

Informe Técnico Final

**Evaluación y multiplicación de especies de orquídeas nativas chilenas
(género *Chloraea*) para establecer las bases de un cultivo comercial en la
VIII región de Chile,**

C98-1-A- 022

Versión corregida 5 de septiembre del 2003

p Enrique Matthei Jensen

A manera de Prólogo:

Ha sido larga, y no siempre venturosa, la historia de la relación del hombre con las orquídeas. En nuestro mundo globalizado y deshumanizado andamos buscando en ellas los últimos vestigios de Dios que sobrenadan en el inconsciente.

Fue así como en esta búsqueda singular nos topamos con las orquídeas silvestres chilenas. Plantas fuera de lo común, que por una razón inexplicable son capaces de ejercer una fascinación irresistible. Aquel que no las conoce, difícilmente podrá compenetrarse de este sentimiento. Sucede a menudo que es como un amor a primera vista que luego nos convierte en admiradores apasionados.

Estas plantas poseen la particularidad de desarrollar en sus flores las más bellas y extravagantes formas que la imaginación puede concebir. Asombra su capacidad inventiva, fuera de lo común, que han desarrollado las orquídeas para perpetuar la especie. En el transcurso de la evolución se han valido de estratagemas para atraer a los agentes polinizantes naturales con sus variadas formas y aromas. Como las nuestras optaron por no producir néctar, con lo que ahorran una considerable cantidad de energía, engañados acuden los insectos a ellas, y al contactarlas, las fecundan. Su largo periodo de floración, durante el cual permanecen siempre cautivantes, sensuales y provocativas, es otro ardid que utilizan para no pasar inadvertidas. Se tiene la sensación que las orquídeas no son solo creativas, inteligentes y comprensivas, sino que también excéntricas y caprichosas. Los admiradores más entusiastas afirman que estas plantas son el nexo de unión entre el reino vegetal y animal.

Gracias a fondos concursables obtenidos del Gobierno de Chile a través de la Fundación para la Innovación Agraria, nos fue posible acercarnos con mayor detención a estas flores, poder escuchar sus leves murmuraciones y decodificar sus sorprendentes y crípticos mensajes.

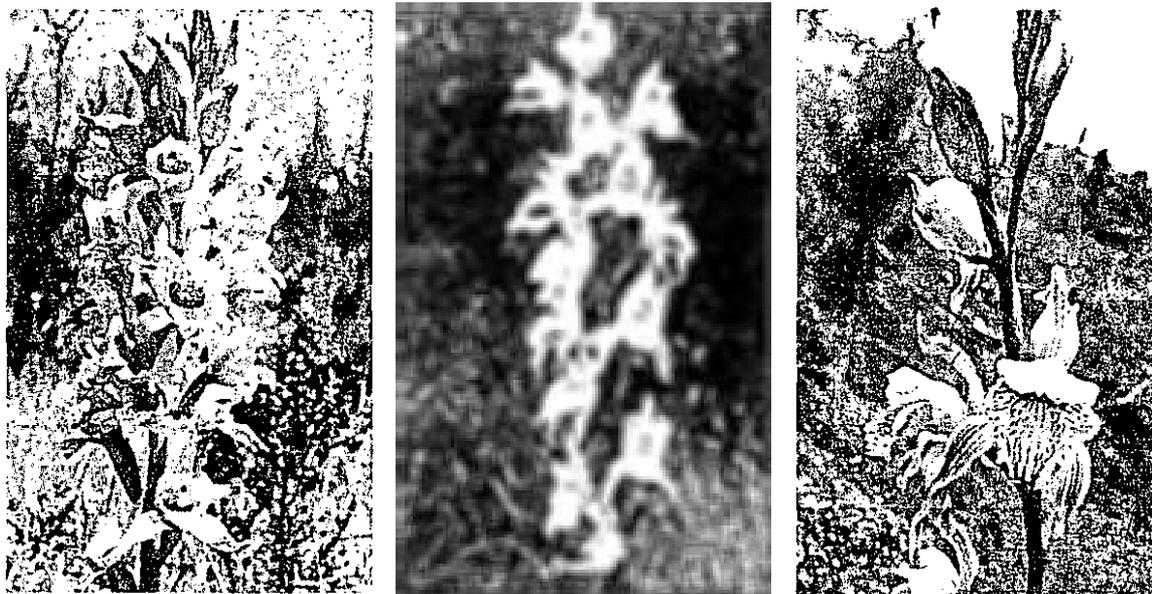
Así nos fue posible, en forma indiscreta, adentrarnos en sus secretos más íntimos. Sin percatarlo, o mejor dicho, casi sin darnos cuenta, caímos prisioneros del embrujo y belleza de sus flores, como si al ir desentrañando sus laberínticos misterios, nos hubiésemos dejado seducir por el canto de sirenas de su magia, fragancia y hermosura.

Chile también tiene el privilegio de contar con una multiplicidad de orquídeas terrestres de singular belleza. Con su presencia esbelta y delicada contribuyen, no sólo a anunciar la primavera, sino que también al bordado de flores de nuestro campo, y sin embargo, su mundo encantado sigue siendo poco conocido. Algunas especies, en algunas regiones, están en franca y peligrosa disminución por descuido e irresponsabilidad.

Por eso es necesario aguijonear la conciencia colectiva para cuidarlas y preservarlas por ser un patrimonio genético nuestro, invaluable e insustituible, verdaderas joyas de la biodiversidad. Muchas de ellas son endémicas, es decir, crecen solo en esta parte del planeta, llegando así a formar parte de nuestra identidad.

Tanto al participar en el Primer Congreso Internacional de Conservación de Orquídeas celebrado en Perth, la capital de Australia Occidental, como en la Expomundo Rural, llevada a efecto en Santiago de Chile, pudimos percatarnos que muy pocos sabían de su existencia. Con estas imágenes pretendemos invitarlos a redescubrir su mundo increíble, que por mucho tiempo ha permanecido casi ignorado.

Por el esfuerzo y colaboración prestados en la investigación de nuestras orquídeas terrestres del género Chloraea quisiera expresar mis agradecimientos a La Fundación para la Innovación Agraria, a todos los miembros del equipo científico, a Biotecnología Agropecuaria S.A., así como también a alumnos y colaboradores que nos ayudaron en muchos aspectos.



(Fotografías N° 1, 2 y 3)

Orquídeas silvestres chilenas del género *Chloraea*. A fin de mantener la biodiversidad de este valioso e insustituible patrimonio genérico, la Fundación para la Innovación Agraria, está empeñada, no solo en promover la regulación y protección de la flora chilena, sino que también está dando un serio impulso en investigar su potencial, concebido también como fuente de posibles usos económicos y comerciales.

Ch. Crispa Lindl., *gavilu* Lindl., *virescens* Lindl.

Enrique Matthei Jensen.
Coordinador del Proyecto
C98-1-A-022

CONTENIDO

1. ANTECEDENTES GENERALES	3
2. RESUMEN EJECUTIVO	6
3. TEXTO PRINCIPAL	8
3.1. Texto principal	8
3.2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto	8
3.2.1. Descripción breve de los impactos obtenidos	9
3.3. Aspectos metodológicos del proyecto	10
3.3.1. Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados	10
3.3.2. Principales problemas metodológicos enfrentados	39
3.3.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas	39
4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EFECTUADAS	40
5. RESULTADOS DEL PROYECTO	42
6. FICHA TÉCNICA Y ANÁLISIS ECONÓMICO	104
7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO	105
8. CALENDARIO DE EJECUCIÓN Y RESUMEN DE COSTOS	106
9. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS	106
10. IMPACTO DEL PROYECTO	107
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	109
12. OTROS ASPECTOS DE INTERÉS	114
13. ANEXOS	116
14. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	119

1. ANTECEDENTES GENERALES

El nombre del Proyecto "Evaluación y multiplicación de especies de orquídeas nativas Chilenas (género Chloraea) para establecer las bases de un cultivo comercial en la VIII Región de Chile". Código C98-1-A-022, regiones VIII, VI y V

Fecha de aprobación 1998 concurso normal
Agente ejecutor: Enrique Matthei Jensen

Investigadores asociados: BTA, Michael Bourke (U de Talca) Ximena Calderón (U. de Talca) Norberto Garrido (U de Concepción) Gabriela Verdugo y Mauricio Cisternas (U Católica de Valparaíso)

Participantes en actividades parciales: Julio Becerra, Rodrigo Reinoso, Iván López, Alejandra Uribe, Angélica Rendich, Maritza Troncoso, Lysette Mersey

Coordinador: Enrique Matthei J/Biotecnología Agropecuaria S.A. de Santiago (BTA) Ximena Álvarez y Álvaro García entre 1998 y 2002

Costo total del proyecto: 151.381.000

Aporte del FIA %

Período de ejecución El Proyecto tuvo una duración de 48 meses desde el 1 de agosto de 1998 al 1 de Agosto del 2002, con una reprogramación hasta el 31 de Marzo del 2003.

2. RESUMEN EJECUTIVO.

Este trabajo de investigación comprendió la domesticación de 3 especies de orquídeas silvestres chilenas del género *Chloraea*, los ejemplares iniciales fueron recolectados en un predio particular cercano a Yumbel, Octava Región, Chile Central, posteriormente fueron incorporados ejemplares de otras zonas .

Desde el punto de vista botánico la gran familia de las *Orchidaceae* está representada en nuestro país por 47 especies repartidas en 7 géneros. El más numeroso corresponde al género *Chloraea* Lindl., con 28 especies de singular belleza. Cinco de éstas orquídeas crecen en el predio en referencia: *Chloraea crispa* Lindl. con flores grandes, blancas y vistosas, *Chloraea gavilu*, Lindl. de un color amarillo intenso, con estrías, concrecencias y laminillas verdes y *Chloraea virescens* Lindl., blancas con estrías y ápices verdes. Estas especies constituyen unas de las más hermosas de este género. Sin embargo, tanto en nuestro país como en el extranjero se sabe muy poco de ellas.

La falta de información de estudios taxonómicos, fisiológicos y ecológicos, sumados a las constantes mermas de las poblaciones ha contribuido a la desinformación de este grupo de plantas.

Las poblaciones de orquídeas de todo el mundo están expuestas a un proceso de pérdida de degradación del medio ambiente como es la fragmentación del hábitat natural, asociado al tráfico ilegal de las orquídeas de ultramar, aún sin poder ser controlado, en un mercado mundial que siempre apunta hacia lo exótico y novedoso hacen que estas plantas estén vulnerables a la gran presión impuesta por el hombre.

Para el cultivo masivo de estas plantas, con miras al mercado internacional, se recurrió al acopio de información sobre su crecimiento y desarrollo. Esta actividad se centró en un sentido eminentemente práctico y de real aplicación inmediata, a fin de poder ir incorporando a sectores menos competitivos de la economía campesina regional a una nueva actividad productiva.

Un avance significativo fue reproducirlas por primera vez por semilla en cultivo in vitro en laboratorio. Paralelamente se aislaron los hongos micorrícicos asociados a sus rizomas, que permitieron el desarrollo de protocolos de germinación simbiótica masivas.

Se describió la fenología de la especie, se evaluaron parámetros de crecimiento de interés productivo, como largo de vara, número de flores por inflorescencia, duración de las flores individuales y en la espiga analizaron distintos sustratos, fertilización, riego, temperatura, luminosidad, asociadas a condiciones de cultivo reales. Además se estudiaron los agentes patógenos que las afectan a nivel de cultivo.

Se comenzó preliminarmente con mejoramiento genético, seleccionando plantas elite de interés agronómico, con las cuales se realizaron cruzamientos dirigidos, temporada 2001 y 2002 obteniéndose las primeras progenies, para un posterior programa de mejoramiento.

Igualmente se han divulgado los conocimientos adquiridos en Congresos, tanto en nuestro país como en el extranjero. Se realizaron días de campo , llevado a efecto durante la primavera del año 2001 y 2002 en el predio donde se realizaron gran parte del programa de la investigación aplicada, mostraron los avances y el potencial de estas flores que es preciso despertar, desarrollar , divulgar y comercializar.

En este ámbito, fue posible asistir también al primer Congreso Internacional de Conservación de Orquídeas en Perth, la capital de Australia Occidental, en Septiembre del 2001. Este evento de alto nivel organizacional y científico, no solo permitió intercambiar información y aquilatar nuevas técnicas conservacionistas y propagación, sino que también nos puso en contacto personal con una pléyade de

científicos, cultivadores y amantes de estas flores de renombre internacional , lo que nos amplió el horizonte de conocimientos que teníamos de estas plantas.

Se pudo observar que las chloraeas en estudio compiten ventajosamente en belleza, tamaño y exotismo, con otras orquídeas, de otras especies y de distintas procedencias.

Si bien, hasta el momento, no se ha logrado obtener flores de las primeras plantas cultivadas en laboratorio, como era el objetivo del Proyecto, estamos muy cerca de lograrlo.

Ha sido un trabajo multifacético, pionero, exigente, prolongado y apasionante. Nos ha tomado un período de tiempo de cuatro años, quedando inconcluso, lo cual es poco si se considera la casi nula información existente sobre las orquídeas de este género y lo lento de su crecimiento y desarrollo.

Diversificar nuestra opción como país emergente en la producción de flores bulbosas, al obtener un producto original , novedoso, y atractivo, con alto valor agregado, accediendo así a marcados objetivos estables y rentables, consolidándose allí la presencia de nuestras orquídeas cultivadas.-

3. TEXTO PRINCIPAL.

El proyecto original buscaba domesticar orquídeas chilenas del género *Chloraea* se entiende por ello el establecimiento de un número de plantas en cultivo comercial, conducidas con manejos agronómicos tal que se produzca cantidad, calidad y en épocas definidas.

Para establecer normas de manejos en especies desconocidas se debe hacer un estudio acabado del comportamiento *in situ*, establecer una población a partir de colectas, la cual es mantenida en condiciones controladas y en ella se realizan los ensayos correspondientes *ex situ* y esos fueron los objetivos iniciales del proyecto.

Uno de los puntos críticos de este tipo de proyectos es la propagación de la especie tanto sexual como asexual estos estudios correspondían a objetivos específicos del proyecto.

El estudio se realizó en el predio "Ríos Los Yahuilos" situado en el Valle Central de la Octava Región de Chile, tiene como límites naturales por el sur el Río Laja, y por el norte el Estero Yahuilo, ambos tributarios del río Bío-Bío. Con un clima mediterráneo, la pluviométrica es de 1200 mm al año que se distribuyen en inviernos lluviosos y veranos secos, durante los cuales predomina el viento sur, con heladas que empiezan a fines de otoño, y primaveras benignas. Esta zona de arenales ha sido objeto durante las últimas décadas, de un acelerado proceso de forestación con pino radiata.

Las orquídeas nativas que aquí crecían, pertenecientes al género *Chloraea*, se adaptaron con rapidez a los cambios en el paisaje, aumentando significativamente las poblaciones que crecieron en el sotobosque de las plantaciones artificiales de coníferas, sin embargo este aumento poblacional sólo es posible observarlo en el predio referido, debido posiblemente a que la masa boscosa ha sido sometida a un raleo selectivo con poda en altura. Un factor importante es un suelo cubierto por mantillo de acículas.

Las poblaciones naturales o que existían en sectores que están siendo reforestados son las más disminuidas, no sólo por efecto del manejo del bosque, además se ven directamente afectadas por herbicidas aplicados en las etapas iniciales de una plantación forestal, como por la disminución de su polinizante natural, al combatir masivamente a la polilla del brote (*Rhyacionia buoliana*) con insecticidas no selectivos.

En el predio se realiza control biológico, a través de la avispa (*Orgilus obscurator*)

3.2. Cumplimiento de los objetivos del Proyecto

Se recolectaron plantas de los lugares donde crecen naturalmente, se establecieron tres ambientes de cultivo (aire libre, sombreadero, invernadero) en Yumbel y Quillota. Se seleccionaron tres tipos de plantas: plántulas de un año, juveniles de 2-3 años y adultas que ya estaban en etapa reproductiva, en ellas se midió el crecimiento, se describieron patrones fenológicos y productivos, se establecieron relaciones entre diversos crecimientos. Llegando a definir un patrón de comportamiento para la especie.

Los resultados indican que la especie posee un rizoma perenne, tiene un período juvenil de cinco años como mínimo, en estado adulto forma entre 8 y 12 hojas, la floración se extiende desde octubre (Quillota) a diciembre (Yumbel) la inflorescencia corresponde a una espiga que alcanza entre 80 y 120 cm de altura, desarrolla 11 y 15 flores individuales. Las flores individuales o como espiga tienen una duración en florero máxima de 28 días, las varas son rectas y de 1 a 2 cm de grosor. La floración se presenta cada dos temporadas, sin embargo este patrón de comportamiento pudo ser variado con aplicaciones de fertilizantes al menos en un porcentaje de la población.

Mediante ensayos se logró establecer un plan de cultivo comercial en macetas y en suelo directo, con manejo de fertilización al suelo, foliar y riego adecuados para establecer patrones de crecimientos en diferentes sustratos. La estrategia de inicio se basó en igualar al máximo, en condiciones de cultivo, el hábitat natural donde han crecido desde siempre.

Se realizó análisis de ADN para identificar bandeos asociados a aspectos relevantes de las flores como por ejemplo color y forma

Paralelamente se comenzaron a estudiar y aislar las micorrizas, hongos específicos, con los cuales viven asociadas. En la Universidad de Concepción fue posible aislar un abanico de cepas de hongos micorrízicos. Además se realizó con éxito la inoculación de plantas provenientes de cultivo *in vitro* y de semillas.

Por último y aún cuando no se había establecido como objetivo inicialmente se inició el programa de cruzamientos dirigidos.

Se puede decir entonces que los objetivos de domesticar la especie y de acumular información agronómica que nos lleve a un cultivo comercial fueron ampliamente cumplidos

3.2.1. Descripción breve de los impactos obtenidos.

El primer impacto de este proyecto es haber logrado domesticar un grupo de plantas, y haber avanzado en el conocimiento de su fenología, hábito de floración, sistemas de propagación y producción de semilla

Un segundo impacto corresponde a haber identificado micorrizas asociadas al desarrollo de la especie y tener identificada la de mayor incidencia en el período inicial del cultivo. De igual manera y aun cuando es preliminar, se observa que la micorriza clasificada como NM3 pareciera tener un fuerte antagonismo con hongos causantes de infecciones en medios de cultivos agar avena, pudiera ser importante en germinación de mas especies.

Haber desarrollado la técnica de formación de protocormos *in vitro* y en agar avena, y haber logrado el establecimiento de plantas micorrizadas provenientes de cultivo *in vitro* y de semillas.

Se definió la existencia de dos especies más en el predio: la *Chloraea galeata* la única que exhala una fragancia comparable a la vainilla, y una enana, *Chloraea multiflora* de un delicado color blanco.

También se identificaron los agentes patógenos más comunes que logran dañarlas.

Sin duda, el impacto más importante del proyecto es haber obtenido semilla por polinización dirigida, tanto de las plantas bajo estudio, como las plantas "plus" que florecen en la naturaleza, el proceso fue altamente exitoso, por esta vía, se obtuvo semilla incluso en Quillota. Toda flor polinizada, cuajó y dio semillas. Por primera vez se obtuvieron semillas cuyos padres tenían características genéticas relevantes, iniciando así el programa de mejora genética de la especie, que nos abre las puertas para cultivarlas en forma industrial, que es uno de los objetivos del proyecto.

Las técnicas de reproducción en laboratorio no solo permitirá reproducirlas masivamente sino que también será posible rescatar algunas especies que están al borde de la extinción. Esto ya ha sucedido en algunos países ha sido tan enorme la cantidad de especies de orquídeas reproducidas artificialmente que han sobrepasado con creces el número de plantas que viven en la naturaleza. Nosotros debemos preocuparnos más por este insustituible material genético, que lamentablemente sufre una merma poblacional acelerada. Un paso para aminorar este deterioro es fundar una Sociedad

Chilena de Orquideología a fin de divulgar el máximo de información que logremos captar durante este proyecto.

Sin lugar a dudas, pese que aún persisten una serie de interrogantes por aclarar, este proyecto está ayudando, no solo a dar a conocer nuestras orquídeas chilenas, sino que esta empezando a lograr reinsertarlas en nuestra vida cotidiana.

La respuesta a la información periodística, tanto a la prensa escrita como televisiva ha sido altamente motivadora. Estamos ciertos que la brecha que nos separa para lograr los objetivos propuestos, es cada día más estrecha.

Por otro lado nuestro país tiene grandes posibilidades de competir con otros países americanos como Ecuador y Colombia, en la exportación de flores. Nuestras ventajas comparativas son elocuentes. No solo nuestro suelo y clima se prestan admirablemente bien para emerger con fuerza como país exportador de flores bulbosas, sino que también nuestra estabilidad democrática y tratados internacionales suscritos últimamente, facilita y agiliza las negociaciones. Hacia allá van puestas nuestras miradas.

3.3. Aspectos metodológicos del proyecto

3.3.1. Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados

Ubicación de los ensayos

La investigación se realizó en el Predio los Ríos de Yahuillo, Yumbel, VIII región, en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Talca, VI región, en el Laboratorio de Micorrizas de la Universidad de Concepción VIII región y en los Laboratorios de Fitopatología y Flores de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso Quillota, V región, Chile.

La metodología se presentará por separado para cada ensayo

3.3.1.1 Evaluación de la fenología y crecimiento de las poblaciones de *Chloraea*.

El material utilizado correspondió a rizomas de orquídeas, del género *Chloraea*, Dichos rizomas fueron recolectados del predio perteneciente a Don Enrique Matthei, ubicado en la comuna de Los Ángeles, provincia del Bio-Bio, VIII Región de Chile.

Se hicieron dos colectas de material, en las que participaron el propietario del predio y el botánico asesor del proyecto.

Traslado a Quillota la primera etapa se realizó el 6 de enero de 1999, en la cual se obtuvieron 12 rizomas, los que fueron transportados desde su hábitat natural hasta el lugar de realización del ensayo vía aérea. La segunda recolección se realizó el 26 de enero de 1999, obteniéndose 49 rizomas, siendo transportados vía terrestre hacia el lugar del ensayo.

En ambas recolecciones, los rizomas obtenidos fueron recolectados con tierra vegetal adherida a ellos, para tratar de mantener la relación simbiótica que poseen con hongos (micorrizas).

Condiciones experimentales: Los rizomas recolectados fueron transplantados a maceteros plásticos de 2,95 l y bolsas de PVC de igual volumen, teniendo como sustrato, además de la tierra vegetal, turba, corteza de pino y arena en relación 1:1:1, asemejando las condiciones de acidez, característica del suelo donde se desarrollan, además de permitir un buen drenaje y aireación a las raíces.

Posteriormente, se ubicaron en un sombreadero, compuesto por una estructura de madera recubierta por una malla rushell de 80% de sombreadamiento, lo que permitió dar condiciones de menor

luminosidad, menor temperatura y mayor humedad, creando un ambiente más acorde con la zona de colecta, donde se desarrollan naturalmente.

El riego de las plantas se realizó cada 7-10 días, según las condiciones de humedad constatadas en las macetas. Dicho riego se suspendió en caso de presentarse precipitaciones. Luego, en los meses de mayor temperatura ambiental (septiembre en adelante) y especialmente durante floración, se aumentó la frecuencia de riego a 5 días, esto también sujeto a la humedad existente en el sustrato de las macetas. El riego se realizó hasta el comienzo del receso de cada planta.

En cuanto a la fertilización de las plantas, se aplicó N-P-K 20:10:10, el 25 de agosto de 1999, en dosis de 20 cc. de solución por planta (2g/l).

El ensayo consistió principalmente en medir el crecimiento a cada una de las plantas y lograr observaciones que permitieran obtener una descripción del ciclo fenológico de la especie. Para ello se realizaron mediciones periódicas, cada 7 días, para evaluar las variables: hojas, área foliar, altura de plantas, brotación lateral, flores, rizomas,

Estas mediciones se realizaron desde el 5 de mayo de 1999 hasta el 15 de enero del 2000, abarcando el periodo comprendido entre brotación de los rizomas y receso de las plantas.

Para la obtención del área foliar de la roseta, se tomaron medidas del diámetro de la roseta en desarrollo a todas las plantas del ensayo, utilizando para ello un pie de metro, con lo cual se pudo obtener un promedio del diámetro, estimando de esa forma dicha variable.

En cuanto a la medición de la altura de planta, ésta se realizó utilizando una regla o una huincha de medir cuando alcanzó mayor altura. Esta medición se realizó desde la superficie del sustrato de la maceta.

Tanto el número de hojas, como la brotación lateral fueron medidos en forma manual.

En aquellas plantas que florecieron (4), se realizaron, además, evaluaciones de las variables: hojas, botón apenas perceptible, apertura de la primera flor, período entre la primera y última flor, inflorescencias por plantas, flores por inflorescencia, altura de la vara floral, inicio de senescencia

Además de las observaciones pertinentes al proceso de floración. Se realizaron mediciones a las condiciones finales del estado y desarrollo de los rizomas, evaluando las variables: Raíces engrosadas del rizoma, diámetro de cada raíz, largo de cada raíz y peso total del rizoma

Segundo año y posteriores de evaluaciones fenológicas

El material utilizado correspondió a rizomas de orquídeas de la especie *Chloraea crispa*. Se trabajó con dos poblaciones de plantas, de diferentes edades en condiciones experimentales.

Una de las poblaciones se denominó, población de segunda temporada en estudio, la que se constituyó por 65 rizomas de la especie *Chloraea crispa*, correspondientes al mismo material empleado en el ensayo de 1999. El presente ensayo se enfocó en esta población, al ser fundamental para el conocimiento de esta especie, el comportamiento de las plantas en una segunda temporada en condiciones experimentales de cultivo.

La otra población, se denominó población de primera temporada en estudio, la cuál se constituyó por 25 rizomas de la especie *Chloraea crispa*. Estos rizomas fueron recolectados del predio perteneciente a Don Enrique Matthei, ubicado en la comuna de Los Ángeles, provincia del Bio-Bio, VIII región de Chile. Fueron transportados desde su hábitat natural hasta el lugar donde se realizó el ensayo, el 25 de mayo del 2000.

En la primera etapa, los rizomas pertenecientes a la población de segunda temporada en estudio, fueron transplantados a bolsas de PVC de 4,5 l de volumen, teniendo como sustrato, tierra vegetal de su hábitat adherida a ellos y una mezcla de arena y corteza de pino en una relación de 1:1, asemejando la condición de acidez característica del suelo donde se desarrollan en forma natural.

Luego fueron trasladados al sombreadero, bajo un régimen térmico y lumínico sin alterar. Cabe mencionar que los rizomas que presentaron brotación lateral durante el ensayo de 1999, generando dos o más rizomas independientes, se transplantaron en forma individual en cada bolsa.

Siguiendo con el ensayo, el 29 de marzo del 2000, se trasladó al sombreadero un grupo de seis rizomas ubicados en una cámara bioclimática durante el ensayo de 1999. En la cámara bioclimática habían sido expuestos a ciclos de luz para evaluar efecto del fotoperíodo en la especie. Estos ejemplares fueron elegidos al azar el 20 de octubre de 1999, permaneciendo durante la temporada pasada, en la cámara bioclimática en condiciones de 16 horas luz, temperatura diurna de 15°C y temperatura nocturna de 12°C.

Éstos se reemplazaron por seis rizomas, cuatro elegidos al azar y dos de los cuales habrían presentado estado floral en el ensayo de 1999. Se ubicaron en la cámara bioclimática, donde se les proporcionó un tratamiento de fotoperíodo (día largo de 16 horas luz) y un tratamiento térmico, con un diferencial de 5°C entre el día y la noche (temperatura diurna de 15°C y temperatura nocturna de 10°C).

