes preparada y agitarla durante 5 minutos, asegurándose de que



la semilla se mojen completamente y que no queden atrapadas en burbujas. Expulsar esta solución y repetir el proceso.

4. Lavar las semillas de 3 a 4 veces, absorbiendo agua destilada y esterilizada en la jeringuilla, agitando por un momento y luego expulsando el líquido.

5. Sembrar las semillas en el medio de cultivo, expulsando el exceso de agua, sacando el algodón con unas pinzas y colocando las semillas en el medio.

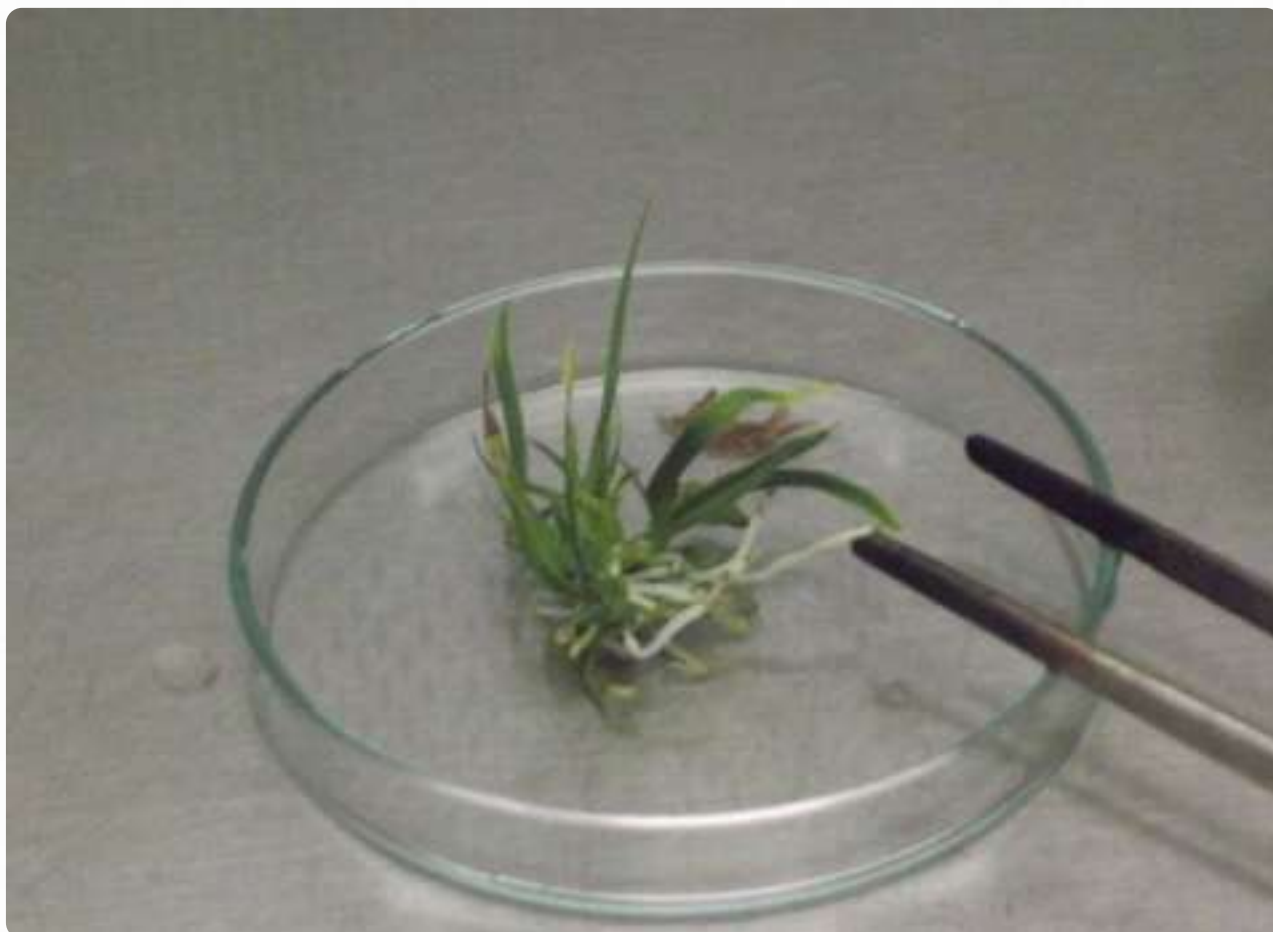


7

Subcultivo

**Fig. 28.- Plántula de
*Prosthechea vitellina***

Posterior a la germinación de las semillas en condiciones *in vitro*, se realizan sub-cultivos, los cuales consisten en resembrar las plantas en un medio de cultivo fresco, esto para reducir el estrés en las plantas y evitar la muerte de las mismas, causado por diversos factores como la falta de nutrientes y la limitación del espacio, entre otras. El medio de cultivo utilizado