En la segunda etapa del ensayo, se transplantaron los 25 rizomas de la especie *Chloreaa crista*, correspondientes a la población de primera temporada en estudio, a maceteros de plástico de 2,95 l de volumen, con el mismo sustrato nombrado anteriormente. Fueron transplantados el 25 de mayo y luego trasladados al sombreadero para observar su desarrollo.

Con respecto al riego, se realizó a través de una manguera ubicada a un costado del sombreadero. La frecuencia de riego fue cada 7-12 días según la humedad que presentaba el sustrato, suspendiéndose durante las sucesivas precipitaciones que se presentaron en los meses de junio y septiembre. Esta frecuencia aumentó a 4 - 5 días en los meses de mayor temperatura. Por su parte, las plantas ubicadas en la cámara bioclimática se regaron con una regadera cada siete días.

Los cuidados sanitarios se realizaron en forma preventiva y curativa a lo largo del ensayo. Como se muestra en el Cuadro 1, para combatir la presencia de *Botrytis cinerea*, el producto se aplicó a todas las plantas, utilizando un rociador manual de 500 cc, además de exponer al sol y ventilar frecuentemente, las plantas con síntomas, tratando de disminuir la carga de producto químico en ellas. Para combatir babosas y caracoles, se utilizó cebo en pellets, se aplicó en forma manual alrededor de los maceteros plásticos y bolsas de PVC.

CUADRO 1 Manejo de pesticidas en las plantas en Quillota año 1999

Agente causal	Producto químico	Ingrediente activo	Dosis	Fecha de aplicación
Caracoles y babosas	TOXIMOL	metaldehído	5g/10m ²	5 mayo 2000
Caracoles y babosas	TOXIMOL	metaldehído	5g/10m ²	29 junio 2000
Caracoles y babosas	TOXIMOL	metaldehído	5g/10m ²	5 julio 2000
<i>Botrytis cinerea</i>	ROVRAL	iprodione	0.8 g/l	10 mayo 2000
<i>Botrytis cinerea</i>	ROVRAL	iprodione	0.8 g/l	5 julio 2000

Finalmente, se realizó una fertilización a todas las plantas, el 22 de noviembre del 2000, utilizando el producto Polyfeed en dosis de 3 g/planta diluido en agua, se aplicó con un rociador manual de 500 cc.

Características ambientales: Para analizar el efecto de las condiciones ambientales del ensayo sobre las plantas, se llevaron registros de temperatura y luminosidad en forma semanal. Para el registro de temperaturas se eligieron tres horarios diferentes de medición a lo largo del día (9:00, 12:00 y 17:00 hrs), además de la máxima y mínima del día. Se utilizó un termómetro de máximas y mínimas el cuál se ubicó al interior del sombreadero.

VARIABLES EN ESTUDIO: Para evaluar el ciclo fenológico de las plantas de primera y segunda temporada de cultivo, se realizaron mediciones cada siete días, las que comenzaron el 23 de marzo del 2000 y finalizaron el 3 de enero del 2001.

Las evaluaciones fueron las mismas de la temporada anterior, además se evaluó en tres plantas, la duración de la vara floral completa en florero, con agua a temperatura ambiente, contando los días que transcurrieron entre que se cortó la vara floral, hasta que comenzó su marchites. Así también, se evaluaron botones en diferentes estadios y flores individuales, en florero con agua a temperatura ambiente, se contaron los días transcurridos entre que se cortaron los botones hasta que comenzó la marchites de cada uno. También se evaluó el tiempo que transcurrió en el paso de los diferentes estadios, presentados por los botones, hasta flor abierta.

Análisis estadístico: dentro del presente ensayo se realizaron principalmente análisis de correlación simple entre los datos obtenidos (Cuadro 2).

CUADRO 2. Variables utilizadas en los análisis de correlación simple.

Variable (x)	Variables (y)
Peso de rizoma inicial (g)	Número de hojas
Área de rizoma inicial (cm ²)	Diámetro de la roseta basal (cm ²)
	Altura vara floral (cm)
	Número de botones florales
	Rango de floración (días)
Número de hojas formadas	Peso de rizoma final (g)

	Área de rizoma final (cm ²)
	Altura vara floral (cm)
	Número de botones florales
	Rango de floración (días)
Diámetro de roseta basal (cm ²)	Altura vara floral (cm)
	Número de botones florales
	Rango de floración (días)
Diámetro de vara floral (cm)	Número de botones florales
	Rango de floración (días)
	Índice de área de cada flor (cm ²)
Altura de vara floral (cm)	Número de botones florales
	Rango de floración (días)
Número de flores totales	Número de flores abiertas simultáneamente
	Rango de floración (días)

3.3.1.2 Evaluación de las condiciones agroclimáticas y de plantas creciendo en Yumbel (invernadero, aire libre y bajo malla rushell)

En la primavera del año 2000 se hizo un catastro de las flores más llamativas, altas y hermosas que fueron marcadas en terreno, e incorporadas a un plano, a fin de no perderlas ni confundirlas cuando entraran en el letargo estival.

Para entrar en la categoría de plantas seleccionadas debían tener una vara portaflores larga y esbelta, una inflorescencia con más de quince flores, llamativas y atractivas a primera vista.

Para evaluar el crecimiento de las plantas, se realizó un estudio en diferentes sustratos en función de los diferenciales de crecimientos en *Chloraea crispa*, medidos en 6 fechas, a partir de mayo del 2001.

Se evaluaron 18 tratamientos de sustratos, en 3 grupos ontogénicos, 2 dispuestos en maceteros (plantas adultas y juveniles) y un grupo dispuesto en suelo directamente (plantas adultas).

La separación en grupos ontogénicos es para propósitos de análisis de datos, ya que las plantas ontogénicamente son todas diferentes, porque provienen de la naturaleza.

Se tomaron 5 muestras por tratamientos (plantas), de las cuales se midió largo de hojas (LH) y se obtuvo los diferenciales de crecimiento en función de la siguiente fórmula $(m_2 - m_1) / m_1$, donde m , corresponde a las mediciones. Posteriormente se evaluó estadísticamente el crecimiento de las plantas en función del largo de hoja, para 6 tratamientos de plantas adultas.

Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza de una vía, considerando un 5% de error. La separación de medias se realizó mediante el test de Tukey (5%).

Cuadro 3 Tratamientos de sustratos y tipos de plantas realizados en Yumbel

Tratamientos	Códigos	Sustratos *
1	M1Aa	S100
2	M1Ba	Ma80+A20
3	M1Cj	M65+AR30+5C
4	M1Dj	M50+AR50
5	M1Ea	M50+AR50
6	M1Fj	M80+C20
7	M1Ga	AR80+C20
8	M2Ba	AR100
9	M2Ca	AR100
10	M2Da	S100
11	M2Ej	AR100
12	M2Fj	M50+C50
13	S-1	M+C
14	S-2	M
15	S-3	TMG
16	S-4	C
17	Sma	Aire libre
18	Sma- malla	Bajo malla

* los números de los diferentes sustratos están en %

Abreviaturas usadas:

M:maceteros

A:adultas

J:juveniles

Ma:mantillo

A:arena

C:corteza de pino

G:guano

S:suelo

TMG: turba magallánica

3.3.1.2.1. Evaluación de luminosidad

El grupo de las orquídeas en su mayoría necesitan menos luz que pleno sol para su óptimo crecimiento y generalmente el pleno sol causa la destrucción o daño a su sistema de crecimiento. Por eso al encontrar individuos de *Chloraea crispa* a pleno sol fue sorprendente. Durante los primeros 2,5 años del proyecto se observó que las plantas desarrolladas bajo condiciones de pleno sol, las plantas siempre tenían las hojas amarillas, más gruesas, más cortas y con manchas de color café en comparación con las del bosque. Todas estas características están relacionadas en orquídeas con exceso de luminosidad, según los expertos en orquídeas. En otro escenario, bajo el dosel del bosque de pino, las hojas de las plantas son casi del doble de largo, un color más verde, menos puntos café en las hojas y casi inexistencia de bordes amarillos.

Durante este tiempo, se juntó datos sobre otros tipos de orquídeas con indicaciones en relación con la iluminación en su producción, indicando los niveles de baja a media luminosidad entre 600 a 4.500 lúmenes. Sólo en algunos casos es indicado utilizar alta luminosidad, por ejemplo algunas orquídeas que pueden crecer vegetativamente muy bien con poca iluminación, pero tienen problemas con la floración en relación con su época y duración y tiene que aumentar el nivel de luminosidad para la

floración óptima. Mientras la mayoría requiere baja a media iluminación para obtener las mejores flores como indicado en Cuadro 4

CUADRO 4 RANGOS OPTIMOS DE ILUMINACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ALGUNAS ORQUÍDEAS EXPRESADA EN FOOTCANDLES (fc)

Brassavola	2,000 to 4,000 fc	Masdevallia	1,000 to 2,500 fc
Brassia	2,000 to 3,500 fc	Miltonia	1,000 to 3,000 fc
Cattleya	2,000 to 3,500 fc	Odontoglossum	1,000 to 2,500 fc
Cymbidium	2,000 to 4,000 fc	Oncidium	2,000 to 4,000 fc
(standard type)		Paphiopedilum	2,000 to 3,000 fc
Cymbidium	1,000 to 3,500 fc	(green leaf and mottled leaf type)	
(miniature type)		Phalaenopsis	1,000 to 1,500 fc
Dendrobium	1,500 to 4,000 fc	Phragmipedium	2,500 to 3,500 fc
Epidendrum	1,500 to 3,500 fc	Sophronitis	1,500 to 3,000 fc
Laelia	2,000 to 3,500 fc	Vandas	2,500 to 4,000 fc
Ludisia	1,000 to 2,000 fc		

fuentes: www.odoms.com/cattleya7.htm

Para mostrar la importancia del nivel correcto de luz, existe un estudio donde una especie de orquídea desde el estado "in vitro" hasta su floración demoró entre 3,5 a 5 años. Utilizando un nivel óptimo de iluminación se produjo el mismo proceso entre 1 y 1,5 años. Si la aplicación de esta tecnología en nuestra especie tiene un resultado similar al caso citado, significa una reducción en el costo de cerca 40% para el inversionista como resultado de la velocidad de su desarrollo, sin tomar en cuenta una mayor calidad de flor y el precio asociado. Al mismo tiempo, como el costo de instalar y manejar la luz afecta fuertemente la economía del proyecto y esta se relaciona también con la calidad y cantidad de flores, calidad de las plantas y control de plagas, se registró los datos sobre la luz en los lugares que habitaba *Chloraea crispata* durante el último año del proyecto, para verificar la inversión de control de la luz durante la producción.

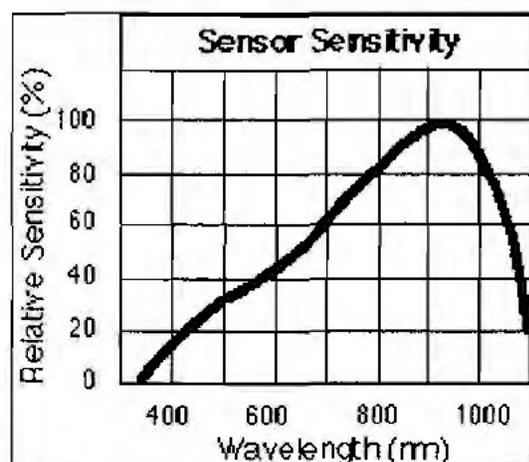


FIGURA 1 La sensibilidad relativa de registrar ondas de luz del HOB0

Como fue limitado el tipo de instrumento de utilizar por la falta de presupuesto, se compró un instrumento que solamente mide una iluminación que representa en 30% la PAR (ver ilustración 1) y no la radiación activa de fotosíntesis (PAR) total directamente con el HOB0 "light intensity logger".

Además se localizó dentro una caja protector de plástico para protegerlo contra los elementos meteorológicos que afectan su sensibilidad a la iluminación. Este sensor permite estimar la iluminación relativa bajo el dosel del bosque y a pleno sol. Con lo cual se permite obtener:

1. El rango de la cantidad de luz donde está ubicado el óptimo.
2. El tiempo de la duración de las noches durante para la floración.
3. Ayuda estimar el punto de compensación de luz.
4. La relación entre los puntos fisiológicos y las diferentes cantidades de luminosidad donde crece la orquídea.

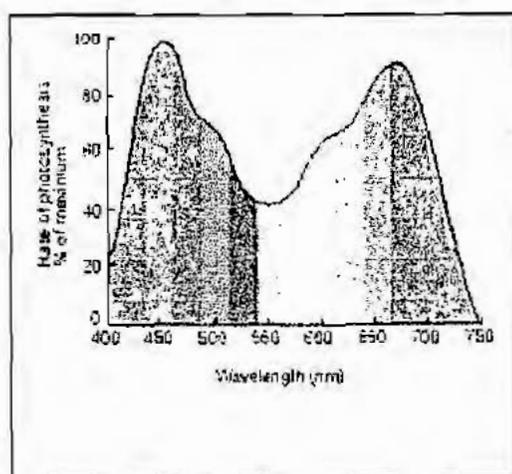


Figura 2: Rango de ondas de luz utilizado por plantas y su eficiencia en respecto a la fotosíntesis

Este instrumento entrega datos en unidades de lumen pie^{-2} de los rangos de luz entre 350nm a 1100nm lo cual no es en unidades de PAR. (ver FIGURA 2) Se debe recordar que bajo condiciones del bosque estos instrumento no miden con la misma precisión que a pleno sol. Los datos nos entregarán una cantidad de PAR mayor, que la recibida realmente. Esto es porque el bosque, por la filtración de las hojas, entrega una mayor cantidad de luz verde que mide el instrumento pero no es útil para la planta.

La luz más importante bajo el dosel, según investigadores es cuando hay más de 400 lm pie^{-2} ó en nuestro caso después de las 14:00. La justificación de hacer este supuesto está basada en determinar si el análisis puede indicar la existencia de una relación entre la variación de luz y no la cantidad real, según los eventos fisiológicos. La variación natural de las intensidades hace casi imposible de medir con exactitud el punto óptimo para la orquídea.

La otra variable que se debe tomar en cuenta es que el punto de compensación de luz no es conocido en nuestras especies (se tratará la planta como C4). Esto indica que tiene un punto de compensación fotosíntesis (PCF) alta, entonces se fijó el PCF en 500 lúmenes pie^{-2} a pleno sol y 400 lúmenes pie^{-2}

bajo el dosel del bosque¹, tomando en cuenta que el PCF puede reducirse algo cuando las hojas están formadas en condiciones con menos luminosidad. Para todas las comparaciones se utilizó estos dos puntos de PCF.

Los instrumentos fueron sacados del terreno durante el invierno, por razón de seguridad frente a la presencia de recolectores de setas. Se presenta los datos tomados cada hora en la forma gráfico, para que sea más fácil percibir las tendencias y compararlas con los puntos de interés fisiológicos. Las ilustraciones también tienen indicados los puntos fisiológicos más importantes como la brotación de las raíces. La idea es tratar de ver una relación entre la iluminación en la brotación de las raíces y hojas.

3.3.1.2.2 Evaluación de temperatura

El objetivo principal para estudiar la temperatura donde crece la orquídea *Chloraea crispa* es utilizar esta información en:

- a) la germinación
- b) la estimulación de la floración
- c) el crecimiento vegetativo
- d) daño a yemas
- e) Cantidad de carbohidratos producidos.
- f) Crecimiento nocturno.
- g) Calcula de la susceptibilidad a ataques a hongos y bacterias

Generalmente se clasifica las orquídeas en los siguientes grupos basados en la temperatura y la luz:

-“Cool”. (temperaturas frescas) La orquídea de esta agrupación fácilmente puede tolerar temperaturas alrededor de las 10°C y a veces 4°C.

-Intermedio. Crece en temperaturas durante las 24 horas entre 18°C a 29°C

-Tibias. Prefieren temperaturas durante la noche de sobre 21°C.

Para encajar nuestra especie en esta escena podemos analizar los registros históricos de agro climas cercanos. El fundo LOS RIOS DE YAHUILO ubicado 6 kilómetros al sur de la estación ferrocarril de Yumbel a la latitud 37° Sur. La estación más cercana con clima histórica es en Chillán ubicado 55km norte en el mismo argo clima según INIA. Chillán presenta el agro clima, que corresponde a un clima mediterráneo templado. Su régimen térmico se caracteriza por una temperatura media anual de 14°C, con una máxima media en el mes más cálido de 26°C y con una mínima media en el mes más frío de 4,1°C. El período libre de heladas es de 5 meses, de noviembre a marzo. El régimen hídrico se caracteriza por una precipitación anual de 1025 mm, con una estación seca de 4 meses entre diciembre y marzo. La sumatoria de temperaturas base 10°C es de 1600 días-grado, y 3300 en base 5°C (Guerrero, 1996).

La importancia de clasificar que tipo de orquídea es *Chloraea crispa* según el clima es que nos ayudará a determinar los cambios de temperatura que necesitamos para su producción en el invernadero, y en que lugares agroclimáticamente similares podemos producirlas. También nos ayuda

a comparar nuestras especies con otras, y podemos captar avances y evaluar la importancia de estas, en así, adelantar su producción en menos tiempo y con mejor calidad.

Los datos de la temperatura se registraron mediante data logger "HOBO Pro Series" donde los sensores mediaron la temperatura y humedad del aire donde crecían las hojas (10cm sobre el nivel del suelo) y la temperatura que representa la zona de los rizomas (-10cm bajo el nivel del suelo), para crear datos útiles de aplicar en la evaluación de la brotación, floración y crecimiento. También esta información puede indicar los límites extremos que destruye la orquídea.

Es importante recordar que requiere un mínimo de 5 años de datos de temperatura para concluir con un grado de certeza como interactúa la temperatura sobre el crecimiento de la *Chloraea*.

3.3.1.2.3. Análisis de las propiedades físicas del suelo

Para determinar las propiedades físicas del suelo donde se desarrollan naturalmente poblaciones de *Chloraea crispa*, se tomaron muestras de suelos de diferentes zonas del predio (alrededor de 3 Kgs) para posteriormente ser analizadas en el Laboratorio de suelo de la Facultad de Agronomía PUCV. Con los datos obtenidos se elaboró la curva característica de humedad.

3.3.1.3. Ensayos de fertilización

Debido al problema encontrado en la floración de *Chloraea crispa*, que consiste en su floración bianual, se trata de solucionar este problema mediante la entrega exógena de nutrientes para evitar una excesiva pérdida de peso, por parte del rizoma al momento de la floración.

Una evaluación preliminar fue realizada en el año 2000 por TRONCOSO (2000), donde se hizo uso de fertilizantes como el ácido fosfórico al 80%, urea, sulfato de potasio granulado y un fertilizante que aporta micronutrientes: Fertilón-Combi2.

Las plantas usadas para ese propósito, provenían de un ensayo anterior donde se evaluó la floración de éstas. Por lo tanto, TRONCOSO separó la población en estudio en plantas florales (temporada 2000) y plantas no florales, donde cada grupo fue dividido en dos, obteniendo en cada caso plantas con y sin fertilización.

Los resultados obtenidos por TRONCOSO (2000), indican que los efectos de una solución fertilizante, compuesta por los macronutrientes esenciales (N, P, K) enriquecida de una formulación de micronutrientes, no son significativos, a excepción de su efecto sobre el peso promedio final del rizoma, independientemente si estos eran florales o no florales en la temporada 2000.

De acuerdo a un registro mantenido de las investigaciones anteriores, las plantas fueron divididas en florales o no florales con o sin fertilización, en forma equitativa en cada nuevo tratamiento de fertilización, que totalizan cuatro.

La distribución del material a usar fue realizada completamente al azar, destinando un número igual de cada maceta en los tratamientos.

Tratamiento 1 Fertilización foliar: La frecuencia de fertilización fue cada 7 días, donde la aplicación fue realizada mediante un rociador manual de 600 cc, buscando un mojamiento homogéneo en todo el follaje. Se estimó una aplicación de 30 cc por planta debido al pequeño tamaño del contenedor.

La primera fertilización fue realizada el 9 de agosto del 2001, completando doce aplicaciones.

Tratamiento 2 Sin fertilizar

Esta misma distribución de las plantas fue usada en la temporada 2001 para permitir realizar un seguimiento e historial del material vegetal. El ensayo consiste en la aplicación de cuatro tratamientos.

Tratamientos aplicados el año 2001

Tratamiento 1 Aplicación de BIOPLASMA, que se define como un fertilizante activo porque es una suspensión biológica de microalgas en un medio líquido, constituyendo un "plasma nutricional". En su forma no diluida, es una solución fotoquímica concentrada de minerales y de componentes del suelo. La producción de BIOPLASMA implica la colocación de compuestos minerales inorgánicos en un tanque llenado de agua. El tanque entonces se siembra, en la temperatura del agua específica y bajo régimen ligero determinado, con el inoculador de las algas naturalmente y de otros microbios con capacidades fotosintéticas, donde a través de este proceso, aumenta la concentración de microorganismos (ECOINSUMOS, 2001).

La decisión de su uso se basó en su desconocimiento en cuanto a su efectividad además de su formulación biológica que no tiene efecto contrario sobre la planta o el sustrato. Además, su formulación líquida es de práctica manipulación. Su aplicación fue realizada al follaje y al suelo.

Tratamiento 2 El segundo tratamiento es una mezcla de fertilizante foliar utilizado en Phalaenopsis (Orchidaceae), donde se han observado muy buenos resultados relacionados con la floración. Esta mezcla, en Phalaenopsis, ha demostrado aumentar el número de flores por vástago floral además de prolongar la duración de postcosecha de la flor

3.3.1.4. Evaluaciones hechas en postcosecha: duración de las inflorescencias de *Chloraea crispata* material traído desde Yumbel a Quillota

Se cosecharon un total de 27 inflorescencias en 3 estados de desarrollo diferentes (cuadro1), provenientes de plantas cultivadas bajo invernadero ubicados en Yumbel, VIII región (predio de E. Matthei). Las inflorescencias cortadas fueron envasadas y transportadas hasta el lugar de estudio (La Palma, V región), para posteriormente ser enumeradas y dispuestas según los diferentes tratamientos de post-cosecha.

Cuadro 5. Características de las inflorescencias.

Estado de desarrollo	Nº inflorescencias	Características
E ₁	9	Inflorescencia compacta, raquis comprimido y botón floral verde cubierto completamente por una bráctea membranácea
E ₂	9	Inflorescencia compacta, raquis comenzando a elongar y botón floral blanco plano cubierto por una bráctea verde-blanquecina.
E ₃	9	Inflorescencia laxa, raquis elongado en la parte basal y botón blanco globoso-una flor abierta.

Se definieron 3 tratamientos de post cosecha (cuadro 6), como posibles manejos a realizar después de cosechadas las inflorescencias.

Cuadro 6. Tratamientos de post-cosecha.

Tratamientos	Características
T ₀ (testigo)	Sin almacenaje, las inflorescencias se mantuvieron en una sala a temperatura ambiente (20-25° C) y humedad relativa entre 50-60%
T ₁	Las inflorescencias fueron almacenadas en cámara a temperatura de 7° C y humedad relativa entre 80-85%, durante 3 días.
T ₂	Las inflorescencias fueron almacenadas en cámara a temperatura de 7° C y humedad relativa entre 80-85%, durante 6 días.

Las inflorescencias en el tratamiento T₀ fueron colocadas directamente en frasco de vidrio con agua corriente cambiada cada 2 días.

En los tratamientos T₁ y T₂ las inflorescencias después del almacenaje fueron dispuestas igual que el tratamiento T₀.

Variables evaluadas: -N° de flores abiertas en cada tratamiento (simultaneidad de floración), N° de inflorescencias marchitas y curvadas, peso y largo de cada inflorescencia.

Análisis estadístico: los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza de 2 factores, con 3 niveles en cada uno ellos, considerando un 5% de error. Posteriormente en aquellos tratamientos significativos, se utilizó la prueba de tukey ($\alpha=0.05$) para comparar las medias. Se utilizó transformación arco seno para normalizar los datos de porcentaje de flores abiertas.

3.3.1. 5. Determinación de compatibilidad reproductiva de *Chloraea crispa*

Para determinar el sistema reproductivo y la presencia de autoincompatibilidad en esta especie, se tomaron inflorescencia de 12 individuos de *Chloraea crispa* que fueron cubiertos con bolsas de algodón antes de la antesis, para excluir la acción de agentes polinizadores. Se realizaron 4 tratamientos de polinización (cuadro 7)

Cuadro 7. Tratamientos de cruzamientos experimentales en *Chloraea crispa*.

Tratamientos	Manipulación
Xenogamia	Polinizadas manualmente con polen de otras de otros individuos
Geitonogamia	Polinizadas manualmente con polen de otras flores en la misma planta
Autogamia	Sin manipulación
Agamospermia	emasculación

Una vez terminadas las manipulaciones experimentales de las flores estas fueron cubiertas nuevamente para evitar cualquier efecto posterior de los polinizadores. De manera simultánea se marcaron 15 individuos para ser polinizados bajo condiciones naturales.

Se evaluó las diferencias en la producción de frutos en cada tratamiento.

La presencia de autoincompatibilidad fue estimada usando el índice de autoincompatibilidad (ISI) dividiendo el número de frutos/flor producidos por geitonogamia y el número de frutos/flor producidos por xenogamia. (Ruiz y Arroyo, 1978)

3.3.1.6. Cruzamientos (2001-2002)

Se marcaron los ejemplares que presentaron características relevantes como: largo de varas, número de flores, simultaneidad floral, disposición de las flores, ejemplares con colores puros y especialmente con colores intensos en la base de los nectarios (garganta). Una vez identificadas, las plantas al florecer se emascularon y se procedió a polinizar utilizando para ello polen de ejemplares elite (seleccionados anteriormente) y se marcaron los parentales con etiquetas, las cuales señalaban la fecha del cruzamiento y el código de los parentales.

Se efectuaron los siguientes tratamientos de polinización:

- Autopolinización dirigida
- Polinización cruzada (intraespecífica e interespecífica)

Se vigiló la formación de frutos y cuando estuvieron maduros, pero antes de la dehiscencia se cosecharon y se guardaron en bolsa de papel marcadas. Posteriormente se procedió a limpiar las cápsulas y retirar las semillas y almacenarlas en refrigerador a 4°C, hasta entregarlas a X. Calderón (una parte) o hasta siembra directa con inoculación de micorrizas en Quillota.

3.3.1.7. Reproducción sexual: germinación simbiótica

Material vegetal utilizado:

Origen: en los ensayos, se utilizaron semillas de *Chloraea crispa*, algunas provenientes de la localidad de Yumbel, VIII región obtenidas el año 2001 y otras provenientes de plantas cultivadas en la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso obtenidas el año 2002, V región.

Tratamientos de polinización manual se efectuaron para asegurar una alta cantidad de semillas, extraídas de las cápsulas alrededor de 60 días después de ocurrida la polinización, posteriormente fueron limpiadas y almacenadas en papel a 4 °C en un refrigerador (Mademsa modelo Premium 335) el año 2001.

3.3.1.7.1. Protocolo de desinfección de semillas

En esta etapa se desinfecto semillas de *Chloraea crispa* con diferentes dosis de hipoclorito de sodio, para luego realizar el test de tetrazolium y verificar la viabilidad de las semillas con las desinfecciones aplicadas.

A .Desinfección con hipoclorito de sodio:

Se pesaron lotes de semillas de *Chloraea crispa* (año 2001) de 5 mg, y luego se desinfectaron utilizando una solución de Hipoclorito de sodio al 5% y al 10 % por 1,2,3,4 y 5 minutos, a través del método del paquete. Luego las semillas fueron lavadas dos veces en agua desionizada estéril y posteriormente se colocaron en los mismos paquetes, por 24 en agua destilada para luego realizar el test de tetrazolium

Se realizaron diez tratamientos y tres repeticiones, como se indica en el CUADRO 8, más un control. (sin desinfección de las semillas)

CUADRO 8: Desinfección de semillas de *Chloraea*, con diferentes tiempos y dosis de hipoclorito de sodio, utilizando 5 mg (peso inicial) de semillas por tratamiento.