para el subcultivo, es medio MS basal, sacarosa 25 gr/l, gel rite 3 gr/l, carbón activado 3 gr/l, con pH de 5.6; medio que puede ser complementado con suplementos orgánicos como agua de coco, plátano o piña. De esta manera las plántulas alcanzan el buen desarrollo de hojas y raíces o en ocasiones se observa hasta la presencia de pequeños pseudobulbos, favoreciendo el proceso de aclimatación.

Es necesario adicionar carbón activado en el medio de cultivo, ya que absorbe muchas moléculas orgánicas e inorgánicas del medio, elimina los contaminantes del medio de cultivo, elimina productos secundarios secretados por los tejidos, regula el suministro de determinados reguladores de crecimiento, así como también debido al oscurecimiento del medio simula las condiciones del suelo generando raíz y estimula la embriogénesis.

Proceso de subcultivo

1. Se utiliza el material estéril (frascos con medio de cultivo con carbón activado, pinzas, agua destilada, alcohol) dentro la campana de flujo laminar.
2. En la campana de flujo laminar se destapa el frasco que contiene las plántulas que se encuentran en condiciones *in vitro*.
3. Se toman las plántulas con las pinzas estériles (si es necesario se pasan las plántulas a la caja Petri y se separan o se les retira las partes muertas) y se colocan en el medio de cultivo de forma que la parte de la raíz de las plántulas se introduzcan en el medio.
4. Los frascos resembrados se sellan con clean pack y se rotulan para posteriormente colocarlos en la cámara de incubación.



Rotulación

Terminada la siembra los frascos han de ser sellados con clean pack y rotulados con el nombre completo de la especie, medio de cultivo utilizado y fecha.

***Stanhopea tigrina*- MS100%- 01/01/2014**

Al terminar el rotulado, los frascos de deben colocar en un estante dentro del cuarto de incubación.



Fig. 29.- Frascos rotulados.

Cuarto de incubación

Los cultivos se encubran en un cuarto apropiado o en gabinetes o cámaras de crecimiento; esas pueden ser más eficientes en cuanto control ambiental, pero son más costosas. El área de incubación o crecimiento *in vitro* debe proporcionar un buen control de la temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) de iluminación (variable, según las necesidades: 1,000 a 5,000 lux) y de la humedad relativa (70 %- 80%). Es necesario propiciar una buena distribución del aire en este cuarto para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces.

La regulación de la temperatura se puede lograr por medio de aparatos de aire acondicionado de pared o de un sistema central. En cualquier caso, es necesario tomar precauciones para evitar el calentamiento excesivo, instalando alarmas y controles.

En el caso de las orquídeas las plántulas crecen en gavetas a 40 cm de distancia de la fuente luminosa, bajo tubos fluorescentes de 20 watts en un cuarto de crecimiento que está regulado a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de obscuridad. Estas recomendaciones pueden variar, dependiendo del origen de las plantas que van a sembrarse.



8

Aclimatación De Plántulas *in vitro*

Fig. 29.- Plántulas *ex vitro* de *Stanhopea tigrina*



Lograr la aclimatación de plántulas procedentes de cultivo *in vitro* es difícil, puesto que se deben adaptar a las condiciones externas, dependiendo de la especie, ya que provienen de un ambiente aséptico, medio rico en nutrientes, humedad relativa entre el 90 y 95%, las plántulas presentan cutícula delgada, la densidad de estomas es baja. Además, la temperatura, nutrientes que se le proporciona deben ser controladas. A pesar de esto se pueden obtener plántulas *ex vitro*. Una manera de obtener un alto porcentaje de sobrevivencia y aclimatación de las plántulas es teniendo una fase de pre-aclimatación.