Tratamiento	Tiempo en minutos	[Na (OCl ₂)]
1	1	5%
2	2	5%
3	3	5%
4	4	5%
5	5	5%
6	1	10%
7	2	10%
8	3	10%
9	4	10%
10	5	10%

B. Test de tetrazolium:

Se realizo el test de Tetrazolium, para evaluar el éxito de la esterilización con Hipoclorito de sodio y su relación con la viabilidad de la semilla. Todo el test estuvo basado en el método utilizado por Van Waes (1986)

Preparación de la solución de tetrazolium:

En 80ml de agua destilada estéril, se disolvieron 0,8 g de Cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolium (TTC. El pH se ajustó a 7 con una solución de NaOH 0,1 M. La solución contenida en un vaso precipitado, se protegió de la luz con papel metálico.

Metodología:

Cada lote de semillas fue dispersado en tubos de 2 ml, que contenían 1 ml de la solución experimental. Luego fueron agitadas manualmente.

Los lotes de semillas testeadas, de 5 mg cada uno (peso inicial), se retiraron del papel filtro con una espátula y se colocaron en pequeñas botellas de 2 ml, con 1 ml de solución de Cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolium al 1%. Las botellas selladas con parafilm fueron colocadas durante 6 horas a 30°C ± 2°C en oscuridad.

1 ml de la solución de semillas con agua estéril fueron dispersadas sobre una placa (5 cm de diámetro) que contenía papel milimetrado diamante de (5 cm de diámetro) y fueron repartidas en forma homogénea en los cuadros para poder observarlas bajo una lupa estereoscópica.

Se realizó diez tratamientos y tres repeticiones por tratamiento, mas un control que no se desinfectó con hipoclorito de sodio.

Evaluación de los ensayos:

Se contó el número de semillas del 30 % de los cuadros (escogidos al azar) bajo una lupa estereoscópica. Las semillas fueron observadas y divididas en tres categorías de acuerdo al color de la testa y del embrión.

- (1) Testa café y embrión amarillo o blanco
- (2) Testa incolora y embrión amarillo o blanco
- (3) Testa incolora y embrión completamente coloreado (rojo, rosado o rosado oscuro).

Se calculó el porcentaje de embriones coloreados del nivel 3 con respecto al total de semillas testeadas.

3.3.1.7.2 Determinación del carácter micorrícico de un grupo de aislados

Este ensayo consistió en evaluar la especificidad de 6 hongos en el proceso de germinación simbiótica de semillas de *Chloraea crispa*. Para ello se realizaron tres ensayos sucesivos de siembra, uno con semillas de mijo y las otras con semillas de *Chloraea crispa*.

Los 6 hongos evaluados, fueron divididos en dos grupos según su origen:

- a) Hongos provenientes de orquídeas nativas aislados en la Universidad de Concepción:
 - Los hongos denominados Nm1, Nm2, Nm3 y Nm4, fueron obtenidos de una plántula de *Chloraea crispa* que medía aproximadamente 2 cm desde las hojas al ápice del rizoma.
 - El hongo denominado M2, obtenido de una planta adulta de *Chloraea gavilu*.
- b) Hongos provenientes de plantas cultivadas:
 - El hongo denominado 618, perteneciente al género *Rhizoctonia*, fue aislado de una planta adulta de *Lycopersicon esculentum*, en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Católica de Valparaíso.

3.3.1.7.3 Efecto de la inoculación con micorriza y desinfección de semillas

Lotes de semillas, de *Chloraea crispa* de $2\text{mg} \pm 0,1\text{mg}$ cada uno, fueron utilizados para realizar este ensayo. Debido a que las cápsulas que contenían las semillas del año 2002, tenían una gran cantidad de contaminación en su superficie, debieron realizarse pruebas de germinación in vitro, desinfectándolas en una solución de Hipoclorito de sodio al 2% por 3 minutos.

Para poder evaluar el efecto de la desinfección sobre la germinación, se realizaron 4 tratamientos de tres repeticiones cada uno:

Tratamiento 1: siembra de semillas desinfectadas sobre agar avena 0,25% inoculado con hongo (s) seleccionado(s).

Tratamiento 2: siembra de semillas desinfectadas sobre agar avena 0,25% no inoculado.

Tratamiento 3: siembra de semillas no desinfectadas sobre agar avena 0,25% inoculado con hongo (s) seleccionado(s).

Tratamiento 4: siembra de semillas no desinfectadas sobre agar avena 0,25% no inoculado.

Los hongos se evaluaron a partir de la presencia o ausencia de las etapas de germinación definidas por MITCHELL (1989) Se seleccionaron los hongos que cumplieron con las etapas de germinación 3 o 4.

3.3.1.7.4 Trasplante de plántulas de *Chloraea crispa* en sustrato

Una vez seleccionado el mejor tratamiento de desinfección y el hongo(s) apropiado, se procedió a:

- 1.- Preparar protocormos en medio inoculado
- 2 Esterilizar sustratos
- 3.- trasplantar plántulas de *Chloraea crispa* a contenedores cerrados

Sustratos utilizados y su esterilización:

Mezcla para maceta: se utilizó una mezcla de turba más perlita en una relación de 1:1 autoclavada durante 20 minutos.

Condiciones de crecimiento:

Los contenedores se cerraron herméticamente y se sellaron con parafilm, para luego ser guardados inicialmente en una incubadora modelo HERAEUS, por 2 semanas a 23 °C. Pasadas las 2 semanas fueron puestas a temperatura ambiente evaluada y regada con 1 ml de agua estéril por medio de una jeringa. Se evaluó el número de plantas sobrevivientes y que había pasado a la etapa autótrofa

3.3.1.7.5 Protocolo de conteo de semillas:

Para realizar el conteo de semillas se pesaron 1 mg \pm 0,1 mg en una balanza de precisión (Sartorius BP 210 S).

Sobre una placa de petri de 9 cm de diámetro se esparcieron homogéneamente las semillas pesadas. Bajo la placa se colocó un cuadrado de papel diamante milimetrado de 6 x 6 cm (numerado en forma horizontal del 1 al 6 y vertical de la A a la F) y bajo una lupa estereoscópica se contaron utilizando dos métodos de conteo:

- a) Se contaron las semillas del 28% de los cuadros escogidos al azar.
- b) Se contaron todas las semillas que se encontraban en la placa, contando cuadro, por cuadro.

Se realizaron tres repeticiones por método de conteo y se calculó un promedio de semillas por miligramo.

3.3.1.8 Propagación in vitro

3.3.1.8.1 Cultivo *in Vitro* de *Chloraea crispa* de semillas maduras e inmaduras.

Colecta y selección de material en campo

Producto de las dos primeras colectas de cápsulas maduras e inmaduras en Diciembre del 98 y Enero del 99, se inició el cultivo *in vitro* de *Chloraea crispa* de semillas maduras e inmaduras. En Febrero y Marzo del 99 se terminó la colecta de la temporada incluyendo yemas y rizomas.

Desarrollo de protocolos de micropropagación a partir de cápsulas maduras e inmaduras, rizomas y yemas

Desarrollo de protocolos de desinfección

El establecimiento en condiciones axénicas (estériles) presentó un alto índice de contaminación, principalmente con rizomas y con semillas provenientes de cápsulas maduras. Esto llevó a desarrollar diferentes métodos de esterilización para cada tipo de material.

Protocolo de esterilización de semillas inmaduras
 protocolo de esterilización de semillas maduras
 protocolo de esterilización de rizomas y yemas

Se ensayaron 6 métodos de esterilización superficial. Sin embargo persistió una intensa contaminación (100%) con hongos indicando que ninguno de ellos es efectivo para semillas maduras, rizomas y yemas. Los métodos fueron:

METODO 1. Cepillado suave de la planta con agua corriente; lavado en agua jabonosa por 10 minutos, sin agitación; corte de segmentos; cloro 15 % con tres tiempos de exposición : 5, 10 y 15 minutos, más Tween 20.

METODO 2: Cepillado suave de la planta con agua corriente; lavado en agua jabonosa por 15 minutos, con agitación; corte de segmentos; cloro 15 % con tres tiempos de exposición : 5, 10 y 15 minutos, más Tween 20.

METODO 3 Lavado y cepillado de las plantas con agua corriente; cepillado con agua jabonosa; corte de segmentos; lavado en agua jabonosa estéril por 10 minutos con agitación suave; etanol 70% por 30 segundos; cloro 25 % + Tween 20 por 10 minutos.

METODO 4 Lavado y cepillado de las plantas con agua corriente; cepillado con agua jabonosa; corte de segmentos; lavado en agua jabonosa estéril por 10 minutos con agitación suave; etanol 70% por 1 minuto; cloro 30 % + Tween 20 por 10 minutos.

METODO 5 Lavado y cepillado de las plantas con agua corriente; cepillado con agua jabonosa; corte de segmentos; lavado en agua jabonosa estéril por 10 minutos con agitación suave; etanol 75% por 30 segundos; cloro 25 % + Tween 20 por 10 minutos.

METODO 6 Lavado y cepillado de las plantas con agua corriente; cepillado con agua jabonosa; corte de segmentos; lavado en agua jabonosa estéril por 10 minutos con agitación suave; etanol 75% por 30 segundos; cloro 30 % + Tween 20 por 10 minutos.

Al realizar la siembra en medio de cultivo, a los 5 días aparecía una intensa contaminación que cubría los explantes e incluso profundizaba en el medio de cultivo. Los diferentes métodos de esterilización no lograron eliminar los patógenos.

En el laboratorio de Microbiología, se informó que los contaminantes correspondían a hongos, con certeza casi absoluta de origen exógeno. Sin embargo, si el proceso de desinfección es demasiado drástico se produce la muerte de los explantes. Al final del ensayo se realizó test de viabilidad con Trifeniltetrazolium., indicando que no todos los tratamientos dejan el tejido vivo. Esto es lo que ocurre al superar los 20 minutos de exposición en cloro comercial 10%.

Para identificar los hongos, se ensayó una serie de antimicóticos (ver lista anexa) disponibles en la laboratorio o prestados por otro laboratorio.

CUADRO 9 FUNGICIDAS EMPLEADOS

PRODUCTO	CANTIDAD
Kasumin	2 cc/L
AS - 17	2 g/L
Captan	5 g/L
Bravo	4 g/L
Dithane	2 g/L
Aliette	3 g/L
Longlife	200 cc/L
Mancozeb	2 g/L
Manzicarb	1 g/L
Acrobat	10 g/L
Metalaxil	20 g/L

Las cantidades utilizadas han sido de acuerdo a las instrucciones del producto.

Establecimiento *in vitro* de semillas provenientes de cápsulas inmaduras y maduras

Para esta etapa se disponía como referencia sólo publicaciones de especies epífitas. Concientes de la diferencia en ambiente y requerimientos, se modificó la composición nutricional del medio en la marcha de los experimentos.

3.3.1.8.2 Cultivo *in vitro*, en oscuridad con cápsulas inmaduras:

Con cápsulas inmaduras se ensayaron dos medios basales de cultivo solidificados con agar (Tabla 1). Las cápsulas fueron esterilizadas con cloro 30% con Tween 80 en agitación constante por 35 min, lavados 2-3 veces en agua, luego se subdividieron en tres rangos de tamaño (Tamaño pequeño: 2 cm x 5 mm; tamaño mediano: 2,5 cm x 8mm; tamaño grande: 3,0 cm x 1 cm). Las pequeñas todavía tenían la flor "viva"; las medianas y las grandes tenían la flor seca. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 22°C. Se hicieron 8 registros en un periodo total de 130 días.

Se utilizaron cápsulas inmaduras de dos condiciones:

1. Cápsulas recién colectadas se esterilizan y cultivan de inmediato. Se denominó "Cápsulas tipo A" a aquellas que se cultivaron en medio M1 con una viabilidad de 83%. Se denominó "Cápsulas tipo B" a aquellas cultivadas en medio VW con una viabilidad de 89,9%.
2. Cápsulas inmaduras almacenadas en frío a 4°C por un mes. Se les denominó "Cápsulas tipo C" con una viabilidad menor al 50% y cultivadas en medio M1.

CUADRO 10. Composición de nutrientes y concentración final por Litro de Medio Van Waes (VW) y medio M1

	Medio M1	Medio VAN WAES
MgSO ₄ □ 7H ₂ O	0,099 g	0,37 g
KH ₂ PO ₄	0,299 g	0,17 g
MnSO ₄ □ 4H ₂ O	25 mg	16,9 mg
ZnSO ₄ □ 7H ₂ O	10 mg	10,58 mg
CoCl ₂ □ 6H ₂ O	0,25 mg	0,025 mg
CuSO ₄ □ 5H ₂ O	0,025 mg	0,025 mg
Na ₂ MoO ₄ □ 2 H ₂ O	0,25 mg	0,25 mg
NaFeEDTA	36,71 mg	27,8 mg
NH ₄ NO ₃	—	1,65 g
CaCl ₂ □ □ □ □ □	—	0,44 g
KNO ₃	—	1,9 g
KI	—	0,83 mg
H ₃ BO ₃	—	6,2 mg
Inositol	0,99 g	—
Tiamina HCl	0,5 mg	1,1 mg
Ac. Nicotínico	5 mg	—
Piridoxina	0,5 mg	—
Ac. Fólico	0,5 mg	—
Biotina	0,05 mg	—
Glutamina	102,3 mg	—
Glicina	2 mg	—
Caseína Hidrolizada	500 mg	—
Sacarosa	20 g	30 g
ANA	—	1 mg
Cinetina	—	2 mg
BAP	0,2 mg	—
Pytagel	4 g	4 g
PH	6.0	5.7

3.3.1. 8.3 Uso de tratamientos hormonales en cultivo *in vitro*

Sobre medio Murashige y Skoog con vitaminas y solidificado con agar, se ensayó el efecto de diferentes fuentes hormonales de citoquininas (Bencil amino purina, BAP y 2 isopendenil alil amino purina, 2-iP a 25uM) combinadas separadamente con una auxina (Ácido Indol Butírico, IBA) a dos concentraciones (2,5 y 5 uM).

3.3.1.8.4. Cultivo en Medio líquido con agitación

Con el objeto de evaluar el efecto de ausencia de agar en el cambio de estado, se cultivaron protocormos en Estado dos en 30 ml de medio M1 (Tabla 1), con vitaminas, en medio líquido con agitación a 100 r.p.m. y 22°C. Se terminó el ensayo después de cinco meses.

3.3.1.8.5 Cultivo en Medio líquido con inmersión temporal

Siempre con el objeto de acelerar la respuesta morfogénica, se realiza un ensayo a pequeña escala como el indicado en la Fig 1. Este ensayo consiste en disponer los tejidos en un recipiente y el medio M1 líquido en otro. Diariamente se inmersianan por 5 minutos los explantes con ese medio.

3.3.1.8.6 Efecto de bajas temperaturas en cultivo *in vitro*

Con el objeto de evaluar el efecto que la temperatura pudiera tener sobre la respuesta morfológica se procedió a montar un ensayo como se indica a continuación:

Del banco de germoplasma mantenido en oscuridad, se aislaron 10 protocormos en estados DOS y TRES y de tamaño similar por cada tubo de 95x14 mm. Se cultivaron en 5 ml. de medio VW solidificado con agar y se hicieron 5 repeticiones de cada tratamiento. Todos se mantuvieron en oscuridad con diferentes tiempos a de tiempo de cultivo a 4°C: 1, 2, 4 y 6 días. Luego se transfieren a fotoperíodo 16/8 y 22° C. Se mantiene un control directo en luz y a 22°C. La respuesta se evalúa mensualmente.

3.3.1.8.7. Desarrollo de protocolos de germinación *in vitro*

El medio de inducción fue Van Waes suplementado con BAP. Los *explantes* se mantienen en oscuridad hasta que se desarrolla el embrión.

Para la obtención de plántulas a partir de protocormos estos se transfirieron a medio Murashige-Skoog, 1962 (MS), suplementado con 2g/L de carbón activo y 100g/L de plátano, que proporciona los reguladores de crecimiento necesarios. Los embriones se transfieren a cámara de cultivo, en condiciones de fotoperíodo controlado de 16/8 y a temperatura de 22 °C.

En el siguiente cuadro se indica el material seleccionado cuyos embriones han sido transferidos a condiciones de luz:

CUADRO 11 Material seleccionado y embriones trasferidos a luz

MATERIAL	EMBRIONES EN LUZ
B3	+
B5	+
B6	+
B11	+
B13	+
B15	+
B17	+
B18	+
B23	+
B24	+
B28	+
B30	+
B34	+
B35	+
B38	+
B41	+
B44	+
MB7A1	+
MB23.2	+
MB32.2	+
MB36B1	+
MB44.2	+
MB43.1	+

Para evaluar el desarrollo de los E.S. de *Chloraea sp*, se eligió un número arbitrario de 10 para evaluar los siguientes parámetros:

- Aparición de clorofila (días).
- Altura de las plantas (cm).
- Número de hojas en el tiempo.
- Macollamiento (=tasa de propagación)

Las mediciones se realizaron cada dos semanas.

3.3.1.9. Propagación vegetativa *in vitro*

En esta etapa se emplearon plantas procedentes de Yumbel, y que se habían mantenido en speedling por dos años. Se extrajo un sector de tejido entre el tallo aéreo y el rizoma, que corresponde a la zona meristemática donde se encuentran las yemas. Este *explante* se sembró en medio de inducción Van Waes. Igualmente, También se extrajeron yemas bajo lupa estereoscópica, para luego sembrarlas en el mismo medio de cultivo. En ambos casos el principal problema fue la contaminación por hongos y, en menor medida por bacterias. Aunque se ensayaron diversos métodos de esterilización, no fue posible controlarla con ninguno de esos *explantes* vegetativos.

Procedimiento.

YEMAS. Se extrajeron las yemas bajo lupa estereoscópica; se desinfectaron con una solución de cloro 20% durante 5 minutos; se hicieron lavados seriados con agua destilada estéril y finalmente se sembraron las yemas en medio Van Waes suplementado con 0,02 mg/L de BAP. Se cultivaron en cámara de cultivo con fotoperíodo de 16/8.

EXTRACCION Y DESINFECCION DE TEJIDO QUE INCLUYE LA YEMA. Se lavaron y escobillaron las plantas con agua corriente, luego fueron lavadas con agua jabonosa estéril con agitación por 15 minutos; se cortaron los tejidos que se iban a usar como *explante*; se esterilizaron en etanol 70% por 1 minuto y finalmente se hicieron lavados seriados con agua destilada estéril; y se aplicaron fungicidas por 15 minutos sin agitación; lavados seriados con agua destilada estéril; cloro 20% + Tween 80 por 5 minutos sin agitación; lavados seriados con agua destilada estéril.

Una vez finalizado este proceso, los explantes se separaron en los siguientes tratamientos :

9.1. Explantes en medio líquido con antibióticos, durante 24 horas con agitación; subcultivo a medio para bacterias durante 24 horas; subcultivo a medio Van Waes normal; mantención en cámara de cultivo con fotoperíodo controlado de 16/8.

9.2. *Explantes* en medio para bacterias durante 24 horas; subcultivo a medio líquido con antibióticos, durante 24 horas con agitación; subcultivo a medio Van Waes normal; mantención en cámara de cultivo con fotoperíodo controlado de 16/8.

CUADR 12 MEDIO LIQUIDO CON ANTIBIOTICOS

COMPUESTO	CANTIDAD
Azúcar	30 g/L
Nistatina	2,4 * 10 unid/L
Kanamicina	100 mg/L
Gentamicinsulfato	50 mg/L

Se esteriliza por filtración y almacena a 4°C .

CUADRO 13 MEDIO PARA IDENTIFICACION DE BACTERIAS

COMPONENTE	CANTIDAD
Caseína hidrolizada	8 g/L
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,15 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L
Extracto de Levadura	4 g/L
Sacarosa	10 g/L
Agar	8 g/L

CUADRO 14 FUNGICIDAS EMPLEADOS

PRODUCTO	CANTIDAD
Metalaxil	20 g/L
Mancozeb	2 g/L
Bravo	4 g/L
Manzicarb	1 g/L
Dithane	2 g/L

Los explantes se subcultivaron diariamente para lograr frenar la contaminación que haya logrado resistir el proceso de esterilización. El test de viabilidad empleado es el del Trifeniltetrazolium.

CUADRO 15 Identificación de hongos patógenos

PRODUCTO	MUESTRA 1	MUESTRA 2
Kasumin	+++	+++
AS - 17	+++	+++
Captan	++	+
Bravo	-	+
Dithane	-	+
Longlife	+	-
Mancozeb	+	-
Manzicarb	-	+
Acrobat	+	+
Metalaxil	+	+

SIMBOLOGIA : +++ = intenso crecimiento del hongo

++ = crecimiento regular del hongo.

+ = crecimiento escaso

- = sin crecimiento del hongo.

Según estos resultados, se seleccionaron los siguientes fungicidas para desinfectar los explantes y luego sembrarlos en medio Van Waes : Mancozeb, Manzicarb, Dithane, Longlife, Bravo, Acrobat y Metalaxil. El resto de los productos fue descartado al no lograr controlar el crecimiento de los hongos.

CUADRO 16 Test de viabilidad de explantes desinfectados con fungicidas seleccionados

PRODUCTO	MUESTRA 1	MUESTRA 2
Bravo	+	-
Dithane	+	-
Longlife	-	-
Mancozeb	+	+
Manzicarb	-	-
Acrobat	-	-
Metalaxil	+	+

+ Explante vivo

- Explante no viable

Estos resultados permiten descartar los productos Longlife y Acrobat ya que son demasiado drásticos para los explantes. Luego de 5 días en medio Van Waels, los explantes tratados con Dithane, Mancozeb, Manzicarb, Metalaxil y Bravo no muestran signos de contaminación con hongos, aunque sí han aparecido bacterias.

Identificación de bacterias

Se determinó que las bacterias contaminantes eran bacilos gram negativos, además de detectar la presencia de levaduras. Ante ello, se seleccionaron los siguientes antibióticos : Gentamicin-sulfato, que controla bacterias gram +, gram - y micoplasmas, Kanamicina, que tiene el mismo efecto, y Nistatina, que controla levaduras y mohos.

Resultados siembra con pretratamiento en medio líquido seguido de medio para bacterias (T1)

Luego de 24 horas en medio líquido, no se apreció turbidez en éste. Al pasar el explante a medio para bacterias, estas se expresaron cubriendo la superficie del medio. Los explantes son subcultivados diariamente para lograr diluir las bacterias. Hasta la fecha, complementando el subcultivo con aplicaciones de alcohol 70% por un minuto, han logrado detener la contaminación. Como se indicó anteriormente, no ha aparecido contaminación por hongos.

3.3.1.9.1. Desarrollo de protocolos de expresión radicular

La metodología para desarrollar raíces consistió básicamente en adicionar carbón activado y auxinas en bajas concentraciones. Se requiere un mes para obtener un buen sistema radicular.

Los brotes de *Chlorea* que van creciendo durante la etapa de multiplicación, deben ser enraizados. Para ello, se transfirieron a medio de enraizamiento Murashige-Skoog, 1962 (MS), al alcanzar un tamaño mínimo de 1cm, son transferidos a medio de enraizamiento, que corresponde a medio MS con ¼ de la concentración de nitrato de amonio y 1mg/L de IBA. Los detalles experimentales para obtener este medio óptimo se indican en el manuscrito para publicación en revista Phytion.

Se eligieron 10 plantas para evaluar durante un mes el tiempo que tardan en generar raíces, ganancia en el número de hojas, altura y largo de raíces.

Inicio de nuevos cultivos y mantención de líneas seleccionadas

El inicio y subcultivo de nuevo material no seleccionado y seleccionado siguió la metodología para inducir y multiplicar embriones somáticos primarios y secundarios. Se obtuvieron plántulas con un sistema radicular inhibido.

Estas actividades involucraron la preparación de medios de inducción, multiplicación y enraizamiento, además de subcultivos mensuales del material, tanto brotes, plantas como embriones somáticos (E.S.).

3.3.1.10. Semillas sintéticas

ENCAPSULACION DE E.S.

Una vez establecida la técnica de generación de E.S. se requiere iniciar técnicas que permitan mantenerlos "dormidos" para no tener que subcultivar con tanta frecuencia. Por ello se desarrolló esta actividad, que tuvo como objetivo detener el proceso natural de germinación del E.S., es decir, provocar DORMANCIA a través de la elaboración de una cápsula que rodea al embrión y contiene Acido Absícico (ABA), Manitol o ambos como inhibidores. Además evaluar el efecto de la temperatura en la dormancia del tejido.

METODOLOGIA. E.S. Mantenidos en oscuridad bajo condiciones de esterilidad son sometidos a encapsulación. La formación de la cápsula se produce de la siguiente manera:

Se prepara una solución de Alginato al 3% que contiene medio nutritivo de Van Waels con 20g/l de sacarosa, pH ajustado a 6,0 y la aplicación del inhibidor de acuerdo al tratamiento que corresponda. A su vez se prepara una solución de Cloruro de Calcio que también contiene medio basal de Van Waes, 20g/l de sacarosa, pH 6,0 y el inhibidor correspondiente. Ambas soluciones se esterilizan en autoclave. Los E.S. son transferidos a la solución de Alginato por 10 minutos y posteriormente se pasan a la solución de CaCl₂ donde permanecen durante 20 minutos permitiendo que se produzca la polimerización.

Una vez formadas las cápsulas son transferidas a medio de cultivo Van Waes que carece de hormonas. Actualmente se mantienen en condiciones de oscuridad a 22° y a 4° C de acuerdo al tratamiento correspondiente.

La primera evaluación se hizo el día 16 de Noviembre y no tienen signos de germinación.

METODOLOGÍA. E.S. Mantenidos en oscuridad bajo condiciones de esterilidad son sometidos a encapsulación. La formación de la cápsula se produce de la siguiente manera:

Se prepara una solución de Alginato al 3% que contiene medio nutritivo de Van Waes con 20g/l de sacarosa, pH ajustado a 6,0 y la aplicación del inhibidor de acuerdo al tratamiento que corresponda. A su vez se prepara una solución de Cloruro de Calcio que también contiene medio basal de Van Waes, 20g/l de sacarosa, pH 6,0 y el inhibidor correspondiente. Ambas soluciones se esterilizan en autoclave. Los E.S. se transfieren a Alginato por 10 minutos y posteriormente se pasan a la solución de CaCl₂ donde permanecen durante 20 minutos permitiendo que se produzca la polimerización. Las cápsulas se transfirieron a un sustrato inerte que consiste en Agar Agua, a condiciones de oscuridad y de temperatura correspondiente (4° y 22° C).

Se desarrollaron 8 tratamientos con ABA, Manitol o ambos como inhibidores y un tratamiento control, se aplican 5 réplicas por tratamiento. A continuación se detalla cuadro de tratamientos:

CUADRO 17 Tratamientos

N° TRATAMIENTO	CONDICIONES
T1	1uM ABA a 4 C
T2	1 uM ABA a 22 C
T3	0,25 uM Mannitol a 4 C
T4	0,25 uM Mannitol a 22 C
T5	1uM ABA + 0,25 uM Mannitol a 4 C
T6	1uM ABA + 0,25 uM Mannitol a 22 C
T7	Control 4 C sin ABA y sin Mannitol
T8	Control 22 C sin ABA y sin Mannitol

Se evaluaron E.S. encapsulados después de 15 días de tratados y se transfieren a condiciones de fotoperíodo 16/8 a 22° C. Se evalúa además su capacidad germinativa. Para esto se lixivian las cápsulas para eliminar al inhibidor y se siembran en su medio natural, se ha comprobado que en 7 días germinan los E.S. sin tratamientos (informe año 2000).

Posteriormente los E.S. encapsulados se transfirieron a medio Van Waes líquido en agitación, diariamente se renueva el medio de cultivo y se toman muestras para determinar la presencia de ABA en el medio.

En la elaboración de este paso hubo algunos inconvenientes ya que la excesiva manipulación de las cápsulas terminó por desintegrar alguna de ellas y otras se contaminaron, por lo que se redujo enormemente el número de réplicas del ensayo. En consideración a este tipo de errores experimentales sería conveniente aumentar el número de individuos a ensayar para no perder registro de tratamientos.

A continuación los E.S. se transfieren a medio standard Van Waes para germinación y fotoperíodo 16/8 en cámara de cultivo.

La modificación que se ha hecho a este método está relacionada con el mecanismo de encapsulación, si bien la metodología es siempre la misma el contenido de la cápsula puede variar, en este caso la cápsula es diferente ya que está elaborada para cada tratamiento con ABA o con Manitol, ambos o sin ellos.

Veremos que en un segundo ensayo, la variación estará en el sustrato donde permanecen los tratamientos, en este caso solo es agar y su única función es la de dar soporte a los explantes, sin embargo, en un segundo ensayo su función es aportar nutrientes al embrión ya que está en contacto directo con la cápsula hidrosoluble.

3.3.1.11. Identificación de patrones genéticos mediante DAF

La técnica de marcadores moleculares para la determinación de especies vegetales usando para ello PCR y primers aleatorios, ha demostrado una buena eficiencia en la determinación de patrones genéticos en especies tan diversas como animales, vegetales y organismos de tipo procariotas. Con esta idea en mente, se puso a prueba este procedimiento para diferenciar especies del género *Chloraea*. Usamos para ello la técnica DAF-PCR (DNA Amplification Fingerprinter) (Caetano et al, 1991), la cual entregaría bandas diferenciales entre las diversas especies de *Chloraea*, pudiendo identificarse cada una de ellas por uso de esta huella genética.

Esta técnica no ha sido descrita para el material vegetal presentado, por cuanto no existen experiencias previas al respecto, en bibliografía básica ni en estudios de laboratorio, de igual forma tampoco existe información relativa a la obtención de material genómico no encontrándose optimizado este procedimiento. Para este último punto se utilizó el procedimiento de CTAB descrito por Weising et al. (1990) y modificado en el laboratorio para la optimización del mismo.

La técnica de marcadores moleculares para la determinación de especies vegetales usando para ello PCR y primers aleatorios, ha demostrado una buena eficiencia en la determinación de patrones genéticos en especies tan diversas como animales, vegetales y organismos de tipo procariontas. Con esta idea en mente, se pone a prueba este procedimiento para la determinar especies de *Chloraea*, usando para ello la técnica DAF-PCR (DNA Amplification Fingerprint) (Caetano et al 1991), la cual entregaría bandas diferenciales entre las diversas especies de *Chloraea*, pudiendo identificarse cada una de ellas por uso de esta huella genética.

Esta técnica no ha sido descrita para el material vegetal presentado, por cuanto no existen experiencias previas al respecto, en bibliografía básica ni en estudios de laboratorio, de igual forma tampoco existe información relativa a la obtención de material genómico no encontrándose optimizado este procedimiento. Para este último punto se utilizó el procedimiento de CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) descrito por Weising et al. y modificado para la optimización del mismo. De igual manera se utilizó el procedimiento descrito por Paul Bemwell et al. para la aislación de DNA y la eliminación de polisacáridos con LiCl.

El material fue colectado en terreno o bien colectado desde criaderos de orquídeas y enviado al laboratorio para su análisis. Cada un de las muestras fue procesada para la obtención de su DNA. Debido a la presencia de una gran cantidad de polisacáridos los patrones de amplificación presentaban una gran variedad de resultados muchos de ellos irreproducibles en forma continua, por este motivo se procedió a la purificación del DNA obtenido por el método de CTAB, usando para ello la purificación con LiCl, resultando en un DNA de excelente calidad para el ensayo de Marcadores Moleculares como es el caso de DAF, además de permitir la reproductibilidad de los resultados Una vez establecidas todas las posibles variantes sujetas a la técnica se procedió al ensayo metódico de los primers usados para la reacción DAF y que correspondían a primers de 10nt (10 meros) de longitud de la serie ROTH aleatorios (Oligo-Datanblatt, Alemania). Estos estudios determinaron que de una población de 20 primers en stock, 8 presentaban una putativa amplificación positiva y entrega de patrones diferenciales sobre todos los DNA en estudio. En un posterior estudio más fino de estos 8 primers solo 4 de ellos eran positivos para los diferentes tipos de DNA.

METODOLOGÍA

Extracción y purificación del DNA: Las diferentes especies de *Chloraea* sometidas a análisis fueron colectadas directamente en terreno o bien solicitadas a diferentes invernaderos en el centro y sur del país. Luego fueron lavadas, pesadas y congeladas a -20°C hasta su posterior utilización.

Las plantas fueron molidas en mortero en presencia de nitrógeno líquido; se adicionó posterior a la molienda el buffer de extracción CTAB más 25 μl de β -mercaptoetanol (10mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM Na_2EDTA ; 2% w/v CTAB; 1.4 M NaCl; 1% polivinilpirrolidona) formando una pasta homogénea incubada a 65°C por 1 hora, con ocasionales agitaciones, seguida de la adición de 12.5 ml de Cloroformo:AlI (24:1) y sometidas a agitación por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos a 18°C . El sobrenadante es cuidadosamente recolectado y adicionado 2/3 de volumen de isopropanol y centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos a 18°C y resuspendido en 1 ml de TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM Na_2EDTA), luego se procedió a la incubación en presencia de RNAsa por 30 minutos a 37°C (10mg/ml). Posteriormente las muestras fueron sometidas a la reacción de Fenol:Cloroformo:AlI (1:1), para la eliminación de proteínas, el sobrenadante fue cuidadosamente colectado y se le adicionó 1/10 volumen de NaCl 3M y 2,5 volúmenes de Etanol 100% frío; los ácidos nucleicos fueron colectados mediante centrifugación a

5000 rpm por 30 minutos a 4°C y lavados 2 veces en etanol al 70%; las muestras fueron secadas a 37°C por 1 hora y resuspendidas en 1 ml de TE pH 8.0; las muestras posteriormente fueron calentadas a 60°C por 1 hora y se le adiciono ½ volumen de LiCl 8M incubándolas por 30 min. a temperatura ambiente. Luego se le adiciono 1 volumen de Etanol 100% frío y se dejo reposar a -20°C por 2 horas. Pasado este tiempo de colectaron los ácidos nucleicos por centrifugación a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C, para posteriormente ser secados y resuspendidos en 50 ul de TE pH 8.0.

Cuantificación de las muestras :Las muestras procesadas por extracción con CTAB y LiCl fueron sometidas a análisis cualitativo mediante geles de agarosa al 2% en presencia de Bromuro de etidio y usando como marcador de peso molecular el marcador 1 Kb gibco BRL, cámaras electroforéticas FOTODYNE

Protocolo Reacciones DAF- PCR .

La reacción DAF-PCR se ha estandarizado de acuerdo a las siguientes condiciones probadas.

1 ul DNA genómico resuspendido en buffer TE pH 8.0, primers de la serie Roht en concentraciones de 20 pmol/ul resuspendidos en agua estéril, buffer 10x PCR buffer (Gibco BRL), 1.5 ul dNTPS (concentración 10 mM), 1.5 ul MgCl₂ (concentración 5 mM), 0.5 ul Taq DNApol 2.5U (Gibco BRL), agua estéril para un volumen final de 15 ul. La cantidad de ciclos incluidos en la reacción fue de 35 Ciclos y mantención final de la misma a 4°C.

CUADRO 18 Tabla indicando las diferentes temperaturas empleadas en la pre-PCR, PCR y temperatura en la post-PCR

Tiempo	Temperatura (°C)
2 min.	95
15 seg.	95
1 min.	30.3
2 min.	72
2 min.	72
Sostenido	4

Curva de Magnesio para la Reacción de PCR: La reacción DAF debió ser sometida a una curva de concentración de magnesio nuevamente, aunque en informes anteriores esto ya había sido realizado debido a la adición de un paso extra en la purificación del DNA resultante del proceso de extracción; las condiciones frente a las cuales se realizo la curva de magnesio fueron las siguientes : se probó concentraciones crecientes de magnesio que iban desde los 3 mM hasta los 7 mM, en razón de 1mM, con uno de los cuatro primer de la serie ROTH cuya amplificación había resultado exitosa en muestras anteriores (ROTH G09), determinándose que el punto de concentración óptimo de magnesio para la reacción DAF era de 5 mM de magnesio.

Gradiente de temperatura para DAF-PCR : La reacción de gradiente de temperatura para DAF-PCR fue obtenida considerando un rango de temperaturas que van desde 29.9°C a 41.4 °C , obteniendo el mejor patrón de temperaturas a 30.3°C 8 (termociclador Ependoff Gradient). Para realizar esta reacción se procedió a amplificar 2 muestras de DNA identificadas como JE002 y ME003, escogidas al azar, con los primers G09 y P14 que evidenciaban amplificaciones nítidas a 30.3°C, 32.7°C, 34.4°C, 36.1°C, 39.3°C y 41.2°C

3.3.1.12. Contaje de cromosomas

El recuento cromosómico se hizo en dos especies: *C. crispera* en Talca (Basilio Carrasco) y *C. virescens* en Concepción (Lic. Rodrigo Reinoso, trabajo publicado). Ambos estudiantes utilizaron métodos distintos, los cuales se indican a continuación)

Utilizando el método de la hidroquinolina (Hommo y Sakilahti, 1985) se determinó que la especie *C. crispera* tiene 42 cromosomas. Sin embargo cuando se utilizó colchicina también fue posible observar figuras mitóticas

El pretratamiento de ápices con una solución acuosa de colchicina 0.01, 0.03 y 0.06%; fijar en Carnoy por 24 horas a 4°C; tefir con acetorceína 1% por 3 días; poner ácido acético 45% sobre portaobjeto; aplastar con cubreobjeto y contar las figuras mitóticas. Este método no permite ver figuras mitóticas con el microscopio de la U. Tal, por lo que necesario utilizar uno de mayor resolución en U. Chile.

3.3.1.13. Criopreservación.

(Desarrollo y dirección de Unidades de Investigación de estudiantes de Doctorado)

La etapa preliminar en un protocolo de criopreservación, requiere conocer el contenido de agua de los tejidos. Se evaluó el contenido hídrico de embriones somáticos de *C. crispera*, y también se definió el tiempo máximo que éstos soportan la desecación sin perder viabilidad. El objeto final es disponer de un explante que resista al drástico tratamiento con agentes criopreservantes y finalmente al nitrógeno.

En cualquier proceso de criopreservación es necesario desarrollar una etapa preliminar: evaluar el contenido de agua libre de un tejido para asegurar sobrevivencia a los tratamientos con agentes crioprotectores. Para ello se procede a realizar una curva de desecación en la cual se determina el momento en el cual el tejido, sin perder viabilidad, pierde un contenido límite de agua.

Elaboración de una Curva de Desecación: El proceso de desecación se llevó a cabo en cámara de flujo laminar manteniendo las condiciones de esterilidad de los tejidos.

La desecación se obtiene al someter los embriones a una cámara con Sílica Gel durante un período de 4 horas, la evaluación del peso de los tejidos se hizo a intervalos de 20 y 30 minutos. Se montaron dos set de embriones , el primero (con 11 embriones) nos permitía evaluar la pérdida de peso de los embriones y el segundo set (con 22 embriones) se utilizó para evaluar la viabilidad de éstos al someterlos al test del Trifeniltetrazolium.

3.3.1.14. Micorrizas

3.3.1.1.4.1 Aislamiento de Micorrizas

Para aislar las micorrizas se trabajo con material recolectado en :

- *Chloraea gaviu* fue recolectada en el sector de Chaimavida VIII Región.
- *C. crispera* fue recolectada en las cercanías de yumbel VIII Región.
- *C. virescens* fue recolectada en las cercanías de yumbel VIII Región.
- *Chloraea sp.* fue recolectada en las cercanías de yumbel VIII Región

De las orquídeas recolectadas se separo el rizoma de las hojas, para aislar al micorrizas se uso el protocolo descrito en la tabla N°2 , después de esterilizadas los rizomas se dejaron en agua destilada esteril por 30 minutos, los rizomas fueron cortados y sembrados en medio PDA.

Tabla N°2

Solución	Tiempo	<i>C. gaviu</i>	<i>C. crispa</i>	<i>C. virescens</i>	<i>C. sp.</i>	N° de placas
0,1 % Cloruro de mercurio en etanol 50%	30 seg.	-	A _{3d}	1A ₂	No se uso	75
0,1 % Cloruro de mercurio en agua	2 min.	-	-	B _{2e}	No se uso	70
1% de AgNO ₃	1 min.	-	-	C ₂₂	No se uso	83
Nacl 4 %	1 min.	-	-	-	No se uso	55
0,4 Naocl	2 min.	-	D ₃	32D ₂	No se uso	80
70 % etanol	3 min.	-	3e ₃	-	No se uso	80
H ₂ O ₂ 30 %	2 min.	M ₁ ,M ₂	-	F ₂	Nm ₁ , Nm ₂ , Nm ₃ , Nm ₄ , Nm ₅	80

La Tabla N°2. Muestra los protocolos usados para esterilizar el rizoma antes de ser sembrado en medio PDA, Los rizomas usados para aislar las micorrizas tenían un largo aproximado de 20 cm. Este rizoma después de esterilizado se corto en trozos de 0,8 cm. Aproximadamente y fue sembrado en medio PDA en placas petri plásticas de 10 cm. De diámetro, para el caso de *Chloraea sp.*, debido a que el rizoma de esta planta tenía un largo aproximado de 4 cm. Se hizo un solo tratamiento para aislar micorrizas y los cortes efectuados al rizoma fueron menores a 0,5 cm.

En la tabla se muestran solo las cepas, cuyas características hacen pensar que corresponden a micorrizas.

3.3.1.1.4.2 Test con fungicidas

En el control de organismos fitopatogenos, se pueden usar distintos fungicidas para controlar el ataque de hongos, protegiendo a la planta, estos fungicidas pueden afectar el desarrollo de la micorriza y con esto el crecimiento y desarrollo de la planta, en este contexto se realizaron test fungicidas usando la cepa M₂ frente a distintos fungicidas de uso comercial, estos ensayos se hicieron preparando soluciones del fungicida en base a recomendaciones del fabricante (Tabla N° 3).

Tabla N° 3

Fungicida	Concentración	Disco impregnado con 10µl. de cada solución	Disco impregnado con 20µl. de cada solución
Mancozeb + Benomil	10,65 mg./ml.	No hay crecimiento del hongo M2	No hay crecimiento del hongo M2
Oxicloruro de cobre	13,175 mg./ml.	Hay crecimiento del hongo M2	Hay crecimiento del hongo M2
Manzate	9,6 mg./ml.	Hay crecimiento del hongo M2	No hay crecimiento del hongo M2
Benlate	8,6 mg./ml.	No hay crecimiento del hongo M2	No hay crecimiento del hongo M2
Captan	8,65 mg./ml	Hay crecimiento del hongo M2	No hay crecimiento del hongo M2

El ensayo se realizo impregnando discos de papel filtro Watsman N° 3, con 10 µl. y 20 µl.

De los distintos fungicidas a las concentraciones señaladas, estos discos fueron sembrados en placas con medio PDA. En donde se sembró la cepa M₂, la que logro crecer en oxicloruro de cobre principalmente

3.3.2. Principales problemas metodológicos enfrentados

Los principales problemas fueron:

Intoxicación de las plantas en Yumbel por fertilización: una vez establecidas las plantas adultas, tanto en maceteros como en el suelo, fueron fertilizadas con una pastilla de Phostrogen, y en menor cantidad las juveniles. Al principio pareció que la respuesta era positiva para la gran mayoría, pero después de un tiempo, al repetir la fertilización, aparecieron algunas plantas afectadas.

Algunos maceteros fueron llevados a la Universidad de Concepción, donde se detectó una alteración metabólica por exceso de fertilización. Las plantas en macetas se sacaron al exterior, donde la lluvia lixivió el exceso de sales.

La fertilización foliar con soluciones con alto contenido en potasio como el Hyvron, un cc en un litro de agua semanalmente fue igualmente favorable. Las hojas se vieron lustrosas de unos colores verdes intensos grandes y sanos.

Efecto del guano de caballo en colección algunas plantas fueron transplantadas a un sitio contiguo al invernadero que previamente había recibido gran cantidad de guano de caballo como fertilizante. Si bien el prendimiento fue excelente su adaptación al nuevo sitio dejó mucho que desear. Solo un bajo porcentaje floreció y sus hojas presentaban un aspecto que hacía presumir a simple vista que las plantas estaban resentidas y con su vitalidad disminuida. Pese al riego por goteo, su sobrevivencia en la temporada siguiente se vio disminuida, menos de un 50 % logró salvarse. La razón principal de esta anomalía se debió al exceso de nitrógeno contenida en el guano.

En el año 2002 fueron trasladadas a macetero, con sustrato adecuado y colocadas en el invernadero nuevo. Fue impresionante como se recuperaron. La gran mayoría presentó floración, lo que indicó su gran capacidad de reacción que nos sorprendió.

En Quillota el principal problema metodológico encontrado fue la presencia de dos enfermedades *Phoma* y *Botrytis* de difícil control pues no se conocía la respuesta de la especie a agroquímicos específicos.

El tercer problema metodológico fue la dificultad para establecer el protocolo de multiplicación in vitro de explantes diferentes a semillas, después de dos años de investigaciones se tiene buen resultado partiendo con material maduro.

3.3.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas al proyecto

El desconocimiento que se tenía de la especie al plantear el proyecto llevó a planteamientos insostenibles a partir del segundo año y por lo tanto la metodología fue modificada de acuerdo a los resultados que se presentaban.

La descripción de la metodología efectivamente realizada se presenta en el capítulo 3.3.1

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS

Para mayor comprensión se presenta un cuadro comparativo entre las etapas o líneas de investigación propuestas y las realizadas

Etapas o Líneas de investigación propuestas	actividades	Actividades realizadas	Observaciones
1 generar conocimientos botánicos y fisiológicos del género	1.1 recuperación bibliográfica	Esta actividad fue realizada	La poca información disponible a nivel mundial fue recopilada
	1.2 Caracterización de condiciones de origen	Caracterización fenológica, de suelo y ambiental	Esta actividad ha sido realizada para Yumbel y Quillota principalmente para <i>C. crispata</i>
2 evaluar y mejorar mecanismos de reproducción	2.1 preparación de ensayos	Recolección y selección de material realización ensayos de sustratos, fertilización, producción en macetas, sombreadero e invernadero	Se realizó análisis de sistemas reproductivos (tipo de polinización) Se inició el proceso de hibridación, no contemplado en el proyecto original
	2.2. reproducción de semillas	Se realizó siembra de semillas in vitro y con y sin micorrización	Se implementó la técnica de germinación micorrizada
	2.3 Reproducción vegetativa	Reproducción por división de plantas (rizoma) y ensayos de clonación in vitro	Los ensayos de división de planta sólo establecen la posibilidad de separar en dos los rizomas, estimamos esta técnica no comercial.
	2.4 Cultivo forzado	Cultivo en sombreadero y en invernadero	No se ha obtenido floración fuera de las épocas normales desde septiembre a noviembre
3 Evaluación técnica de micropropagación	Cultivo in vitro	Realizada la micropropagación partiendo de semillas, aún en estudio el cultivo de otros órganos vegetales	Resultados no concluyentes
4 Desarrollar procedimiento de postcosecha y venta de rizomas y flores	Ensayos de duración de las flores, trasplante de rizomas	Manejo de la flor cortada hecho, manejo de trasplante realizado	No se ha realizado venta pues la planta presentaba una juvenilidad mayor a la esperada
5 Evaluar los resultados del proyecto técnica y	Fichas de cultivo Registros de costos	Realizadas parcialmente	Falta información para análisis económico

económicamente para ser proyectables a escala comercial			
6 Transferir la información generada en forma de un manual de cultivo	Transferencia de resultados	Los resultados aún son incompletos para elaborar un manual , sin embargo se han organizado días de campo y presentación en congresos como una medida de transferir los resultados obtenidos	Hay antecedentes importantes del cultivo y de otros géneros de orquídeas como para elaborar un manual, esta actividad está siendo presentada a FIA en forma independiente debido a los problemas de gestión del proyecto.

5. RESULTADOS DEL PROYECTO

5.1. Evaluación fenológica y de crecimiento del cultivo

En términos generales hay un crecimiento exponencial durante el invierno, en que la plantas alcanzan el máximo desarrollo vegetativo, posteriormente un periodo en que el crecimiento expresado en tasa, se estabiliza, para posteriormente iniciar la floración. (Figura 3)

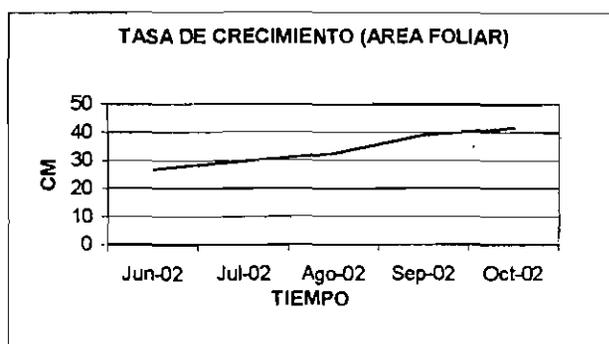


Figura 3 Resultado de las evaluaciones de las plantas, expresado como largo total de hojas por tratamiento

Las plantas adultas en suelo presentaron una tasa de crecimiento más lenta en comparación con las plantas adultas en macetas, debido a que presentaron mayores problemas patogénicos, que afectaron su desarrollo. Además las plantas ubicadas al aire libre, en general presentaron menor desarrollo foliar por estar más expuestas a la radiación solar y presentar una mayor incidencia de *Phoma sp.*

Los resultados indican que la especie posee un rizoma perenne, tiene un período juvenil de cinco años como mínimo, en estado adulto forma entre 8 y 12 hojas, (figura 4) la floración se extiende desde octubre (Quillota) a diciembre (Yumbel) la inflorescencia corresponde a una espiga que alcanza entre 80 y 120 cm de altura (figura 6), desarrolla 11 y 15 flores individuales (figura 5) : Las flores individuales o como espiga tienen una duración en florero máxima de 28 días, las varas son rectas y de 1 a 2 cm de grosor. La floración se presenta cada dos temporadas, sin embargo este patrón de comportamiento pudo ser variado con aplicaciones de fertilizantes al menos en un porcentaje de la población.



FIGURA 4 Esquema de desarrollo de la especie *Chloraea crispa*

Las correlaciones de crecimiento que se establecieron indican una relación positiva entre el tamaño de la inflorescencia y el número de flores simultáneamente abiertas, este es un importante factor de calidad en especies que forman espigas (cuadro 19)

CUADRO 19 Análisis de correlación lineal simple

Evaluaciones de crecimiento

- Variables analizadas R^2
- Nº de hojas formadas/Tamaño rizoma (cm²) plantas pequeñas
0.8630
- Nº de hojas formadas/Peso rizoma (g) 0.6250
- Nº de hojas formadas/Tamaño rizoma (cm²) plantas de dos a cuatro
hojas 0.0873
- Nº de hojas formadas/Peso rizoma (g) 0.0033
- Nº de hojas formadas/Tamaño rizoma (cm²) Plantas de cuatro a seis
hojas 0.0003
- Nº de hojas formadas/Peso rizoma (g) 0.1180
- Nº de hojas formadas/Tamaño rizoma (cm²) plantas de mas de seis
hojas 0.1489
- Nº de hojas formadas/Peso rizoma (g) 0.0936
- Peso de rizoma (g) / numero de hojas formadas (plantas 2 año)
0.3693

- Peso de rizoma (g) / Diámetro de la roseta basal (cm³) (plantas 2 año) 0.0123
- Area del rizoma inicial/ Numero de hojas formadas (plantas 2 año) 0.1133
- N de hojas / peso rizoma final (plantas 2 año, no florales) 0.6320
- N de hojas/ área rizoma final plantas 2 año, no florales 0.5582
- N de hojas formadas/ peso final del rizoma 0.7396
- De hojas formadas/ área del rizoma final 0.6965

En general los análisis de correlación han tenido bajos índices, esto indica que no se ha determinado caracteres morfológicos que se puedan relaciona con floración y que permitiesen selección de plantas provenientes de hibridaciones antes de la floración

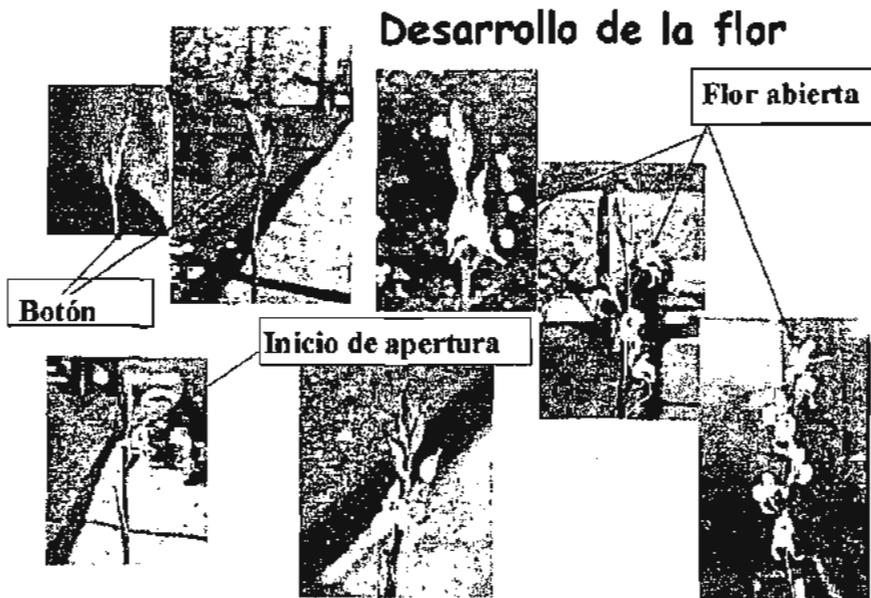


Figura 5 Desarrollo de la inflorescencia y apertura floral

La floración se presenta en una espiga con flores alternas helicoidales, la apertura floral toma un tiempo de 40 a 50 días, la apertura es acrotónica, suele presentarse aborto en el último botón, y se ha determinado una sincronización en la apertura de 8 a 10 flores. (presenta 8 a 10 flores abiertas en un mismo momento), situación importante en flor de corte.

Con respecto a la altura de las varas la figura 6 muestra que entre el inicio de la temporada de crecimiento en mayo y el momento de la floración octubre a diciembre, presenta un crecimiento exponencial alcanzando valores de tallos florales muy recomendables en flores.

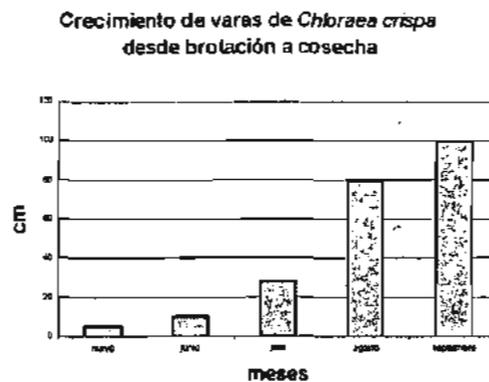


FIGURA 6 Curva de crecimiento de las varas de *Chloraea crispata*

5.2. Evaluación de las condiciones agroclimáticas y de plantas creciendo en Yumbel (invernadero, aire libre y bajo malla rushell)

Efecto de diferentes sustratos sobre el crecimiento en plantas adultas. (Yumbel)

Del análisis del crecimiento de plantas adultas, determinado por el largo total de hojas, evaluado en 5 fechas diferentes, se determinó que existen diferencias significativas entre tratamientos para cada fecha evaluada.