La pre-aclimatación consiste en transportar los frascos con plántulas *in vitro*, procedentes del cuarto de incubación, al lugar donde los productores las cultivarán. Dichas plántulas deben tener un sistema de raíz bien desarrollado y hojas de 3 a 5 cm de longitud. Las plántulas deben permanecer en los frascos durante 15 días en el vivero o el lugar donde se van a aclimatar, como un proceso de adaptación para posteriormente empezar con el proceso de “aclimatación”.

Sustratos

El sustrato utilizado para la liberación de plántulas *in vitro* puede ser orgánico o inorgánico y se puede ocupar de forma pura o mezclado (dependiendo del requerimiento de las plantas que se vayan a cultivar), es un material que suministra materia orgánica a las plántulas. Dicho sustrato, además de aportar nutrientes, cumplen la función de fijar y dar soporte a las plantas, proporcionándoles una buena aireación y drenaje dentro de las macetas o domos.

Cada sustrato tiene sus propias características y dependiendo de la especie a cultivar será el sustrato a utilizar, ya sea de forma pura o mediante una mezcla entre otros. Los sustratos que se utilizan con mayor frecuencia en orquídeas y que son fáciles de conseguir son:

1. **Corteza de árboles.-** Es un material orgánico, ligero y con pocos nutrientes; tiene buen drenaje, pero es de corta duración.
2. **Troncos de café o cítricos.-** Es un material orgánico, donde se ocupan troncos o ramas para dar soporte a plantas epífitas (plantas que generalmente viven sobre árboles)
3. **Fibra de coco.-** Es un material orgánico que retiene agua y tiene buena aireación, además de retener nutrientes de abonado, liberándolos poco a poco.
4. **Sphagnum.-** Es un musgo de alta porosidad, capaz de acumular y retener gran cantidad de agua; es antibacteriano para prevenir enfermedades y plagas.





5. **Peat moss.**- Es un material pardo oscuro, con buena retención de humedad, buena aireación y alto contenido de materia orgánica.
6. **Carbón vegetal.**- Es un material muy ligero que no guarda humedad. Se debe ocupar mezclado con otros sustratos como corteza de árboles, hojarasca, sphagnum, etc. Tiene la propiedad de absorber el exceso de sales minerales que se acumulan con la aplicación de abonos y sanea el sustrato.
7. **Grava volcánica.**- Es una piedra que tiene un excelente drenaje y retiene poca humedad, además da estabilidad a las macetas y buen soporte a las raíces; no tiene nutrientes, por lo que se deben fertilizar con frecuencia.
8. **Tepetzil.**- Es una piedra muy liviana y útil para mejorar el drenaje, mezclada con la grava y otros materiales, resulta ser un buen sustrato.
9. **Perlita.**- Es un material muy ligero que se debe ocupar mezclado con otros materiales para mejorar el drenaje de la mezcla de sustrato.
10. **Mezcla de sustratos.**- Combinación de 2 o más sustratos, principalmente se hace con grava, tepetzil, carbón activado y algún material orgánico; dependiendo de la especie a cultivar.

Aclimatación

Proceso de aclimatación de plántulas obtenidas de cultivo *in vitro* de distintas especies de la familia Orchidaceae.

1.- Seleccionar las plántulas que han desarrollado raíz y hojas. Deben tener un tamaño promedio de 5 cm de altura, dependiendo de la especie.

2.- Se aflojan las tapas de los frascos gradualmente para permitir la entrada de aire.

3.- Se selecciona y esteriliza el sustrato. Es recomendable trasplantar las plántulas a un sustrato inerte o inorgánico, en el que se mantengan en humedad para posteriormente colocarlas en un sustrato de crecimiento.

4.- Cuidadosamente se retiran las plántulas del medio de cultivo y con pincel se les retira todo el agar (enjuagar con agua corriente).

5.- Las plántulas se sumergen en un fungicida de tipo sistémico y posteriormente en bactericida para evitar pérdidas de plántulas por contaminación de hongos o bacterias.

6.- Se plantan en el sustrato seleccionado.

1



3



4



5



6



7



9



10



11



7.- A la maceta con la plántula se le coloca una bolsa sostenida con una liga, para evitar la pérdida de humedad y se aclimaten a las condiciones ambientales.

8.- Poner las plántulas en un invernadero para asegurar la alta humedad durante la fase de establecimiento.

9.- Después de siete días, perforar las bolsas gradualmente y 15 días posteriores a la perforación, retirar las bolsas.