Cuadro 20 Promedio de largos totales de hojas (cm) para los distintos tratamientos

Tratamientos	19 Mayo	29 Junio	8 Agosto	8 Septiembre	28 Octubre
M1Aa	80.6d	97.46d	120.52d	128.5d	130d
M1Ba	7.1a	8.7a	9.78a	10.54a	10.76a
M1Ea	9.7a	14.08ab	19.24ab	23.06abc	23.98abc
M1Ga	29.9ac	40.08abc	54.18abc	60.62abc	62.1abc
M2Ba	37.74ab	50.56bc	66.24bc	76bcd	79.26bcd
M2Ca	52.22bcd	58.68cd	74.98cd	80.48cd	87.76cd

(Valores con letras iguales en la columna no presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad $p=0.05$, según test de Tukey)

El cuadro 20 muestra que los mejores tratamientos son aquellos sustratos que contienen 100 % arena (suelo original), debido principalmente al alto contenido micorrizas nativas, que estarían ayudando en la nutrición de las plantas.

Además se puede observar que el crecimiento de las plantas del tratamiento M1Aa, presenta valores altos debido a que son plantas plus seleccionadas

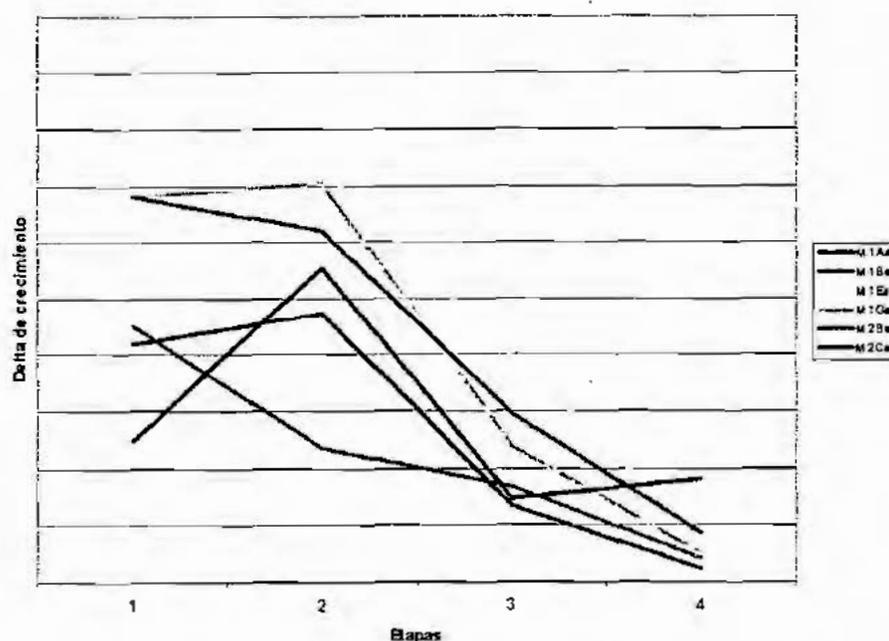


FIGURA 7 Efecto de diferentes sustratos en función de los diferenciales de crecimiento

5.2.1 . Resultados de evaluación de luminosidad

Los datos registrados bajo el dosel del bosque de pino de 9 años y 12 metros de altura con 1333 árboles ha^{-1} al inicio de la medición y reducido a 800 árboles ha^{-1} en julio de 2002, fueron tomados sobre el suelo en el centro de 3 árboles.

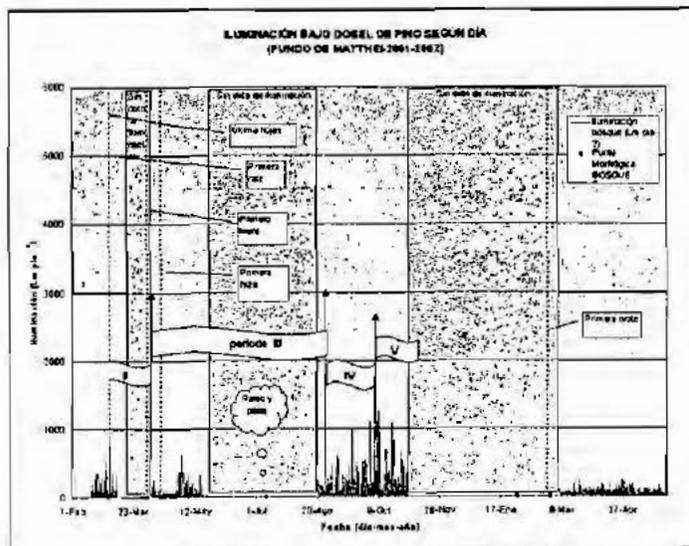


FIGURA 8 Datos de iluminación en lúmenes pie^{-2} bajo el dosel de pino de Sr. Matthei según fecha y hora con puntos importantes basado en la morfología.

Se definieron cinco estados de desarrollo, según los parámetros climáticos evaluados.

I-Receso

II-Desarrollo radicular, inicio de primeros brotes

III-Desarrollo vegetativo, término de desarrollo radicular, inicio de desarrollo reproductivo

IV-Elongación de la inflorescencia

V-Desarrollo floral

Al comienzo de brotación se puede percibir que la iluminación, después de la brotación de la raíz aumento al doble. Durante el crecimiento de las hojas la iluminación aumenta en 3 a 4 veces en comparación del periodo cuando no hay hojas de mayor superficie (durante el fin de marzo y abril). El periodo III tiene la característica que hay crecimiento vegetativo y radicular, además al final se puede distinguir las plantas con capacidad reproductiva. Durante el desarrollo de las hojas (periodo III) no hay datos completos (sólo la mitad de los datos), pero se estimó que se mantienen los mismos niveles durante este periodo.

El periodo IV se destaca por la fuerte elongación de la inflorescencia, donde la cantidad de iluminación aumentó al doble que el periodo anterior.

La inflorescencia madura durante el periodo V, disminuyendo la iluminación un poco menos que el periodo anterior. Desde el fin de agosto al principio de septiembre la iluminación aumenta 2 veces en respecto a periodo anterior.

Al fin de noviembre, en el bosque, las plantas que produjeron inflorescencia no tiene hojas verdes en su totalidad. Se nota que están en el proceso de senescencia. Mientras las orquídeas que no produjeron inflorescencia siguen verdes hasta los fines de diciembre. El aumento en la cantidad de iluminación durante periodos IV y V puede ser el resultado de una poda y raleo (bosque de pino) por debajo, que ocurrió durante el mes de julio.

Se observa diferencia entre los dos años durante el mes de mayo. El año 2003 tiene 3 veces menos iluminación que el año 2002 en este mes, sin embargo el único punto morfológico que tenemos para comparar el efecto de la iluminación, es la brotación que ocurrió en los dos años y resultó que brotó antes cuando había menos iluminación, durante el año 2003.

También se observa que la variación en iluminación varía hasta 20 veces de un día a otro. Es importante también que la máxima medición era 1.271 lúmenes pie^{-2} para compararlos con los datos a pleno sol e invernadero.

Datos de Pleno sol: Los datos a plena sol se tomaron también en el suelo en una plantación de pino de 2 metros de altura, pero el sensor de HOBO estaba colocado a 3 mts. de alturas de los árboles con el fin de no tener un efecto de sombra sobre el instrumento.

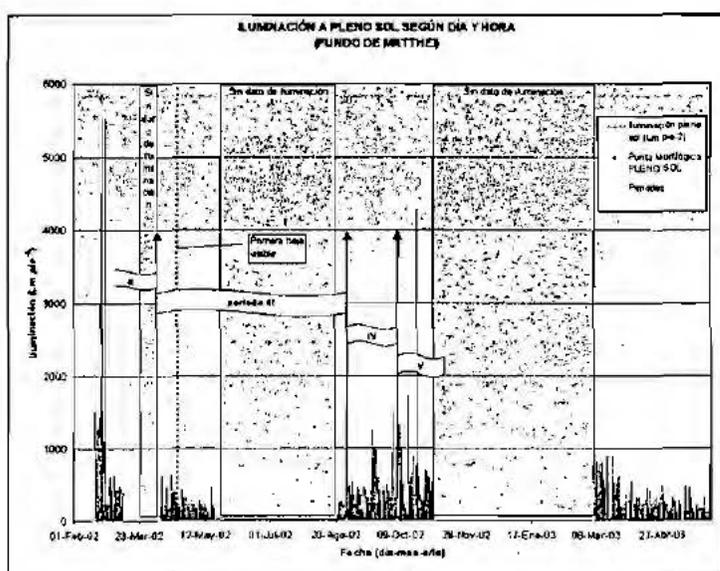


FIGURA 9 Datos de iluminación en lúmenes pie^{-2} al nivel de suelo, según fecha y hora bajo condiciones a pleno sol en el fondo de Sr. Matthei al nivel de suelo como en el bosque.

El período III cuando la planta está recién desarrollando sus hojas es muy parejo en sus niveles. El período IV se nota un aumento de casi el doble en la iluminación relativa.

En el período V que tiene la característica de la elongación de la inflorescencia tiene casi el mismo nivel de iluminación total, pero la variación es mayor.

Nota que el marzo del año 2002 tiene la mitad de iluminación que el año 2003.

Es muy importante de notar el máximo de iluminación de pleno sol que fue 5.547 lúmenes pie^{-2} con una variación a corto plazo de 55 veces entre el máximo y normal de iluminación.

COMPARACIÓN BOSQUE – A PLENO SOL

Cuando se compara la ilustración ^B y ^A, se puede observar que durante el período III y IV, que representa la acumulación de energía para el próximos floración, las dos condiciones reciben niveles de iluminación muy similar. Esta se confirma por el color de las hojas en cada condición, a pleno sol color Munsell entre 5 y 7,5GY 5/6 verse el bosque con el mismo color.

Se observa una diferencia durante el período V, cuando la flor esta terminando su función de producir semilla. Durante este tiempo las hojas empiezan a cambiar a amarillas a pleno sol (color Munsell) de 2,5GY8/4 verse 5GY4/2 del bosque. Los expertos indican que el color, cuando la luz es a un nivel adecuado, debe ser un color oliva verde-amarilla.

El significado de esto es que según los pocos datos que existen, la planta crece muy bien con bajo 700 lúmenes pie^{-2} . Además con los datos mostrados, es probable que a niveles mayores que 1000 lúmenes pie^{-2} causa la mortalidad de las hojas y reduce su acumulación de energía para el próximo año. (comparar con el periodo V).

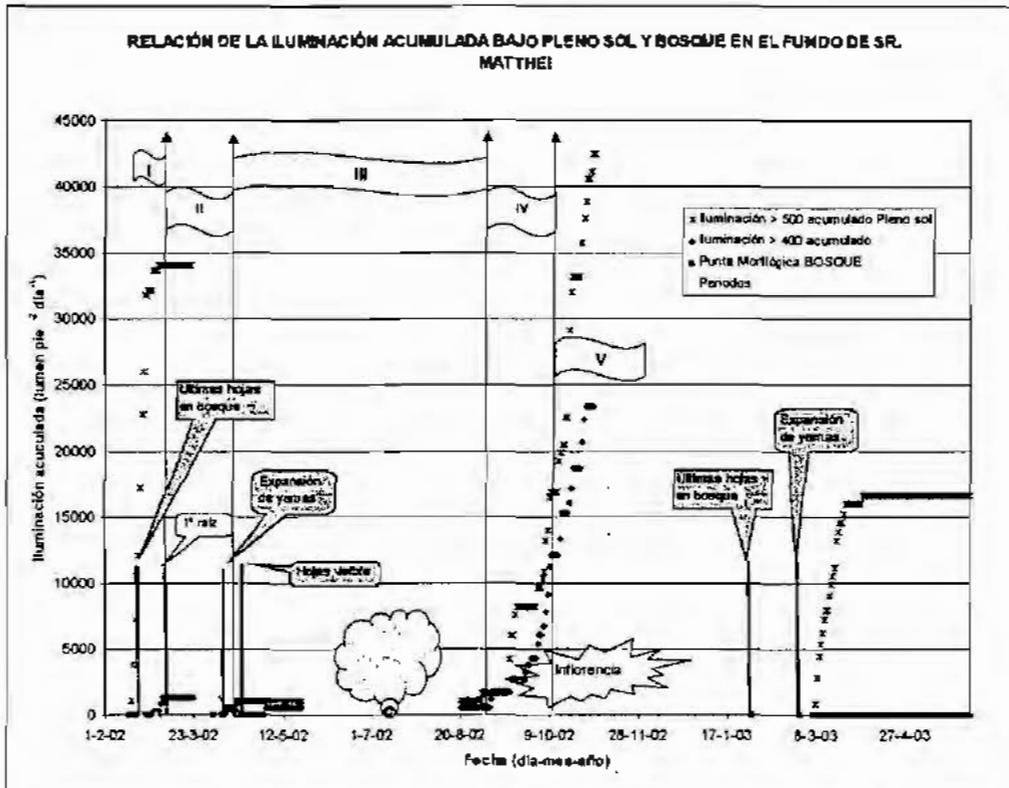


FIGURA 10 : Relación entre los lúmenes acumulados diariamente bajo el dosel del bosque de pino y a pleno sol con puntos morfológicos de *Chloraea crispata* indicado con llamadas y los periodos fijado por cambios en la temperatura.

Otro punto interesante se ven en la ilustración 6, con la acumulación de luz durante marzo. Durante marzo del año 2002 acumuló 6 veces menos luz a pleno sol durante el mismo periodo. Justamente está registrado que empezó a brotar en los dos lugares casi en la misma fecha. Tampoco llovió ante la brotación del año 2003, que indica fuertemente que la cantidad de iluminación no es el mecanismo que utiliza la orquídea para empezar su ciclo.

Una orquídea requiere una acumulación de entre 15.000 a 38.000 lúmenes pie^{-2} durante su periodo vegetativo para florecer y sobrevivir durante años. Se puede apreciar que el hábitat de *Chloraea crispata* del fondo de Sr. Matthei proporcionó esta cantidad de iluminación. (figura 10).



FIGURA 11 *Chloraea crispa* en enero con brote creciendo hacia abajo, después que la flor fue cortada en octubre

Durante el periodo I, no hay actividad normalmente. El bosque siempre tuvo hojas hasta un máximo de 3 semanas más que a pleno sol. Esta mortalidad de hojas se atribuye al calor y la necesidad de la planta a descansar (receso). El año 2003 se originó otro escenario que puso en duda este supuesto.

Unas 15% de plantas de *Chloraea crispa* creciendo en el invernadero viejo, no floreció durante el año 2002, se mantuvo sus hojas durante el periodo I, mientras a pleno sol y bajo sombra no había hojas. La medición de PAR en el invernadero estaba $159 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $1756 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a pleno sol y $475 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo 75% sombra a las 12:00 horas. De esta 15% plantas con hojas verdes 26% de estas plantas tenía brotes nuevos.

Relacionado con este acto, durante el mes de octubre del mismo año, cortaron inflorescencias antes de su elongación total de 31 plantas. Brotaron 2 hasta 5 tallos desde cada planta del 50% de estas. Una vez más indicando que el problema de que la planta es limitada en su crecimiento en este periodo no es válido si se controla otras variables.

CUADRO 21 Los periodos determinado por cambios en la cantidad de iluminación en pleno sol, su iluminación promedio durante este periodo en lumen pie⁻², la relación de los periodos con periodo III en porcentaje y la razón entre pleno sol y el bosque en al nivel de periodo en el predio de Sr. Matthei al nivel de suelo durante el año 2002.

Periodo (N°)	Periodo (fecha)	Iluminación promedio Pleno sol (Lm pie-2)	Relación (%)	Iluminación promedio Bosque (Lm pie-2)	Relación (%)	Razón pleno sol/ bosque	Morfología
I	16-2-02 24-2-02	206,8	461%	24,6	65%	841%	Sin actividad
II	25-2-02 7-4-02	44,2	98%	18,7	49%	237%	Inicio hojas y raíces
III	8-4-02 28-8-02	44,9	100%	38,1	100%	118%	Maduración hojas y inicio de inflorescencia
IV	29-8-02 6-10-02	83,2	185%	82,3	216%	101%	Elongación barra
V	7-10-02 3-11-02	120,3	268%	66,9	175%	180%	Floración

Nuevas plantas en la condición del bosque versus a pleno luz indica que la falta de adecuada luz hace que las plantas tienen menor posibilidades de sobrevivencia o como en el caso de otras orquídeas, alarga la cantidad de años hasta que pueden florecer. Durante el invierno (mayo-junio) encontramos una germinación en el bosque y en pleno sol donde hay materia seca fina descompuesto y sombra. Pero encuentra magnitudes más de plantas juveniles que en pleno sol. Las plantas C4 requieren más iluminación que las plantas y C3 para sobre vivir, porque son menos eficientes en guardar energía, pero utilizan menos agua.

En el caso del bosque hay un 30% menos luz durante el periodo de vegetación que a pleno luz. La sombra hace que posiblemente son menos eficaces en la producción de energía y cuando es más joven, puede que es menos competitiva. En estudios en Nueva Zelanda las orquídeas bajo pino empiezan a reducir sus poblaciones de orquídea baja su dosel cuando el pino desarrolla una sombra más denso. Estos datos más las observaciones en el bosque sobre las pocas cantidades de flores por cada inflorescencia, indica que la cantidad de luz para el mejor crecimiento y desarrollo sustentable es más que la iluminación del bosque y menos que la iluminación a pleno sol.

RIZOMA

Normalmente la iluminación no tiene importancia en los rizomas. Los rizomas de la *Chloraea crispa* origen entre 3cm y 7cm bajo la superficie del suelo. A esta profundidad no es posible que llegue algo de luminosidad.



FIGURA 12: Órgano que origina desde el rizoma viejo en *Chloraea* spp.

En la figura 12 se ve como crece un órgano que tiene una función desconocido y que la Dr. Calderón verificó que tiene tejidos de un rizoma. Se observa que el origen entre la unión del rizoma antiguo y los rizomas nuevos siempre crece pegado al tallo y llega solamente hasta la superficie del suelo. Hay entre 1 y 3 de estos órganos por orquídea en 50% de las plantas. Cada año se encuentra estos y no se ha visto que sobreviven de un año al otro.

LA LUZ Y EL FLORECIMIENTO

Contrariamente a la creencia popular, las plantas no florecen según el largo del día, si no más bien al percibir cuanto dura la noche. Por años los viveros han agrupado a las plantas como "plantas de días cortos" y "plantas de días largos" en función a los mecanismos bajo los cuales las plantas deciden florecer. Estos mecanismos varían de acuerdo a cada especie.

Lo que la planta percibe es en realidad la duración del periodo continuo de oscuridad. Esto ocurre gracias a un pigmento sensible que cambia cuando recibe luz y a la cual le toma un tiempo recobrar su estado de "oscuridad". Este pigmento es tan sensible que la sola luz eventual de un foco de hogar puede engañar a la planta haciéndola creer que se trata de una "noche corta". Experimentos recientes permiten que plantas florezcan fuera de temporada al darles apenas la cantidad de luz necesaria para vivir y acortar las noches mediante "flashes" periódicos de luz. La planta responderá como si se tratara de varias noches cortas. Este mecanismo puede usarse eventualmente para provocar la floración pero no es recomendable para la salud de la planta ya que puede afectarla severament

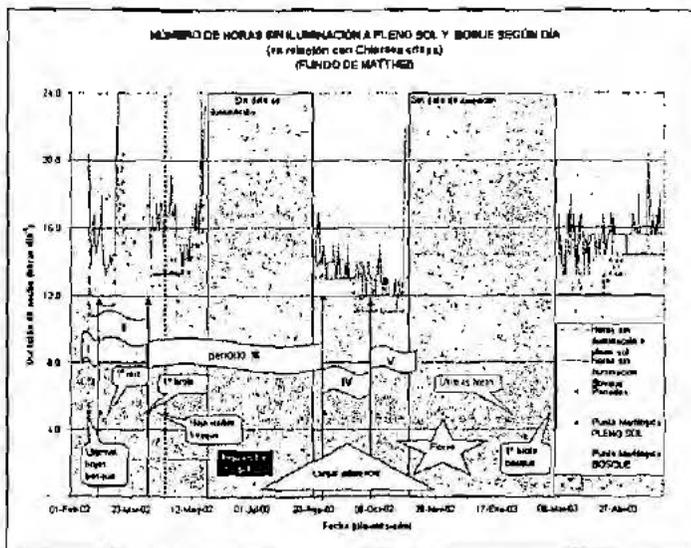


FIGURA 13 Relación de las horas de oscuridad bajo el dosel del bosque y a pleno sol según la fecha y puntos morfológicos en el fondo de Sr. Matthei.

De modo similar, las especies que requieren de noches largas verán interrumpida su floración si tan sólo una luz es encendida por la noche.

Utilizando la norma que con más que 20 lúmenes pie^{-2} las plantas en general, pueden percibir la luz, se reordenó los datos del HOBO para conocer cuanta oscuridad existe cuando la orquídea estaba iniciando la floración.

Hay dos eventos que no eran esperados que puede interpretar de la ilustración ¹³. El primero es que durante los periodos III y IV la diferencia en la cantidad de oscuridad en el bosque y a pleno sol era solamente una hora. El segundo es que la cantidad de horas de la oscuridad es entre el rango de tiempo de 14 a 16 horas. Durante el período III la orquídea está tomando la decisión de florecer o no. (ver la Ilustración 9)

PAR BAJO DIFERENTES ESCENARIOS

Durante el año se midió la luz de PAR a pleno sol, bajo el dosel del bosque de pino y dentro del invernadero viejo que tiene que el plástico está pintado con pintura blanca además tiene una malla sobre él que produce 75% de sombra. La PAR a pleno sol recibe entre 2 veces a 20 veces más que el bosque, dependiendo de la hora y fecha. (ver Ilustración 10)

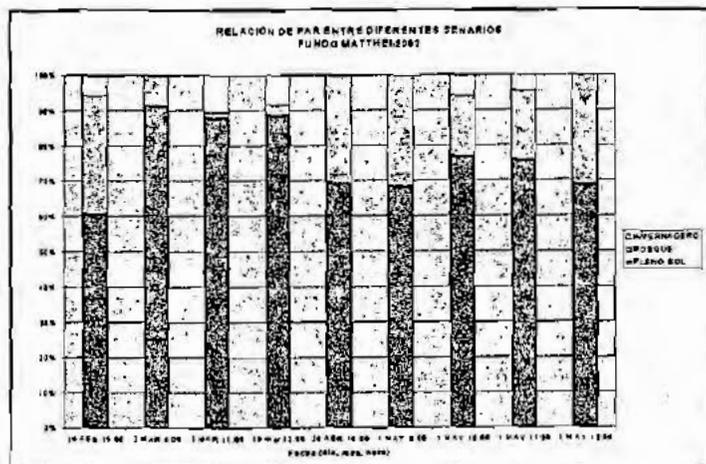


FIGURA 14 Relación del porcentaje de PAR que recibe a pleno sol, bajo el dosel del bosque y dentro del invernadero viejo según la fecha.

En general el piso del bosque recibió 3 veces más PAR que dentro del invernadero. Las inflorescencias dentro del invernadero eran más grandes, más altas y con un mayor número de flores que en el bosque. Las hojas eran más verdes, largas y lacias. Las hojas indican que el invernadero falta luz durante periodo III y IV.

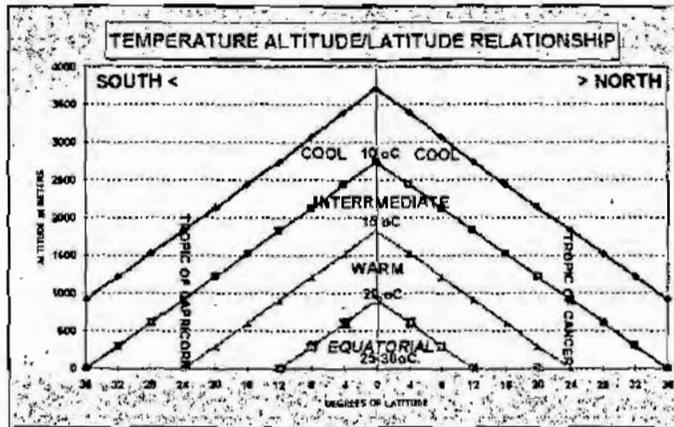
Si el invernadero falta luz, la pregunta es porque tiene una flor más grande. Propongo que la repuesta tenga su origen en la iluminación acumulada. Se acumula más durante la vida anual de la orquídea que a pleno sol y dentro el bosque. Primero tiene hojas verdes hasta el término de su floración mientras a pleno sol las hojas empiezan ser dañadas antes de la antesis. Esta significa que a pleno sol la orquídea tiene que desviar energía para la flor, para la reparación del daño hecho por la sobre iluminación. Hay que agregar una variable más a esta ecuación, que durante este tiempo el invernadero no falta agua en el suelo (35kPa) para crecimiento a la profundidad de 10cm, como ocurre en el bosque (199kPa) y a pleno sol (99kPa) la planta utiliza menos energía en transporta el agua para la conversión de la energía.

Las plantas nuevas puede que están produciendo inflorescencias (15%) más rápido por la razón que en el invernadero tienen hojas 12 meses por año (verse 8-9 meses a pleno) y acumula energía por esta vía.

5.2.2 Resultados de evaluación de temperaturas

Tomando encuentra la clasificación de Gilbert de su libro "The Charm of Growing Orchids" (puede apreciar que el tipo de orquídea que tenemos es "Cool" cerca a "Intermedio". Utilizado la información geográfica con en el de la latitud de 37°S con una altitud de menos que 50msnm resulta en una orquídea que debe ser clasificado como fresco. Esta es diferente que con la clasificación agro clima escrito por Guerrero, 1996 que es 14°C, lo cual indica que es un clima intermedio. El dato que utilizó Guerrero era basado no en el clima (esta definición requiere un mínimo de 50 año de dato), pero en el promedio de tiempo de 20 años, lo cual está basado en una periodo de calentamiento lento. El año de 2002, nuestro periodo de registro, era el segundo año más caluroso en 600 años (ver para 100 años

de dato). El otro era 1998 cuando empezamos el proyecto. Por estas razones debemos tomar con cuidado la clasificación, porque NOAA indica que para nuestra área, la desviación puede ser entre 1°C a 4°C. Además puede notar que durante la historia de la estación de Chillán las temperaturas estaban más altas que los normales, según estimado por NOAA



Tipificación climática del origen de las orquídeas con relación a la latitud y altura (Fuente: Gilbert)

En el Gráfico 1 se muestra tres variables registrado con el HOBO:

- La variación diaria de la temperatura de aire.
- Los grados días (base 5°C sin un máximo) acumulados desde la iniciación de elongación de la yema vegetativa del cuello hasta su terminación de la floración.
- Los puntos morfológicos importantes de la *Chloraea*.

Temperaturas extremas.

La *Chloraea* parece tener mucha resistencia a las temperaturas bajo cero. Cuando las plantas están creciendo durante los meses julio y agosto la temperatura de la orquídea tolera entre -3° C hasta -6° C durante varios días sin daño visible a las hojas. También se debe notar que hay temperaturas a -3° C durante el fin de agosto cuando hay alguna inflorescencia presente, y tampoco existía daño.

Las temperaturas altas a 10cm sobre el suelo, bajo 75% sombra no sobre pasan a 42° C cuando no hay hojas y no sobre pasen 33° C (Gráfico 1) cuando hay hojas. La temperatura de la hoja a temperaturas mayor que el punto de condensación son alrededor de 3° C más baja de la temperatura del aire ¿Puede ser esta relacionada con la muerte de las hojas? Es poco probable porque bajo el dosel las temperaturas del aire no sobre pasaron 39° C durante el periodo vegetativo de la orquídea (Gráfico 4). En el mismos gráfico se puede notar que la temperatura cuando no hay hojas llegó a 54° C.

Es importante recalcar la importancia del viento en estas temperaturas. Como el vivero de sombra y a pleno sol está al lado de uno y el otro el viento mantuvo las temperaturas similares. La alta temperatura registrada en el bosque es el resultado del poco viento bajo el dosel. Indicando la importancia de dejar pasar los vientos por el invernadero.

Hay una diferencia también de temperaturas del aire a 10cm, extremas mínimas entre el vivero con 75% sombra, el invernadero y bajo el dosel de pino. El vivero tenía la temperatura mínima de -6°C , mientras bajo el dosel y dentro del invernadero, la temperatura mínima nunca era menor que -2°C (dato no mostrado). Esta diferencia es totalmente lógica en que el dosel no permite que se pierda el calor por radiación al cielo, y además, los árboles actúan como tambores de agua, en que acumulan calor durante el día y entregando el calor durante la noche.

Grados Días

Como las plantas son clasificadas como frescas o intermedias, y no se conoce el umbral de germinación se utilizó el umbral de 5°C como temperatura mínimo de crecimiento. Para determinar el umbral máximo y no había muchas temperaturas más altas que 35°C y temperatura menor que esta no tiene un efecto negativo sobre crecimiento en la mayoría de plantas no utilizó un umbral máximo.

Debe notar dos puntos importantes.

1º punto de inflexión: La primera inflexión está ubicada al fin del febrero del año 2002 (ver Gráfico 1). Hay un fuerte cambio en la temperatura máxima durante el día, pero un pequeño cambio en la temperatura mínimo de la noche. ¿Puede ser esta el mecanismo de estímulo la reiniciación del crecimiento? La yema vegetativa se encuentra a una profundidad entre 30mm a 70mm bajo el nivel del suelo, donde las temperaturas altas todavía tienen una influencia durante el día, pero mucho menor (ver Gráfico 4). Agrega a esta el hecho que la yema no puede responder inmediatamente cuando hay un cambio, porque tiene que desarrollarse de una pequeña yema a una yema visible, es entendible que el crecimiento podía demorar entre 1 y 2 semanas para aparecer la primera yema desde el cuello.

Es interesante que la hoja visible apareció casi un mes después que la iniciación de la yema vegetal. Esta significa que para el primer mes el crecimiento tiene que ser de las reservas. Si las reservas estaban agotadas por la falta o exceso de luz, estas pueden ayudar a explicar la lentitud.

2º punto de inflexión: ocurrió al medio de agosto. Cerca de esta fecha la orquídea empezó a mostrar indicaciones de la elongación de su inflorescencia, que estaba iniciando en el mes de julio. Esta inflorescencia es notada porque las hojas centrales crecen más vertical que las orquídeas que no florecen.

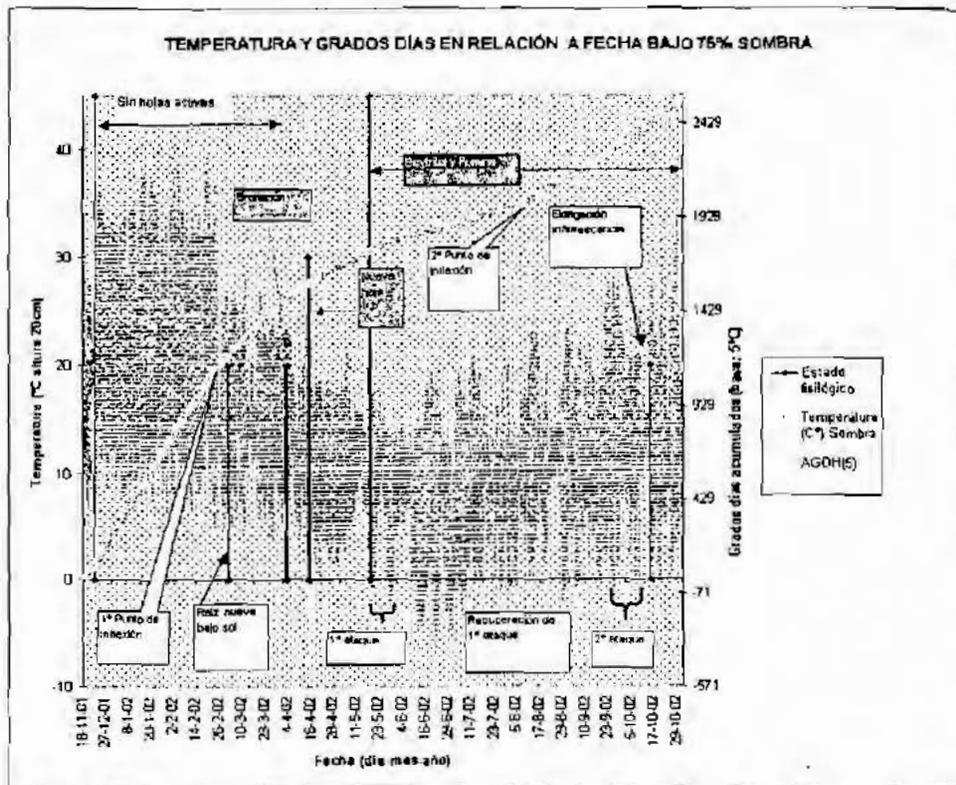


Gráfico 1: Dato de temperatura según la fecha a 10cm sobre el nivel del suelo, registrado en el vivero de Matthei, bajo 75% sombra y los grados días acumulados (línea azul) incluyendo los momentos morfológicos de la *Chloraea*.

Cuando compara los grados días entre a pleno sol, bajo el dosel del pino y bajo 75% sombra no se nota tanto la diferencia (ver Gráfico 2). El mayor diferencia es entre los dos de bajo dosel / a pleno sol que acumularon más calor durante mayo que los dos, sombra 75% / invernadero. El bosque empezó a ser más frío que todos durante julio y siguió esta tendencia hasta octubre. Desde julio hasta el fin del periodo de crecimiento el invernadero y bajo 75% sombra siempre acumuló un muy poco menos calor que a pleno sol.

Esta indica que durante el mayor parte del periodo de crecimiento a pleno sol y el bosque tiene la ventaja de crecer más rápido cuando tiene muy pocas hojas durante mayo, pero la velocidad es casi igual durante el resto del año, para pleno sol con una pequeña ventaja a pleno sol, invernadero y sombra 75% mientras bajo dosel pierde su ventaja justo cuando debe estar guardando energía para la floración y futuro crecimientos (julio a octubre).

Esto significa que la planta a pleno sol tienen más calor durante julio y tiene la desventaja de recibir los fríos mayores, que puede demorar 1 a 2 días de recuperar. Hay factor desconocido que es el daño causado por las temperaturas altas a pleno sol. El bosque no tiene el problema con la temperatura baja, pero falta temperatura durante la formación de los azúcares.

Son interesantes los puntos de cambio 2, 3 y 4 indicado en G. Donde el punto de deflexión de la curva de crecimiento relativo a las orquídeas y se nota una relación con los puntos de deflexión en los grados días acumulados. No hay suficiente información para concluir algo, pero hay una indicación que las hojas en el invernadero podrían estar creciendo mejor con temperaturas bajas antes que cambio a 2 (12° C en el día y 5 en la noche), pero cuando llega a temperaturas cerca a 0° C en la noche (entre cambio 2 y 3), las hojas empiezan a crecer a un ritmo más lento. Después del cambio a 4 las temperaturas en el invernadero son un máximo de 15° C y un mínimo de 7° C.

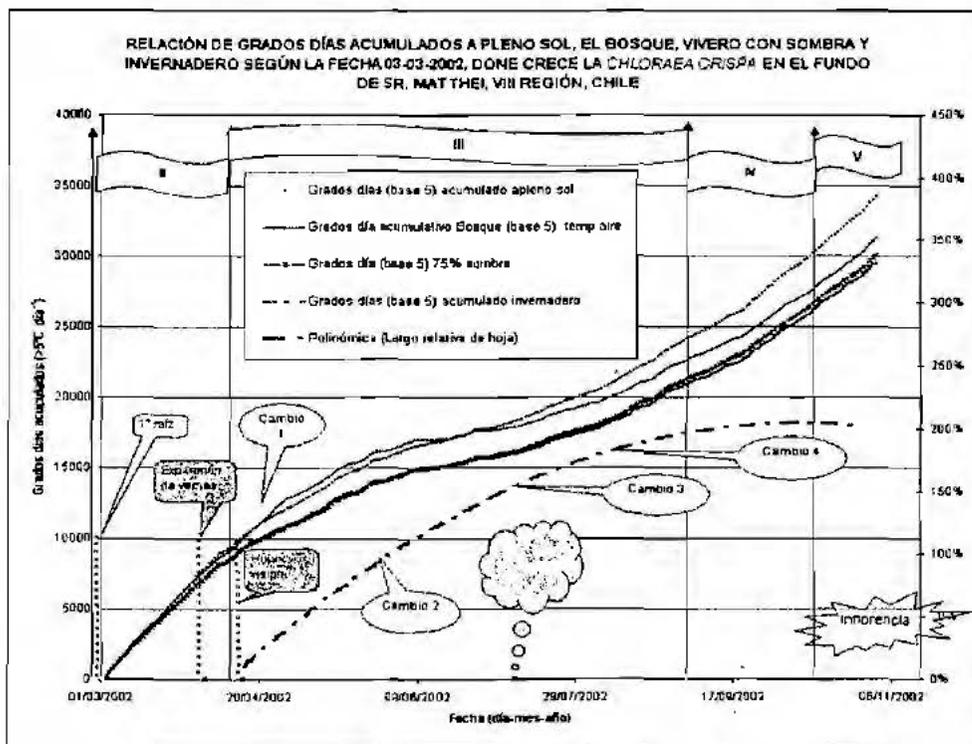


Gráfico 2: Grados días acumulados bajo el dosel del pino, a pleno sol y bajo 75% sombra en relación con el crecimiento relativa de la área superficial de las hojas de la *Chloraea* spp. en el fundo de Sr. Matthei.

Variación entre la temperatura máxima y mínima.

En muchas orquídeas la variación de temperatura entre noche y día es relacionada con la iniciación de la inflorescencia. Con algunas orquídeas la falta de esta diferencia hace que menos florezcan y que la vara sea débil con distorsión, menos plantas florecen y/o florece con menos esplendor.

La clasificación de tibia reacciona a una diferencia de 11° a 14° C con temperaturas entre 15° C y 35° C y un poco de variación entre día y noche para que puedan desarrollar la inflorescencia. Intermedio con temperatura entre 15° C y 28° C, con una importante variación entre día y noche. Las estaciones del año están muy marcadas. Fresca es cuando las temperaturas anuales están entre 0° C y 15° C con una variación de temperatura entre día y noche.

Si analizamos la variación damos cuenta que en el año caluroso de 2002, la temperatura durante el julio tiene una variación promedio de sólo 10° C, cuando todavía no hay señal de la formación de la inflorescencia (ver Gráfico 2).

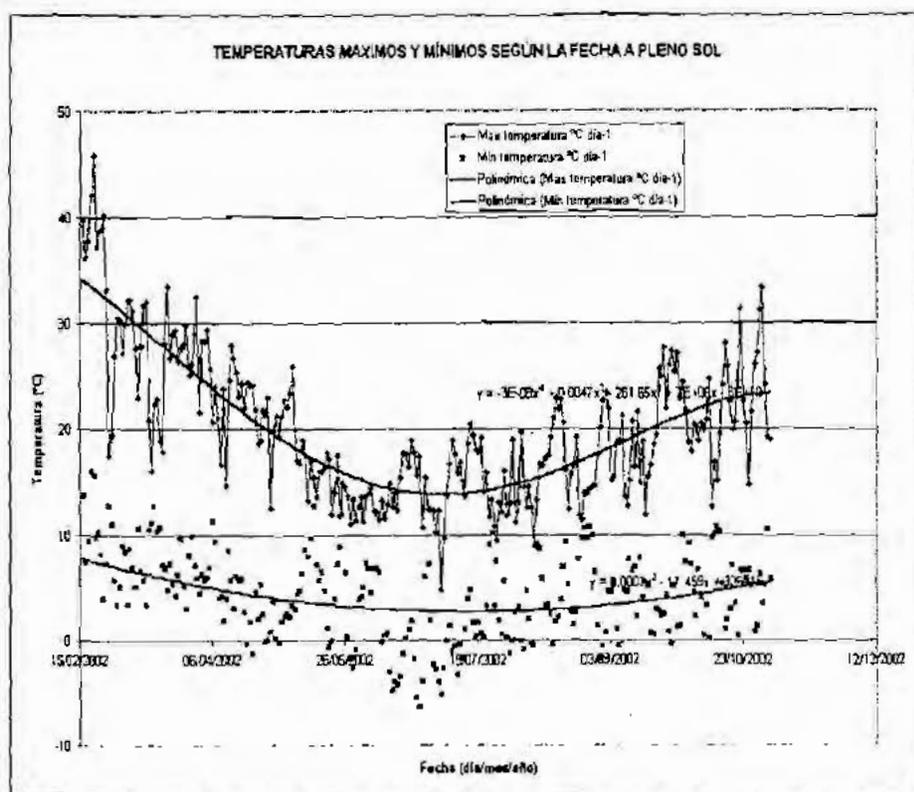


Gráfico 2: Las temperaturas máximas y mínimas absolutas según la fecha con su curva.

Desde el fin de julio y durante agosto, empieza una aumento en la variación, y esta es cuando se notó una diferenciación en la *Chloraea* y su órgano de reproducción.

Siendo que las temperaturas deben ser unos grados más bajas que la indicada, igualmente muestra que la planta tiene una temperatura bastante normal para su crecimiento siendo que es durante pocas horas. (ver G entre cambio 2 y 3). Desde cambio 3, no solo aumenta la variación pero también los grados días entregando más energía a la formación del órgano reproductivo.

Daño por *Botrytis* sp. y *Phoma* sp.

En la siguiente sección se presenta el resultado de un análisis de la frecuencia anual de las condiciones aptas para la ocurrencia de la infección del hongo *Botrytis*. y otros.

El problema más dominante este año en el vivero donde 99% de las hojas en el vivero y 25% de las hojas en el invernadero de las plantas fueron destruidas dos veces durante el año era los hongos *Botrytis* y *Phoma*. Con el dato de este año fue el primero año con registros de las condiciones ambientales, se presenta una análisis para estimar los costos de su control y las opciones para su control.

Como otros hongos, *Botrytis* tiene requerimientos de un rango específico de temperatura y humedad relativa del aire cuando los esporos están sobre la planta dentro una película de agua. En general *Botrytis* cuando está en una película de agua, infecta su huésped después de 8 a 12 en una temperatura de 12,8 a 23,9° C y una humedad de 93% del aire en el lugar donde encuentra las esporas de *Botrytis*.

Analizando los datos durante el año bajo la sombra que están condicionados entre los parámetros indicado anteriormente, puede ser visualizados en el Gráfico siguiente que muestra los condiciones en el vivero bajo una malla Rashel 75%.

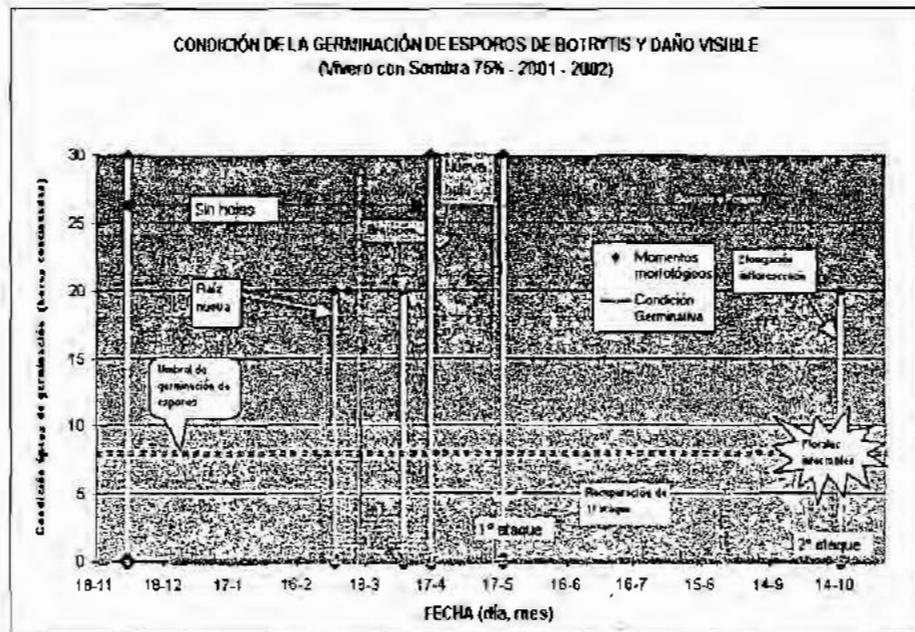


Gráfico 3: El gráfico indica las horas acumuladas cuando las condiciones son aptas para la germinación de los esporos de *Botrytis* spp. y su relación con el daño visto como ataque en la *Chlorea* spp. y algunos momentos morfológicos relacionadas con esta germinación.

En el Gráfico 3 puede apreciar que sólo dos veces, las fecha de 14 de mayo y 13 de octubre, existían condiciones para la infección de *Botrytis*. En el gráfico está indicado la infección con las palabras de 1º ataque y 2º ataque. Si somos capaces de extender el período de crecimiento vegetativo a un largo de 11 meses, estos dos ataques cambia a 6. Tendrán que incluir esta en sus nuevos costos.

Esta significa que un control durante un año tan lluvioso, como este año, es posible y debe ser económico. Sólo necesitamos un instrumento para indicar los momentos aptos para la germinación de los hongos.

IMPORTANCIA DE LA PRECIPITACIÓN

La mayoría de las plantas activa su crecimiento cuando hay suficiente agua libre en el suelo y la humedad en el suelo tiene una presión a más alta que -10 bares. Este año fue un año muy lluvioso en cantidad y duración, entonces pudimos verificar esta hipótesis.

La evidencia del año 2003 muestra la poca importancia del agua libre en el suelo para la activación del crecimiento. Es muy importante a tomar en cuenta que el crecimiento del rizoma empezó un mes ANTES que la elongación de la yema vegetativa y antes 2 semanas antes que la primera lluvia. Si este evento se repite año que viene, significa que manejando la temperatura podía ser suficiente para aumentar en 1 mes el crecimiento. Esta es como cortar el tiempo entre la germinación y floración en un 18%

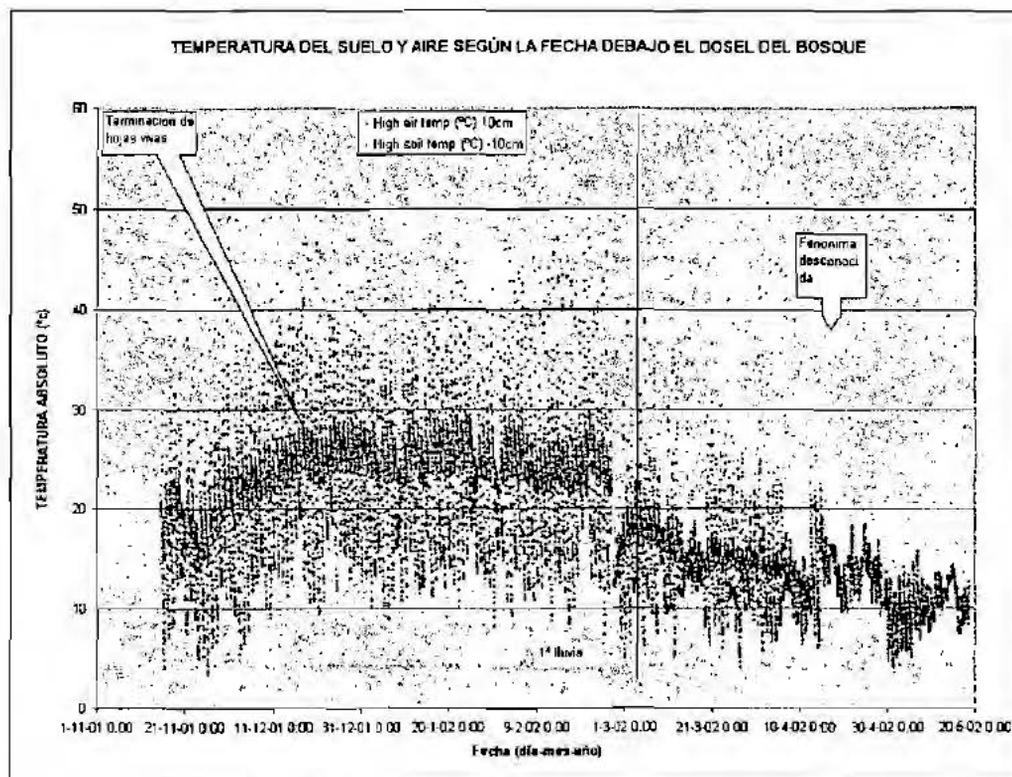


Gráfico 4: Datos de temperatura del aire (azul) a 10cm sobre el nivel de suelo y a -10cm del nivel del suelo (rojo) bajo el dosel de pino, según la fecha en el fundo de Matthei.

5.2.3. Resultados del análisis físico del suelo

CUADRO 27 Curva característica de humedad

Humedad volumétrica % v/v (θ)	Tensión (bar)
0.1652	0.33
0.083	15

$$S = 1.522 \times 10^{-5} \theta^{-5.5449}$$

$$D_a = 1.09 \text{ gr/cc}$$

$$D_r = 2.65 \text{ gr/cc}$$

El suelo posee una porosidad de 58%, principalmente constituidos por macroporos, reflejando el origen del suelo de tipo arenales (textura arenosa), que se han formado de dunas estabilizadas por la vegetación acompañante. En términos de cultivo es un suelo sin problemas de drenaje y liviano, lo que permite el cultivo de especies de órgano subterráneo (sin problema de daño mecánico). La capacidad de retención de agua de estos suelo es muy baja, producto de su textura y bajo contenido de materia orgánica, por tanto es importante la incorporación de riego presurizado a nivel de cultivo bajo invernadero.

5.3. Resultados de fertilizaciones en macetas

Distribución del porcentaje de varas no inducidas e inducidas, en el segundo año de evaluación

TRATAMIENTOS	Porcentaje de Varas	
	No Inducidas	Inducidas
Plantas florales 2000.	93.3	6.7
Plantas no florales 2000.	56.7	43.3
Con fertilización 2001.	70.0	30.0
Sin fertilización 2001.	80.0	20.0
Plantas florales 2000, con fertilización.	93.3	6.7
Plantas florales 2000, sin fertilización.	93.3	6.7
Plantas no florales 2000, con fertilización.	46.7	53.3
Plantas no florales 2000, sin fertilización.	66.7	33.3

Cuadro 22. Distribución de porcentaje de varas inducidas

El cuadro indica que aunque en baja proporción al aplicar fertilizaciones se logra revertir la bianualidad del proceso, la realización de nuevas experiencias en este tópico son necesarias para establecer algún tipo de conclusión.

Fertilizaciones foliares

Las fertilizaciones foliares con periodicidad de 8 a 10 días con el producto hyvron permitieron un buen crecimiento sin evidenciar muestras de salinidad, La que fue observado en aplicaciones al suelo de Phostrogen en dosis media o una pastilla al mes.

Con respecto al riego esta especie responde bien al riego por goteo

5.4. Resultados de postcosecha duración de las inflorescencias de *Chloraea crispa* (material traído desde Yumbel a Quillota)

Número de flores

Del análisis de la evaluación de los tratamientos se determinó que existe efecto significativo de ambos factores por separado sobre el número de flores por inflorescencia (cuadro 3), desarrollándose mayor número de flores en aquellas inflorescencias provenientes del estado E3, E2 y sin almacenaje (T_0), debido a que muchos botones florales apicales se marchitaron antes de la antesis, especialmente en los tratamientos T_1 y T_2 .

El bajo número de flores en el estado E1, puede ser el resultado de la cosecha prematura de las inflorescencias, las cuales no alcanzaron a desarrollarse completamente.

Porcentaje de flores abiertas

En general en todos los tratamientos hubo un bajo porcentaje de flores abiertas, sin embargo se evidencia efecto significativo de ambos factores por separado sobre el parámetro evaluado (cuadro 3), satisfactoriamente alrededor del 45% de flores abiertas se observó en el estado E3 (cuadro 4), siendo el estado de desarrollo más efectivo en lograr mayor cantidad de flores, evaluado a 12 días después de la cosecha. Además se observa que los estados florales más cercanos a la antesis de la primera flor, son los que permiten un mejor desarrollo floral en post cosecha.

De otra manera, no existe efecto significativo de los tratamientos de post cosecha (almacenaje en cámara) sobre el porcentaje de flores abiertas, siendo el tratamiento T₀ (testigo) el más efectivo, que permitió un mayor porcentaje de flores abierta (cuadro 23).

Evidenciando, que en futuras investigaciones se deberán utilizar otros tratamientos de post cosecha que permitan una mejor prolongación de vida en florero de estas plantas.

Cuadro 23. Evaluación de los tratamientos

E° Desarrollo ₁	Tratamientos	N° flores (Rango)	% Flores abiertas ₂	Peso ₃	Largo ₃	Peso ₄	Largo ₄	Peso ₅	Largo ₅
E1	T ₀	11(10-12)	22.9	51.6	70.4	51	71.83	43.6	72.1
	T ₁	12(12-12)	16.7	45.6	65.5	51.6	68.53	48.6	68.3
	T ₂	11.6(10-13)	9.5	43	62.9	49.3	72.5	46.3	73.4
E2	T ₀	15(14-17)	32.5	52	71.6	52.6	73.1	48	72.3
	T ₁	16.3(15-18)	22.5	56.6	76.6	58	80.06	53	80.4
	T ₂	13.3(12-15)	18.5	61.3	69.8	68	76.5	66.6	80.8
E3	T ₀	13.3(12-14)	44.7	52.3	76.5	52.3	74.66	48.6	78.3
	T ₁	16(14-18)	38.1	61.6	82.3	62.3	86.86	55.6	88.5
	T ₂	13(12-14)	32.3	41	66.1	49.6	73	47.6	74.1
E° Desarrollo		14.49*	12.19*	NS	4.9*	NS	NS	NS	3.32*
	Tratamientos	5.9*	9.52*	NS	4.79*	NS	NS	NS	NS
α=0.05	DXT	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

1 tratamientos y términos están descritos en la metodología

2 mediciones a 12 días de iniciado el experimento

3 mediciones a 7 días de iniciado el experimento

4 mediciones a 12 días de iniciado el experimento

5 mediciones a 19 días de iniciado el experimento

Peso y Largo de las inflorescencias

No se observó efecto significativo de los tratamientos sobre el peso de las inflorescencias (cuadro), no obstante se observó una pérdida de peso en el transcurso de las mediciones, producto del deterioro

del material vegetal, evidenciando la necesidad de algún tratamiento de post cosecha que permita reducir el metabolismo y permita mantener un buen stock de reservas.

En general se observó elongación de las inflorescencias en todos los tratamientos. Sin embargo existen evidencias significativas en los tratamientos al inicio y al final del experimento (7 y 19 días, respectivamente). En ambas fechas el estado E3 es diferente al estado E1, pero igual al estado E2. Lo que permite respaldar lo inferido en el cuadro, estados cercanos a la antesis floral, manifiestan mejor desarrollo y elongación floral.