10.- En un mes las plantas logran aclimatarse, con hojas y raíces funcionales. Al mes de aclimatadas, puede iniciarse un sistema de fertilización.

11.- Fertilizar 1 vez cada 7 o 15 días

12.- Observar diariamente a las plantas para asegurar que se encuentren en buen estado.

13.- Evitar lugares muy húmedos ó con mucha sombra, ya que puede ocasionar la aparición de hongos o bacterias que dañen o maten la plántula.

14.- Evitar el sol directo, ya que las plántulas son muy susceptibles a la deshidratación.

9

Vinculación

Fig. 30.- Vinculación con productor.



A partir de una reflexión que refleja la carencia de vinculación del sector académico con trabajos comunitarios, el Orquidario Universitario decide incursionar de manera directa en el apoyo a pequeños productores de orquídeas, promoviendo acciones para la conservación de los recursos fitogenéticos a través del aprovechamiento sustentable de estos.

Con el fin de coordinar y apoyar estas acciones, en el Orquidario se desarrolla un esquema de trabajo que finaliza con la entrega de plántulas (generadas en condiciones *in vitro*) a los pequeños productores, para ser aprovechadas comercialmente en sus UMA's. Esta vinculación permite la interacción con la gente poseedora de los recursos, para que a través de la reproduc-



Fig. 31.- Invernadero de orquídeas.

ción contralada de estas plantas y un asesoramiento legal respecto a las UMAs, ellos puedan realizar labores de conservación y desarrollo económico.

Los productores eligen el material que desean propagar bajo condiciones *in vitro* (ya sea material genético propio o del Orquidario) y este es propagado en el laboratorio. Parte del material sirve para realizar labores de Investigación de algunas tesis de Licenciatura y Postgrado, mientras que otra parte del material genético es entregado a los productores.

Estas plántulas son resguardadas por ellos en sus predios, para ser comercializadas cuando alcancen el tamaño adecuado. Cuando las plantas hayan producido sus cápsulas (que contienen a las semillas), los productores regresan al laboratorio para que se realice la misma operación.