Durante el experimento se observó que alrededor del 30% de los escapos se curvaron, tal vez provocado por el peso de la inflorescencia que al elongarse el raquis debilita la sección por debajo de esta, causando la curvatura observada.

Cuadro 24 Porcentaje flores abiertas

E° desarrollo	Media
E1	29.82a
E2	32.66a
E3	44.74b
Tratamientos	
T0	44.1a
T1	33b
T2	30.1c

Valores con letras iguales en la columna no presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad $p=0.05$, según test de Tukey)

Cuadro 25. Largo de las inflorescencias

7 días de medición		19 días de medición	
	Media		Media
E° desarrollo		E° desarrollo	
E1	66.3a	E1	71.3a
E2	72.7ab	E2	77.8ab
E3	75b	E3	80.3b
Tratamientos			
T0	72.8a		
T1	74.8a		
T2	66.3b		

Valores con letras iguales en la columna no presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad $p=0.05$, según test de Tukey)

5.5. Resultados de detección experimental del sistemas reproductivos en *Chloraea crispa*

Cuadro 26 Resultado de cruzamientos experimentales

Tratamiento	Nº plantas	Nº flores	Nº frutos	% frutos	Nº frutos/flor
Xenogamia	12	14	12	85.7	0.85
Geitonogamia	12	16	15	93.8	0.93
Autogamia	12	23	0	0	0
Agamospermia	12	25	0	0	0
Control	15	149	19	12.8	0.12

La formación de frutos bajo condiciones de polinización natural fue baja, solo el 12.8% de las 149 flores marcadas en terreno formaron frutos. Resultados similares se reportaron para *Chloraea lamellata* (15.6%) (Lehnebach, 2003) y *Bipinnula fimbriata* (30.5%) (Cisternas y Lehnebach, 2001). Estos bajos porcentaje pueden ser por la falta de especificidad de los insectos y/o disminución de las poblaciones de insectos nativos por excesivas aplicaciones de pesticidas en la producción silvoagropecuaria.

Las flores polinizadas bajo los tratamientos de polinización cruzada y autopolinización fueron exitosas en la formación de frutos (85.7% y 93.8%, respectivamente), con un índice de autoincompatibilidad genética (ISI) de 1.09, lo que indica que *Chloraea crispa* es un planta autocompatible. Además no hubo formación de frutos en los tratamientos de autogamia y agamospermia (apomixis), siendo necesario agentes polinizantes para el éxito reproductivo.

5.6. Programa de hibridación (cruzamientos)

Pese a que no estaba considerado en los objetivos iniciales del proyecto y debido a las relevantes características de la especie como flor de corte, se seleccionaron los tipos plus y se realizó una polinización manual entre estos.

CUADRO 28 Cruzamientos dirigidos

Número	Parentales	Observaciones*
1	M2D6xM2D7	IE 2001-2002
2	M1A7xM1A6	IE 2001-2002
3	M1A7xM1A3	IE 2001-2002
4	Crispa plus	OP 2001-2002
5	M2A3xT1	IE 2001-2002
6	M1A7xM1A6	IE 2001-2002
7	M2A3xM2A3	X 2001-2002
8	M2D6xM2D6	X 2001-2002
9	M1A7xM2A6	IE 2001-2002
10	M1A7xM2D6	IE 2001-2002
11	M2D6xT1	IE 2001-2002
12	M1A6xM1A3	IE 2001-2002
13	M1A3xM1A3	X 2001-2002
14	T1xT1	X 2002-2003
15	T1xT2	I 2002-2003
16	T2xT2	X 2002-2003
17	T2xT3	I 2002-2003
18	T2xT4	I 2002-2003
19	T3xT2	I 2002-2003
20	T3xT3	X 2002-2003
21	T4xT4	X 2002-2003
22	T4xT1	I 2002-2003

OP: Polinización abierta

X: Autopolinización dirigida

IE: Polinización cruzada inter-específica

I: Polinización cruzada intra-específica

*: Temporada en que se realizó el cruzamiento

Todas las semillas de los cruzamientos de la temporada 2001-2002, fue enviada a la Dra. X. Calderón (U. Talca), para ser germinadas vía cultivo *in-vitro*.

También se recolectó un grupo de cápsulas pertenecientes a diferentes especies del género enviada también a Talca.

CUADRO 29 Semilla de diferentes especies de *Chibraea*

Número	Especie
1	C. incisa
2	C. virescens
3	C. crispa
4	C. crispa
5	C. longipetala
6	C. crispa
7	C. gavilu
8	C. galeata

5.7. Reproducción sexual: Germinación simbiótica

Producción de plántulas a partir de Semillas inoculadas

Esquema seguido para la obtención de plantas a partir de semilla inoculada

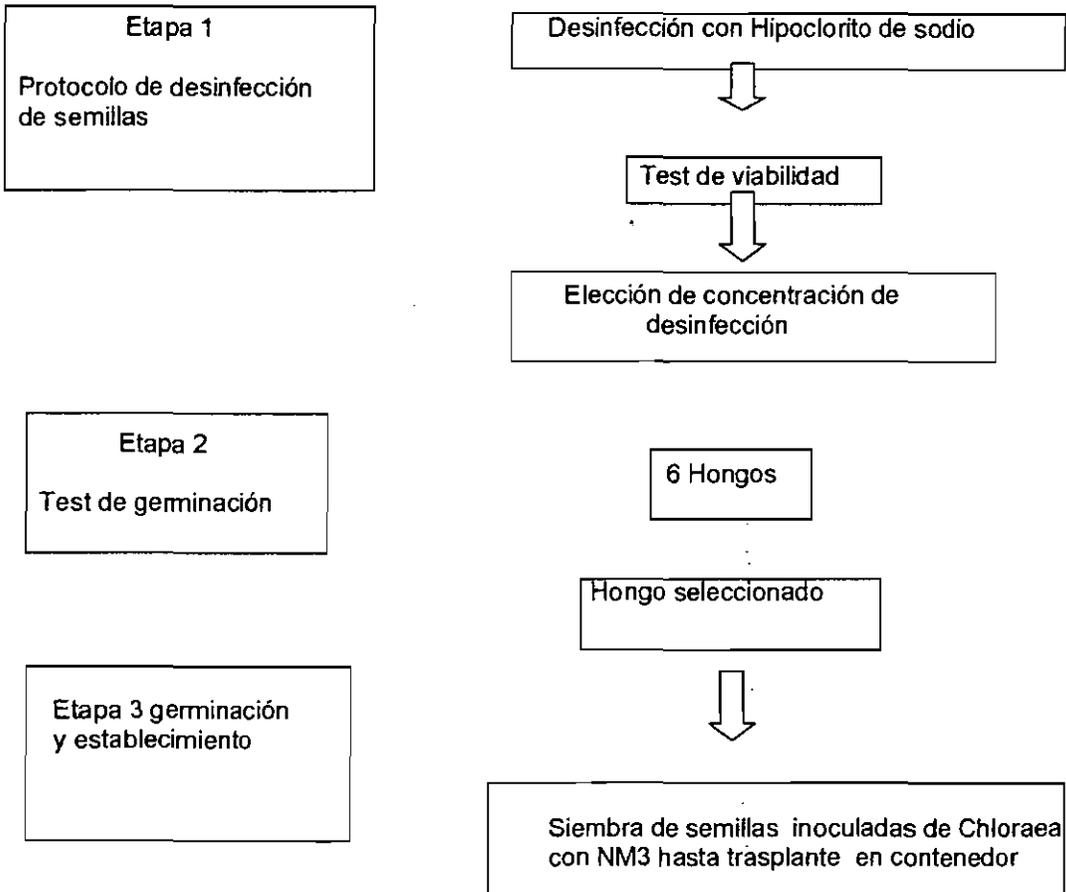


FIGURA 15: Secuencia de etapas ocupadas para poder realizar una siembra.

5.7.1 Protocolo de desinfección de semillas

5.7.1.1. Uso de hipoclorito de sodio

En este ensayo se evaluó el efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% y al 10% durante 0, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos, sobre la viabilidad de semillas de *Chloraea crista*. Debido a lo pequeño de la semilla se tomó como unidad experimental un lote correspondiente a 1 mg el cual contiene aproximadamente 540 más/menos 92 semillas

CUADRO 30. Efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, en base al test de tetrazolium, a diferentes tiempos, en la viabilidad de las semillas de *Chloraea crispera* (promedio de tres repeticiones). Partiendo de un lote de 540 unidades app.

Minutos	Semillas Vivas
0	91,7
1	38,7
2	55,3
3	1,7
4	0
5	3

CUADRO 31. Efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) al 10%, en base al test de tetrazolium, a diferentes tiempos, en la viabilidad de semillas de *Chloraea crispera* (promedio de tres repeticiones).

Minutos	Semillas Vivas
0	91,7
1	32
2	2,7
3	0
4	7,3
5	0

El cuadro 30 indica que sobre dos minutos de desinfección con hipoclorito de sodio al 5 % (producto comercial) se pierde la viabilidad de las semillas, cuando el tiempo de desinfección se incrementa hasta 5 minutos. Con concentraciones de 10% de NaClO (cuadro 31), y con tiempos mayores a 1 minuto se observa pérdida de viabilidad en las semillas tratadas.

En referencia a desinfección GARCIGA (2003) utiliza dosis de un 2% de cloro, por tres minutos, para desinfectar semillas de sorgo que formaran parte de un cultivo en maceta, para la reproducción de hongos formadores de micorriza.

CUADRO 31. Resumen del efecto de ambos tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) a diferentes concentraciones y tiempos, sobre la viabilidad de las semillas de *Chloraea crispera*.

Tiempo(Minutos)	0	1	2	3	4	5
[(NaClO)]						
10%	+	+	-	-	+	-
5%	+	+	+	-	-	-

+: Existencia de por lo menos un 5% de semillas vivas

-: No existieron semillas vivas

5.7.1.2 Test de tetrazolium

La evaluación de las semillas vivas y muertas se realizó en base al test de tetrazolium, descrito en el capítulo de metodología, a continuación se presenta el aspecto de las semillas vivas y muertas al observarlas bajo lupa. Las semillas vivas presentan color rosado a rojizo. (Figura 16).



Figura 16 test de tetrazolium aplicado a semillas de *Chloraea crispa* Quillota 2003

5.7.2. Determinación del carácter micorrícico de un grupo de aislados

En el Cuadro 32 se detallan las etapas de germinación definidas por MITCHELL (1989) de las semillas de *Chloraea crispa* sembradas sobre los seis hongos evaluados. Las semillas sembradas sobre los hongos NM2 y NM4 llegaron solo a la etapa de imbibición, en cambio, aquellas sembradas sobre el hongo NM3 formaron protocormos y brotes de 1 a 2 mm de largo.

CUADRO 32. Efecto de seis hongos, sobre las etapas de germinación de semillas de *Chloraea crispa*.

Hongos evaluados	Etapas de germinación según MITCHELL (1989)
M2	0
NM1	0
NM2	1
NM3	4
NM4	1
618	0

En las placas inoculadas con el hongo NM3 se observaron todas las etapas de germinación planteadas por MITCHELL (1989). La imbibición de las semillas comenzó cinco días después de la siembra, tres días más tarde el embrión fue observado emergiendo de la testa y después de cuatro días se veía el micelio del hongo introduciéndose en la semilla (Figura 17).

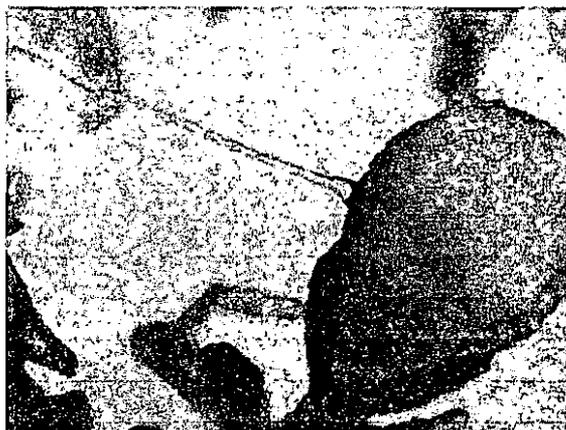


Figura 17 semillas de Chloraea en que se aprecia el inicio del desarrollo de hifas de micorrizas (Quillota 2003)

Dos meses después de la siembra, sólo las semillas sembradas en el hongo NM3, habían formado protocormo, raíces o incluso un brote de hasta 3 mm. Por lo tanto el hongo NM3, fue el único que provocó una micorrización exitosa.

Figura 18

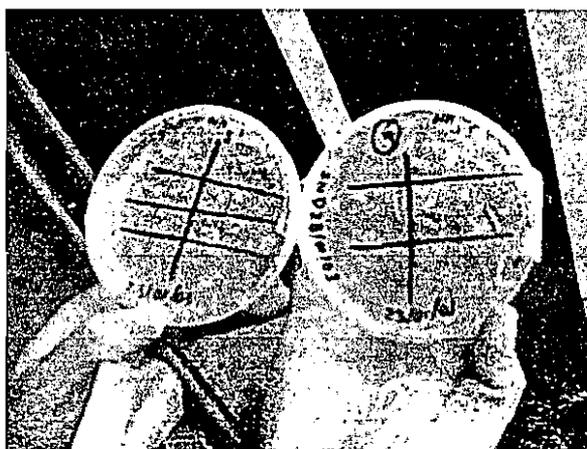


Figura 18 Crecimiento de protocormos con micorriza NM3 (Quillota 2003)

Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas a cepellones de turba dentro de envases de plástico transparente sellados. Inicialmente las plántulas se desarrollaron en forme exitosa, sin embargo, una vez abiertos los envases de plástico, las plántulas no lograron sobrevivir, probablemente por que el cepellón de turba perdió humedad rápidamente y por lo tanto las plántulas se deshidrataron.

Un análisis desarrollado por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Católica de Valparaíso, determinó que el hongo NM3, corresponde al género *Rhizoctonia*. Esto concuerda con información bibliográfica, en el sentido que muchas micorrizas pertenecen a este género (ARDITTI, 1982, MICORRIZA, 2002).

5.7.3. Efecto de la inoculación con micorrizas y desinfección de semillas

En este ensayo se evaluó la siembra de semillas desinfectadas y control sobre medio con y sin inoculación con el hongo NM3.

CUADRO 33. Cantidad de semillas de *Chloraea crispera* germinadas a partir de 2 mg* \pm 0.1 mg. Promedio de cuatro observaciones.

Tratamiento	Semillas germinadas
T1: Semillas desinfectadas sembradas sobre NM3	176
T2: Semillas no desinfectadas, sembradas sobre NM3	64
T3: Semillas desinfectadas sembradas sobre placa sin inocular	0
T4: Semillas no desinfectadas sembradas sobre placa sin inocular.	0

* 1 mg de semilla de *Chloraea crispera* contiene 540 \pm 92 unidades

De los cuatro tratamientos evaluados, solo en aquellos en que se sembró sobre el hongo NM3, se produjo germinación de semillas de *Chloraea crispera*. En el Cuadro 33 se observa la cantidad promedio de semillas germinadas por tratamiento, una semana después de la siembra.

Es interesante destacar el efecto del hongo micorrícico NM3 sobre el desarrollo de semilla de *Chloraea crispera*. El tratamiento que contenía semillas no desinfectadas sembradas sobre placas sin inocular, a los 14 días mostró un intenso crecimiento de micelio café verdoso, es decir un alto nivel de contaminación (Figura 19), en tanto el tratamiento T2, siembra de semillas no desinfectadas sobre placas inocuadas con el hongo presentó una apariencia completamente distinta, no se observó crecimiento de microorganismos. Esto puede indicar, que el hongo NM3 tiene incidencia sobre el ataque de otros patógenos en el proceso de germinación.

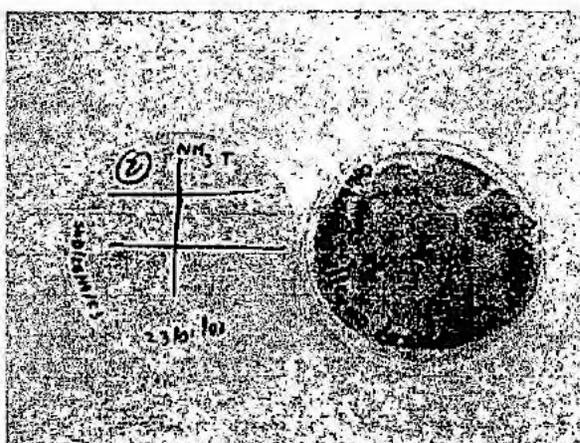


FIGURA 19 Comparación del efecto de la micorriza NM3 y semilla no desinfectada y no inoculada (Quillota 2003)

Otros autores afirman, que las micorrizas tienen un efecto similar en plantas adultas. BORIE (1986), indica que las micorrizas confieren a las plantas una mayor capacidad para resistir o tolerar el ataque de patógenos, AZCÓN-AGUILAR y BAREA (1996) establecen que uno de los mecanismos propuestos para las interacciones de las endomicorrizas con microorganismos patógenos en las plantas hospedadoras es la competencia por los sitios de infección en la raíz y los fotosintatos de la planta como fuente de carbono. Por otra parte GIL (1994), afirma que otra forma de defensa que las

micorrizas confieren al hospedero, está relacionada con la secreción de antibióticos por parte de los hongos que impiden el desarrollo de bioantagonistas. Al respecto GARRIDO (2002), afirma que *Chloraea gaviu* posee un hongo endosito que presenta compuestos con actividad antibiótica a un amplio espectro de bacterias, los cuales le otorgarían resistencia frente a una contaminación bacteriana, estos compuestos también mostraron un efecto antihongos, aunque se observó una inhibición difusa. Debido a la cercanía taxonómica entre *C gaviu* y *C crispa* es posible encontrar el efecto descrito también en esta última especie.

Los resultados obtenidos indicarían también, que la desinfección no es necesaria si el hongo micorriza está presente en el sustrato de siembra, sin embargo, la cantidad de semillas germinadas mediante cultivos simbióticos, es mayor cuando estas son desinfectadas.

Observaciones semanales, que no fueron cuantificadas numéricamente, mostraron un desarrollo menor de las plántulas pertenecientes al tratamiento 1 (semillas desinfectadas sobre medio inoculado) comparadas con las del tratamiento 2 (semillas no desinfectadas sembradas sobre medio inoculado), esto indicaría que las concentraciones de desinfección con hipoclorito de sodio al 2% por 3 minutos, son aún muy altas para desinfectar las semillas de esta especie. Esto concuerda con la información de CLEMENTS y ELLIARD (1979), que utilizaron un 0.5 % de hipoclorito de sodio por 2 a 5 minutos, para desinfectar semillas de orquídeas terrestres australianas, y no reportan efectos detrimentales.

5.7.4. Siembra de semillas de *Chloraea crispa* en sustratos tradicionales

En una primera etapa se realizó la inoculación del sustrato, en forma indirecta mediante el aporte de semillas de mijo previamente inoculadas, en tres semanas es observable la inoculación de las semillas de mijo con el hongo seleccionado MN3, sin embargo los resultados de este tipo de inoculación no fueron los esperados y por lo tanto se procedió a establecer una siembra de protocormos inoculados

El segundo sistema de siembra contempla la siembra de protocormos que se hicieron germinar en agar inoculado con la micorriza. Una vez que los protocormos alcanzaron tamaños de 2 mm se trasladaron a macetas transparentes con sustratos estériles de turba y perlita, una vez realizada la siembra de los protocormos fueron selladas para mantener condiciones de alta humedad, posteriormente se abrieron paulatinamente dichos envases, este método permite que un 10 a 15 % de las semillas sobrevivan hasta formar dos pequeñas hojas. (figura 20)



Figura 20 plantas de semillas inoculadas con MN3 en crecimiento en una mezcla de turba y perlita (Quillota 2003)

5.7.5. Protocolo de conteo de semillas

Adicionalmente a los ensayos presentados, se estableció un protocolo de conteo de semillas con el fin de poder cuantificar de mejor manera los porcentajes de germinación, y otras variables que se refieren a número de individuos, ya que debido al tamaño de estas semillas y a poseer una alta estática todas las evaluaciones hasta aquí presentadas fueron hechas en base a peso.

Para ello se distribuyó semilla en una placa para recuento de nematodos e inicialmente se pensó contar algunos de esos cuadros para establecer el número de semillas por unidad de superficie (cuadros) y correlacionarlas con un peso inicial, sin embargo, al esparcir las semillas, estas se adherían con gran facilidad a la sobre la placa de petri (alta estática), por lo que fue imposible lograr una homogeneidad tal que permitiera contar solo algunos cuadros escogidos al azar. Por lo tanto se contaron todas las semillas contenidas en $1 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$. Esta medición se realizó tres veces con el fin de establecer un promedio real de semillas por mg de peso.

Total de semillas por placa:

Placa 1: 614

Placa 2: 477

Placa 3: 531

Promedio: 540 semillas en 1mg *

*Con una desviación de un 17% de las muestras analizadas.

Debido a que las semillas contadas, correspondían a $0,001 \text{ g} \pm 0,1 \text{ mg}$, se dedujo entonces, que 1 g de semillas de *Chloraea crispera* contiene aproximadamente 540.000 semillas. Esto indica que las semillas de *Chloraea crispera*, podrían ser consideradas como grandes, ya que según VÁSQUEZ (1995) en un gramo de semillas de orquídeas se han contado, al microscopio, más de tres millones de semillas.

5.8.1. Tratamientos a partir de cápsulas inmaduras

Se observa que no hay cambios de estado en material proveniente de cápsulas pequeñas. Sólo se registra empardamiento del medio y del material cultivado. Sin embargo, tanto las cápsulas de tamaño medio como grande presentan fenolización y registran cambios de estado, llegando hasta estado 5 en el medio VW y observándose gran variabilidad entre la respuesta (Tablas 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 5a, 5b, 5c) Figs. 2, 3, 4 y 5) Se registra también producción de embriones somáticos de gran tamaño especialmente en el medio VW.

El medio VW es superior porque permite el desarrollo de estados más avanzados (Edo. 5) de los embriones (Fig. 4). Se caracteriza porque presenta gran incremento de la fenolización hasta el estado 2 (19 días), seguido por una notable disminución hasta no presentar fenolización en la última etapa (Fig. 3, 153 días). También el tamaño alcanzado hasta fecha es superior al otro tratamiento (Tabla x, Fig. x)

En el medio M1 se registra desarrollo de los protocormos en todos los frascos, pero sólo se llega al estado 3 (40 días), con abundante producción de embriones de considerable de menor tamaño que en tratamiento recién señalado (Fig. 2). Estos embriones también surgen de un tejido completamente fenolizado al comienzo del ensayo, llegando a un máximo entre estado 2 a 3 (26 días), seguido por una disminución sostenida hasta llegar a un nivel constante de 12,5 (Fig. 3).

Sólo las cápsulas inmaduras medianas y grandes responden desarrollando protocormos (Tabla 5a, 5b, y 5c). Las cápsulas inmaduras pequeñas no crecen (Tabla 2a, 2b y 2c; Fig. 5).

Los resultados de las Tablas 2, 3, 4 y 5 indican el Estado de desarrollo, liberación de fenoles al medio, tamaño de los protocormos y porcentaje de respuesta alcanzado en cada tamaño de las cápsulas A, B y C, respectivamente.

Tabla 2a. Evolución estados de desarrollo "Cápsulas tipo A". Tamaño pequeño frascos F1 al F4. Tamaños medianos y grande frascos F5 al F10.

N° Estado de desarrollo de las semillas

Frasco:

	0 días	5 días	26 días	40 días	59 días	76 días	91 días	110 días	141 días	160 días
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Media:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

5	0	1	3	3	3	3	3	3	3	3
6	0	1	2	3	3	3	3	3	3	3
7	0	1	2	3	3	3	3	3	3	3
8	0	1	3	3	3	3	3	3	3	3
9	0	1	3	3	3	3	3	3		3
10	0	1	2	3	3	3	3	3	3	3

Media:	0	1	2,5	3	3	3	3	3	3	3
--------	---	---	-----	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 2b. Evolución estados de desarrollo "Cápsulas tipo B". Tamaño pequeño frascos F1 al F5. Tamaños medianos del frasco F6 al F8 y grande frascos F9 al F13.

N° Estado de desarrollo de las semillas:

Frasco:

	0 días	12 días	19 días	33 días	52 días	69 días	84 días	103 días	134 días	153 días
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Media:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

6	0	2	3	3	3	3	3	3	4	4
7	0	2	3	3	3	3	4	4	4	5
8	0	0	0	0	3	4	4			
9	0	2	3	3	3	3	4	4	4	4
10	0	0	1	3	3	4	4	4	4	4
11	0	2	2	3	3	3	3	4	4	4
12	0	0	2	2	3	3	3	3	3	3

13	0	2	3	3	3	3	3	4	4	4
Media:	0,0	1,3	2,1	2,5	3,0	3,3	3,5	3,7	3,9	4,0

Tabla 2c. Evolución estados de desarrollo "Cápsulas tipo C". Todos los frascos tienen cápsulas tamaño grande.

Nº Estado de desarrollo de las semillas:
Frasco:

	0 días	11 días	30 días	47 días	62 días	81 días	112 días	131 días
1	- -	0	1	2	2	2	3	3
3	- -	1	2	2	2	2	2	2
4	- -	0	2	2	2	2	3	3
5	- -	1	2	2	2			
Media:	- -	0,5	1,8	2,0	2,0	2,0	2,7	2,7

Tabla 3a. Producción de fenoles "Cápsulas tipo A". Tamaño pequeño frascos F1 al F4. Tamaños medianos y grande frascos F5 al F10.

	0 días	5 días	26 días	40 días	59 días	76 días	91 días	110 días	141 días	160 días
1	- -	75	25	25	50	50	100	100	100	100
3	- -	75	100	100	100	100	100	100	100	100
4	- -	75	100	100	100	100	100	100	100	100
Media:	0,0	75,0	75,0	75,0	83,3	83,3	100,0	100,0	100	100
5	- -	25	25	25	20	0	0	25	50	25
6	- -	0	25	25	25	25	0	0	0	0
7	- -	0	50	50	50	25	25	0	50	25
8	- -	0	75	75	50	50	25	25	25	0
9	- -	0	75	75	50	50	50	25		25

	-									
10	- -	0	50	25	25	0	0	0	0	0
Media:	- -	4,2	50,0	45,8	36,7	25,0	16,7	12,5	25,0	12,5

Tabla 3b. Producción de fenoles "Cápsulas tipo B". Tamaño pequeño frascos F1 al F5. Tamaños medianos del frasco F6 al F8 y grande frascos F9 al F13.

	0 días	12 días	19 días	33 días	52 días	69 días	84 días	103 días	134 días	153 días
1	- -	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	- -	25	0	100	100	100	100	100	100	100
3	- -	25	100	100	100	100	100	100	100	100
4	- -	25	100	100	100	100	100	100	100	100
5	- -	25	75	100	100	100	100	100	100	100
Media:	- -	20	75	100	100	100	100	100	100	100
6	- -	50	75	75	50	0	0	0	0	0
7	- -	50	75	75	50	0	0	0	0	0
8	- -	25	25	25	25	25	0			
9	- -	50	50	50	25	0	0	0	0	0
10	- -	75	100	75	25	25	0	0	0	0
11	- -	50	75	50	50	25	25	25	0	0
12	- -	0	25	50	50	50	25	25	25	25
13	- -	50	75	75	25	25	0	0	0	0
Media:	- -	44	63	59	38	19	6	7	4	4

Tabla 3c. Producción de fenoles "Cápsulas tipo C". Todos los frascos tienen cápsulas tamaño grande.