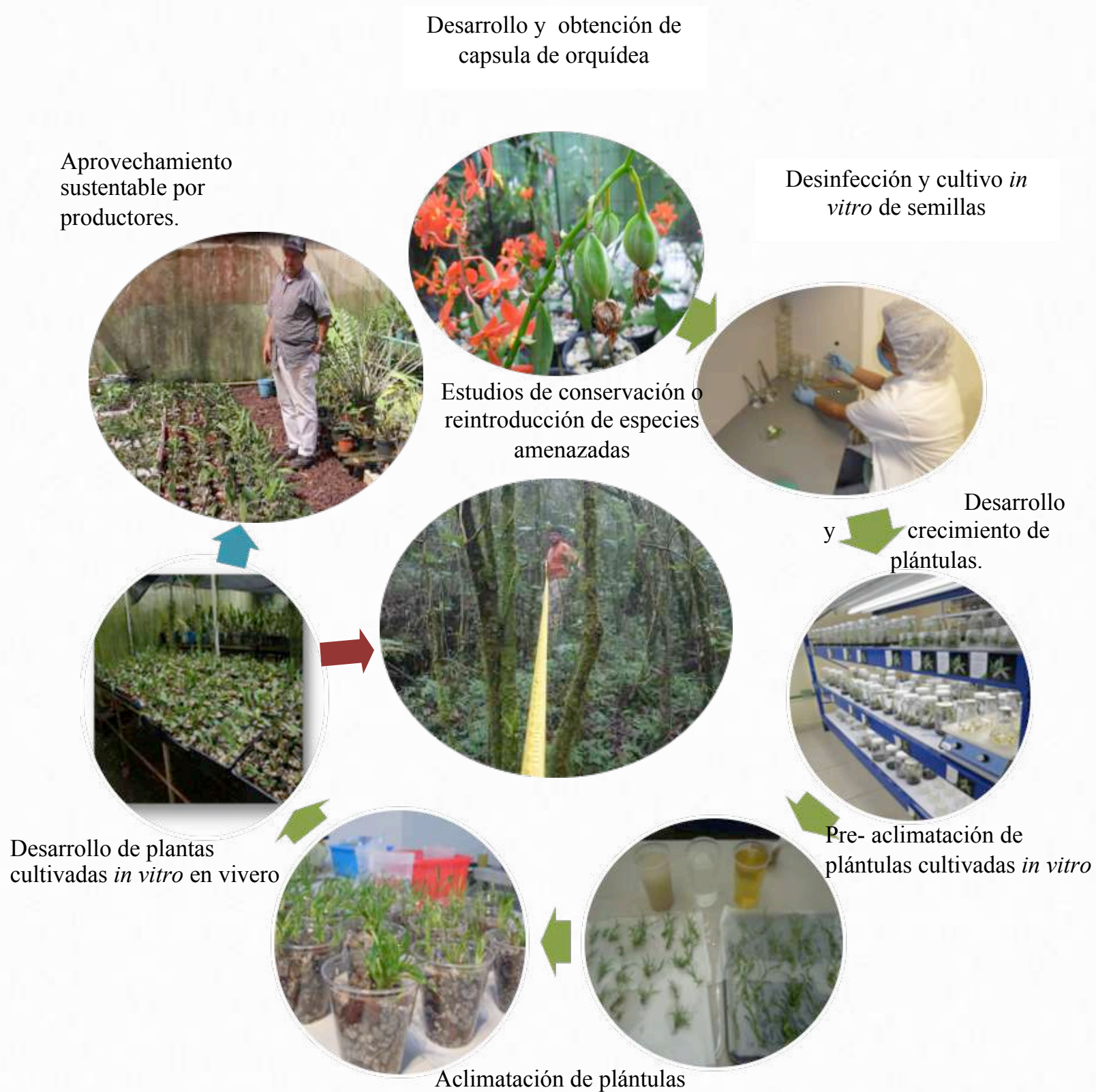


Fig. 22.- Protocolo del proceso de micropropagación *in vitro*

Bibliografía

Ávila Días I., y Salgado Garciglia R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación.

Castro- Bobadilla. (2008). Evaluación de cultivo y producción de vainilla en la zona del Papantla, Tesis de doctorado para obtener el grado de doctor en ciencias en ecología y manejo de recursos naturales. Instituto de Ecología. Veracruz. México.

CITES. (2002). Cites en el mundo. Boletín oficial de las partes. Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre (CITES). Recuperado de:

<http://www.cites.org/sites/default/files/esp/news/world/9.pdf>.

CONABIO. 2010. El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F., México.

Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L y P.J. Cribb (eds). 2003. Orchid Conservation. pp. 1–24. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.

Flores-Palacios, A. y S. Valencia-Díaz. 2007. Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation* 136, 372-387.

Hagsater, E., M. A. Soto Arenas, G. A. Salazar Chavez, R. Jimenez Machorro, M. A. Lopez Rosas y R .L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoin, México, 304 pp.

Hurtado, D. Y Merino, M. 1987. (Reimp. 2001). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México.

Menchaca Garcia R. A., y Moreno Martinez D. 2011. Conservación de orquídeas una tarea de todos. Universidad Autónoma de Chapingo. México.

Soto- Arenas. 1996. México (Regional account) En: Orchid specialist group. Orchids. status survey and conservation action plan, UICN. 53- 58.

Stewart, S. L., y Kane M. E. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant cell, tissue and organ culture 86:147-158.

Téllez Velasco, A.2011. Análisis del diagnóstico de la familia orchidaceae en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México.

Moreno Martínez D., y Menchaca García R.A.2007. Efectos de los compuestos organicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (ORCHIDACEAE) Foresta Veracruzana 9(2):27-32.

Anexo

Bitácora de semillas para siembra.

Nombre de Donante/ vivero y procedencia	Origen del fruto		Fecha de colecta	Fecha de entrega al laboratorio	Fecha del cultivo	Estado del fruto		Técnico y observaciones
	Auto-p	p. cruzada				Abierto	Cerrado	

Bitácora de registro de siembra.

Nombre del usuario	Fecha	Hora de entrada	Actividad	Hora de salida	Control de uso de campana		Observaciones
					Fecha	Actividades	

Bitácora de registro cuarto de siembra

Género	Especie	Actividad		Medio de cultivo	No. de repeticiones	Fecha	Firmas
		Siembra	Sub-cultivo				

Créditos

Rebeca A. Menchaca-García Autor.

Sulayka F. Castelán-Culebro Autor.

Esteban Francisco-Ventura Editor.

Lorena P. Sanchez Morales Editor.

Abraham Méndez-Hernández Editor

Daniel Maruri Flores Maquetado Y Editor.

Daniel Cornú Fotografías.