	0 días	11 días	30 días	47 días	62 días	81 días	112 días	131 días
1	- -	50	75	75	50	50	50	50
3	- -	25	20	50	50	50	75	50
4	- -	100	100	100	75	75	75	50
5	- -	25	75	75	50			

Media:	- -	50	68	75	56	58	67	50
--------	-----	----	----	----	----	----	----	----

Tabla 4a. Media de los tamaños de los protocormos "Cápsulas tipo A"

	0 días	5 días	26 días	40 días	59 días	76 días	91 días	110 días	141 días	160 días
1	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
3	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
4	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -

Media:	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

5	- -	- -	1	2	2	2	2	2	2	2
6	- -	- -	0,5	1	1,5	1	1	2	2	2
7	- -	- -	0,5	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
8	- -	- -	1	1	1	1,5	2	2	2	2
9	- -	- -	0,5	1	2	2	2	2		2
10	- -	- -	0,1	1	1	1	1	1,5	1,5	1,5

Media:	- -	- -	0,60	1,08	1,50	1,50	1,58	1,83	1,80	1,83
--------	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------

Tabla 4b. Media de los tamaños de los protocormos "Cápsulas tipo B"

	0 días	12 días	19 días	33 días	52 días	69 días	84 días	103 días	134 días	153 días
1	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
2	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
3	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
4	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
5	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -

Media:	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

6	- -	- -	1	1	1	2	2	2	4	4,5
7	- -	- -	0,5	1	2	2,5	2,5	4,5	4,5	5
8	- -	- -	1	1	3	4	10			
9	- -	- -	0,5	1	1,5	2	3,5	4	5	5
10	- -	- -	0,5	1	4	3	3	5	5,5	5,5
11	- -	- -	0,5	1	1	1	2	4	4	4
12	- -	- -	1	1	1	1	1	1	1	1
13	- -	- -	1	1	1,5	1,5	1,5	4,5	5	5

Media:	- -	- -	0,75	1,00	1,88	2,13	3,19	3,57	4,14	4,29
--------	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------

Tabla 4c. Media de los tamaños de los protocormos "Cápsulas tipo C".

	0 días	11 días	30 días	47 días	62 días	81 días	112 días	131 días
1	- -	0	0,5	1	1	1	1	2
3	- -	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
4	- -	0	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1,5
5	- -	0,5	0,5	0,5	0,5			
Media:	- -	0,3	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	1,3

Tabla 5a. Porcentaje de respuesta de protocornos "Cápsulas tipo A"

	0 días	5 días	26 días	40 días	59 días	76 días	91 días	110 días	141 días	160 días
1	- - - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	- - - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	- - - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Media:	- - - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0
--------	------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

5	- - - -	50	100	100	100	100	100	100	100	100
6	- - - -	60	100	100	100	100	100	100	100	100
7	- - - -	60	100	100	100	100	100	100	100	100
8	- - - -	10	20	50	70	80	100	100	100	100
9	- - - -	20	50	80	80	100	100	100		100
10	- - - -	50	100	100	100	100	100	100	100	100

Media:	- - - -	42	78	88	92	97	100	100	100	100
--------	------------	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----

Tabla 5b. Porcentaje de respuesta de protocornos "Cápsulas tipo B"

	0 días	12 días	19 días	33 días	52 días	69 días	84 días	103 días	134 días	153 días
1	- - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	- - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	- - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	- - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	- - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Media:	- - -	0	0	0	0	0	0	0	0	0
--------	-------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

6	- - -	20	40	60	80	100	100	100	100	100
7	- - -	20	40	40	80	100	100	100	100	100
8	- - -	0	0	0	50	100	100			
9	- - -	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	- - -	0	1	40	80	100	100	100	100	100
11	- - -	80	100	100	100	100	100	100	100	100
12	- - -	100	100	100	100	100	100	100	100	100
13	- - -	20	40	100	100	100	100	100	100	100

Media:	- - -	43	53	68	86	100	100	100	100	100
--------	-------	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----

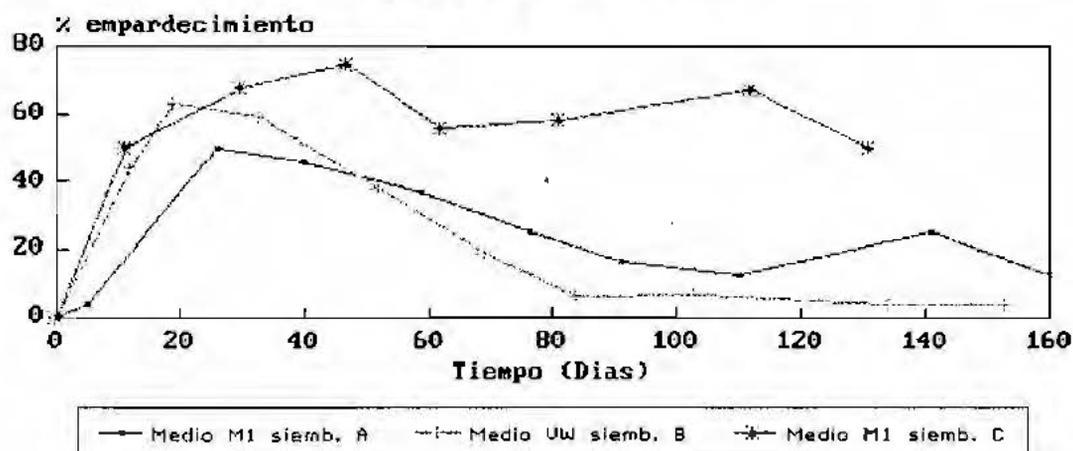
Tabla 5c. Porcentaje de respuesta de protocornos "Cápsulas tipo C"

	0 días	11 días	30 días	47 días	62 días	81 días	112 días	131 días
1	- - -	0	10	20	30	30	30	40
3	- - -	100	100	100	100	100	100	100
4	- - -	0	5	5	20	20	20	30
5	- - -	100	100	100	100			

Media:	- - -	50	54	56	63	50	50	57
--------	-------	----	----	----	----	----	----	----

Fig.2

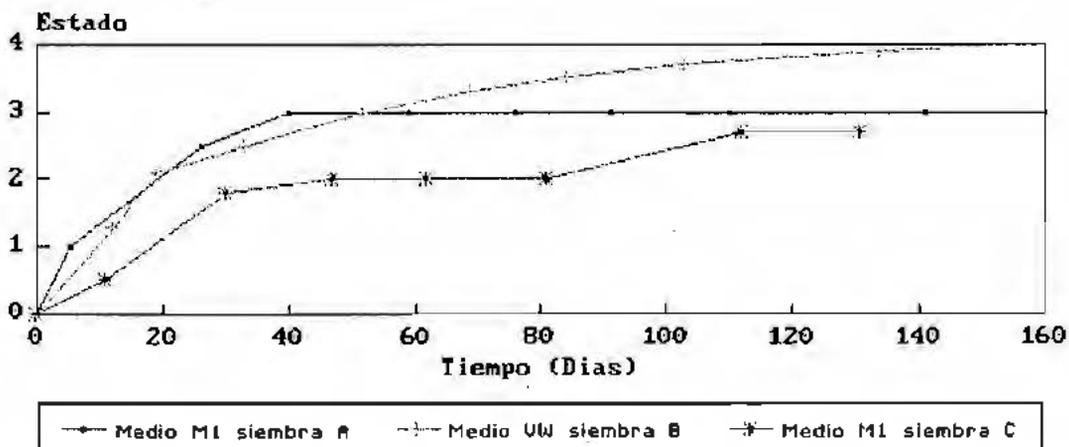
Emparedamiento en las tres siembras de Semillas inmaduras, siembras A, B y C Medios M1 y VW.



Todo el material corresponde a capsulas inmaduras, de tamaños Medio y Grande

Fig. 3

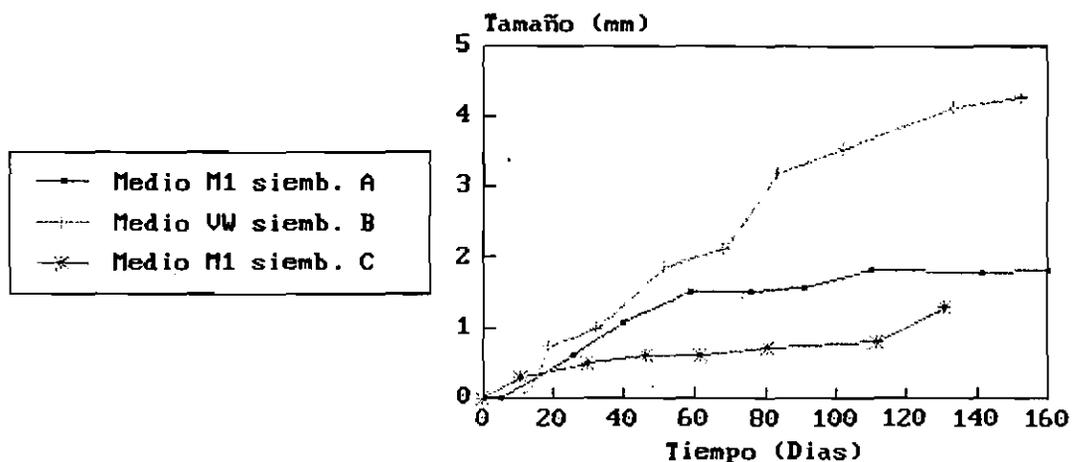
Evolucion de los estados a partir de Semillas inmaduras, siembras A, B y C Capsulas inmaduras y VW.



Todo el material corresponde a capsulas inmaduras, de tamaños Medio y Grande

Fig. 4

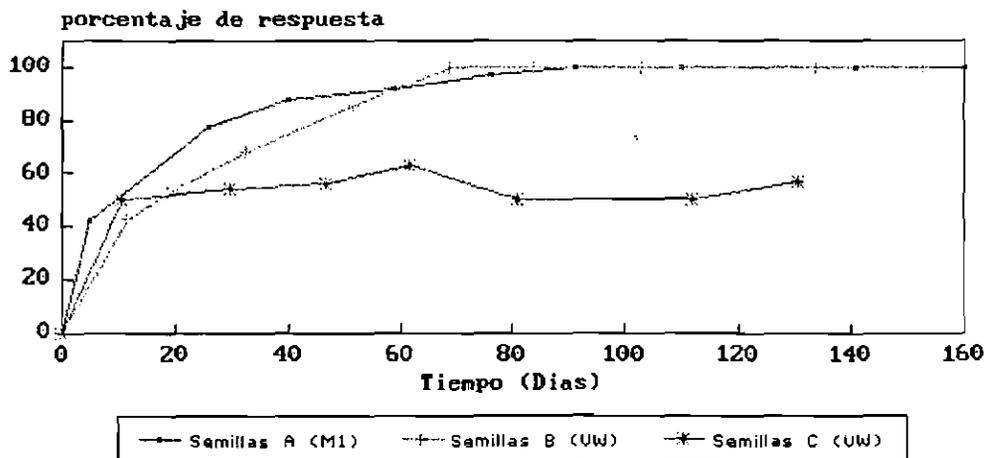
Tamaños medios de protocormos en las tres siembras (mm) Medios M1 y VW.



Todo el material corresponde a capsulas inmaduras, de tamaños Medio y Grande

Fig. 5

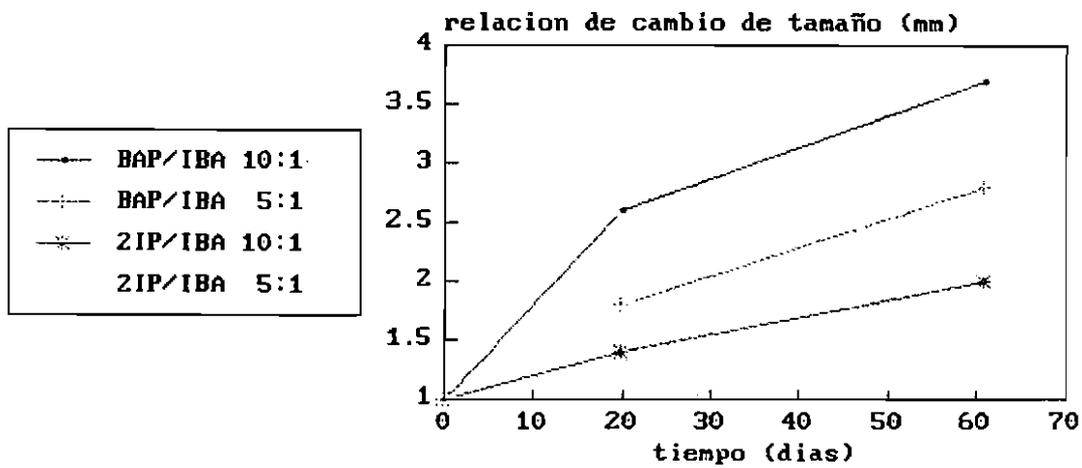
Procentaje de respuesta de Protocormos Capsulas tipo A, B y C



Todo el material corresponde a capsulas inmaduras, de tamaños Medio y Grande

Fig. 6

Ensayo relaciones hormonales BAP/IBA 2IP/IBA valores corregidos de 5 repeticiones.



5.8.2. Tratamientos hormonales

Se señalan las respuestas obtenidas a los tratamientos con diferentes combinaciones hormonales de citoquinina y auxina (BAP y 2- i P 25 μ M con 2,5 y 25 μ M de IBA,). Se indica el tamaño de los protocormos en mm. alcanzado a los 60 días. Los valores indicados son una media de 5 repeticiones con un protocormo por frasco (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos hormonales en medio Murashige y Skoog (MS) solidificado con phytigel.

Tiempo (días)	Control	BAP:IBA 10:1	BAP:IBA 5:1	2-iP:IBA 10:1	2- iP:IBA 5:1
0	3,2	3,8	3,6	3,2	3,2
20	3,4	4,8	4,4	3,6	4,0
60	4,2	5,9	5,4	4,2	5,3

Debido a que el material cultivado al comienzo del ensayo no era homogéneo en tamaño, se ha considerado incorporar un factor de corrección que permita evaluar los datos obtenidos y resumidos en la Tabla 6. Los valores corregidos se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Evaluación del efecto de un tratamiento hormonal con valores corregidos.

Tiempo (días)	Control	BAP:IBA 10:1	BAP:IBA 5:1	2-iP:IBA 10:1	2- iP:IBA 5:1
0	1	1,0	1,0	1,0	1,0
20	1,2	2,6	1,8	1,4	1,8
60	2,0	3,7	2,8	2,0	3,1

Gráficamente (Fig. 6) se puede observar un notable efecto estimulante de las hormonas en la combinación BAP:IBA, 10:1, seguido por 2-iP:IBA 5:1.

En todos los tratamientos hay división de protocormos, información indicada en Tabla 8. Este fenómeno nunca se observa en el estado temprano de la embriogénesis somática.

Tabla 8. Se indica el porcentaje de multiplicación de protocormos *in vitro*.

Tiempo (días)	BAP:IBA 10:1	BAP:IBA 5:1	2-iP:IBA 10:1	2- iP:IBA 5:1
60	80%	60%	40%	40%

5.8.3. Medio líquido con agitación

Con el objeto de observar el efecto sobre la morfogénesis de semillas en germinación, se cultivaron semillas en estados dos (F1, F2, F6, F7, F8) y tres (F3, F4, F5, F9, F10, F11, F12, F13) de la germinación, en 30 ml. de medio líquido M1 (indicado en Tabla 1) agitando a 100 r.p.m. a temperatura ambiente (22°C) durante 5 meses. Los resultados se evaluaron a los 30, 60, 90 y 120 días (Tabla 9) indican que no hay cambio de estado, excepto en el Frasco 13 en el cual sólo al cabo de este tiempo se inicia el estado 4. Tampoco se observa liberación de fenoles al medio. Las condiciones de luz y oscuridad tampoco afectan un cambio de estado.

Tabla 9. Evaluación de los cambios de estado durante 120 días en medio líquido con agitación a 100 r.p.m. en medio M1 y VW.

MEDIO/ FRASCO (F)	Nº	Iluminación	EVOLUCIÓN			
			DE LOS 30 días	DE LOS 60 días	DE LOS 90 días	DE LOS 120 días
M1 -F1		L	2	2	2	2
		O	2	2	2	2
VW-F2		L	2	2	2	2
		O	2	2	2	2
M1-F3		O	2	2	2	2
VW- F4		O	2	2	2	2
M1- F5		L	2	2	2	2
VW-F6		L	2	2	2	2
M1-F7		L	2	2	2	2
VW-F8		L	2	2	2	2
M1-F9		L	2	2	2	2
VW-F10		L	2	2	2	2
M1 - F11		L	2	2	2	2
VW-F12		L	2	2	2	2
M1-F13		L	2	2	2	2

5.8.4. Medio líquido con inmersión temporal

Este tratamiento debiera ser más afectivo que un medio líquido con agitación y uno sólido, para estimular el crecimiento y la diferenciación, puesto que al no tener un líquido permanentemente rodeando los tejidos permite una mejor aireación que un medio líquido con agitación y por la misma razón pero además porque facilita una mejor absorción de los nutrientes, debe ser mejor que un medio sólido (Lorenzo et al,1998).

Este ensayo se inició en forma experimental en abril, y a muy pequeña escala con el objeto de verificar si podría haber alguna ventaja. Se observa que los protocormos crecen y se diferencian al parecer más aceleradamente, pero aún no se ha realizado ninguna evaluación cuantitativa.

5.8.5. Efecto de bajas temperaturas

Este ensayo está en proceso por lo que aún no se cumple el primer plazo para la primera evaluación.

5.8.6. Desarrollo de protocolos de germinación *in vitro*

En la siguiente tabla se resume los primeros resultados

CODIGO DEL MATERIAL	INDUCCIÓN DE E.S.
B3	+
B5	+
B6	+
B7	+
B8	+
B9	+
B11	+
B13	+
B15	+
B16	+
B17	+
B18	+
B19	+
B20	+
B23	+
B24	+
B28	+
B30	+
B33	-
B34	+
B35	+
B36	-
B38	+
B39	-
B40	-
B41	+
B42	-
B43	+
B44	+
B47	-
B48	+
B49	-
B50	-
A6	-
A1	-
A2	+
BL	-
MB7A1	+
MB23.2	+
MB32.2	+
MB36B1	+
MB36B1SM	+
MB44.1SM	+
MB44.2	+
MB44.3	-
MB43.1	+

(+) = inducción de embriones somáticos

(-) = no se ha verificado inducción

La localización de estas plantas en terreno y significado de los códigos está en poder de Michael Bourcke.

Después de un mes de evaluación no se registra cambios; es decir, no aparece clorofila, ni hojas ni hay macollamiento. Sin embargo se indica la altura de éstos:

N° PLANTA	ALTURA (cm)
1	0.5
2	0.4
3	0.6
4	0.7
5	0.6
6	0.5
7	0.6
8	0.5
9	0.6
10	0.8

$$X = 0.58 \text{ cm}$$

Los resultados obtenidos a los dos meses se resumen en la siguiente tabla :

CLOROFILA	ALTURA (cm)	N° HOJAS	MACOLLAMIENTO
Entre los 12-14 días comienza a desarrollarse clorofila	En promedio, la ganancia en altura fue de 0.27 cm en dos meses	A los 14 días emerge el primer par de hojas	No se registra antes de dos meses

5.9. Propagación vegetativa

5.9.1. Siembra con pre-tratamiento en medio para bacterias seguido de medio líquido(T2)

Luego de 24 horas en medio líquido, no se apreció turbidez en este. Al pasar el explante a medio para bacterias, estas se expresaron cubriendo la superficie del medio. Los explantes son subcultivados diariamente para lograr diluir las bacterias. Hasta la fecha, complementando el subcultivo con aplicaciones de alcohol 70% por un minuto, han logrado detener la contaminación. Como se indicó anteriormente, no ha aparecido contaminación por hongos.

El objetivo es establecer una adecuada metodología de desinfección, de tal manera que se pueda realizar exitosamente la propagación vegetativa de *Chloraea sp*, logrando plantas viables sin indicios de contaminación. Hasta la fecha en general no hay resultados satisfactorios.

Se decidió abandonar estos ensayos en vista del éxito logrado con la embriogénesis somática.

5.9.2. Desarrollo de protocolos de expresión radicular

Los resultados generales se informan en la siguiente tabla :

FORMACION DE RAÍCES (días)	N° DE HOJAS	ALTURA (cm)
No se detecta raíces antes del mes	En el periodo, hay una ganancia promedio de 2 hojas	Se detecta una ganancia promedio de 0.8 cm

Inicio de nuevos cultivos y mantención de líneas seleccionadas

A fines de Marzo se registra el siguiente material:

CLONES EN OSCURIDAD AL DIA 24/03/ 03 (para producción permanente de embriones somáticos primarios y secundarios)

CLON	N° DE FRASCOS
B20	4
CC001 madre	8
C00600	16
C00300 x C00300	3
F002 madre C03400	14
B48	5
C00400 x C00400	8
B44	1
B13	4
C00500	10
B49	2
C00200	4
MB 37.1	2
B42	1
C00300	2
S/IDENTIFICACION	1
B46	2
CC01	1
B50	3
B41	4
AC900 2° envío	1
C021	1
C00200 x C00200	3
9	1
10	1
11	1
12	1

Actualmente existen **104** frascos en oscuridad. El medio se cambia mensualmente. En ese momento se extraen los embriones maduros y se cultivan en medio de multiplicación, bajo condiciones de fotoperíodo 16/8.

CLONES DE *Chloraea* PARA PASAR A TIERRA AL 24/03/03

CLON	N° DE FRASCOS	N° PLANTAS
B47	2	6
GRAB	1	4
B29	1	2
F002 madre C03400	1	2
B9	1	1
B43	1	4
A6	1	2
C00200 x C00200	2	6
B44	2	2
B37	1	3
B15	1	3
MB215	1	8
B48	3	8
C00500	2	5
B20	1	1
MB3681 (*)	1	2
B49 (*)	1	7
MB37.1	1	1

(*) Frascos contaminados

Para esta fecha ay 25 frascos con 68 plantas, listas para pasar a tierra.

CLONES DE *Chloraea* EN MEDIO DE MULTIPLICACIÓN , bajo condiciones de fotoperíodo AL 24/03/03

CLON	N° DE FRASCOS
MB43	1
C00400	1
C00300 x C00300	1
MP215	1
F002 madre C03400	17
B48	1
C03200	1
C00200 x C00200	8
C00500	11
B46	1
C00600	2
C00200	2
MB37.1	5
B20	1
B49	1
B13	2
B17	1
B44	2
B15	2
C00400 x C00400	4
C00500 x C00500	4
CC2CC2 x FFCC1	1
S/I	1
C01C04 x C01804	2
AC 900 S/M 2° envoi	1
TOTAL	74

El banco de orquídeas en etapa de multiplicación es de 74 frascos, correspondiente a 25 clones.

5.10. Semillas sintéticas

La primera evaluación hecha a la semana de haber sido tratados los explantes el día 12 de Septiembre no indicaba ninguna señal de germinación en las cápsulas, sin embargo en el tratamiento 8 (control), se observó un leve aumento del crecimiento del embrión.

A los 18 días de iniciado el ensayo se vuelve a evaluar para transferir los embriones a luz y éstos no presentan signos de crecimiento ni pigmentación, el Tratamiento 8 había aumentado significativamente de tamaño y presentaba una leve pigmentación verde en el ápice. Era de esperar que los explantes no sufrieran alteraciones aparentes si están siendo inducidos a dormancia.

A la semana de haber sido transferidas a condiciones de temperatura y luz para germinar los embriones han crecido y algunos están adquiriendo coloración :

TRATAMIENTO	OBSERVACION
T1	Todos están blancos, pero crecidos
T2	No hay diferencia aparente con T1
T3	Muy parecidos a T1 y T2, ápice teñido
T4	Fenolizado el ápice
T5	Sin color casi no ha crecido
T6	Pequeño y ápice de color
T7	Embriones verdes y más grandes
T8	Más grandes y son los más verdes

El tratamiento 3 fue el único tratamiento con inhibidor que contenía embriones con una leve coloración.

El tratamiento 5 fue el que menos respuesta tuvo frente al cambio de condiciones, quizás esta nula respuesta se pueda deber a que es el tratamiento que presenta mayor número de factores para la dormancia.

El tratamiento 1 y 2 casi no presenta diferencias lo que nos hace pensar que la temperatura no es tan importante para inducir la dormancia cuando está presente un fuerte inhibidor como es ABA.

Los controles manifiestan señales de germinación, lo que era de esperar ya que no se indujo dormancia en ellos.

Cuando los embriones son transferidos a medio sólido Van Waes para germinación, se supone no presentan ABA por lo que esperamos que no tendrán problemas para germinar, sin embargo, hasta ahora no han presentado cambios desde sembrados.

Los tratamientos T7 y T8 que no necesitaron ser lixiviados por carecer de inhibidores permanecen muy grandes y con coloración verde. Las diferencias aparentes entre estos dos tratamientos solo radica en que el tratamiento 8 creció y adquirió coloración antes que el tratamiento 7.

Es importante llegar a establecer una metodología para la elaboración de semillas sintéticas sin que perjudique la capacidad endógena del embrión para germinar en cualquier momento.

5.11. Identificación de patrones genéticos mediante DAF

Las muestras de *Chloraea* procesadas corresponden a:

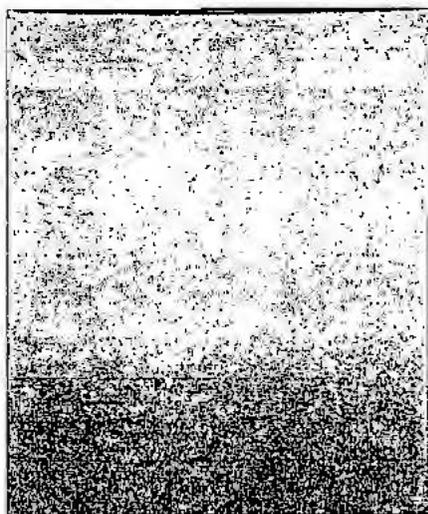
Nombre de la muestra	
C. disiodes	4
C. Crispa Amarilla	4
<i>C. bletoides</i>	4
<i>C. lechleri</i>	>
<i>C. galeata</i> *	>
<i>C. gaviú</i>	4
<i>C. galeata</i> *	>
<i>C. Crispa roja</i>	4
<i>C. Virensen</i>	4
<i>C. Crispa Blanca</i>	4
<i>C. Crispa Blanca Blanca</i>	4
<i>C. multiflora</i>	4
<i>C. gavilea</i>	4

(*) : indican las muestras de procedencias diferentes.

(>) : indica muestras perdidas o sin lectura

(4) : Indica muestra procesada por este método

La información colectada con el análisis cualitativo de 4 primers de la serie Roth con reacción positiva sobre cada una de las muestras, se muestra a continuación, primero la fotografía de la corrida electroforética y luego el valor de cada una de las bandas expresadas de acuerdo al software de análisis de LabImage. El orden de carga de las muestras de izquierda a derecha es el siguiente; MPM, Roth A14, Roth G09, Roth P14 y Roth T20.



Reacción DAF sobre C. Gavilu



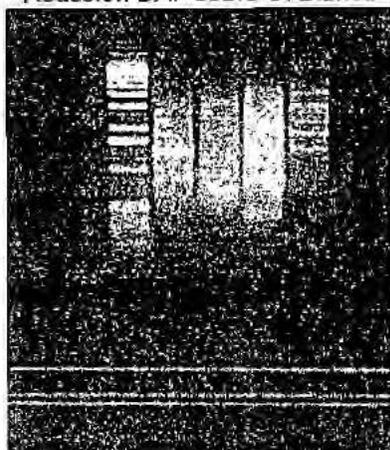
Reacción DAF sobre C. Disoides



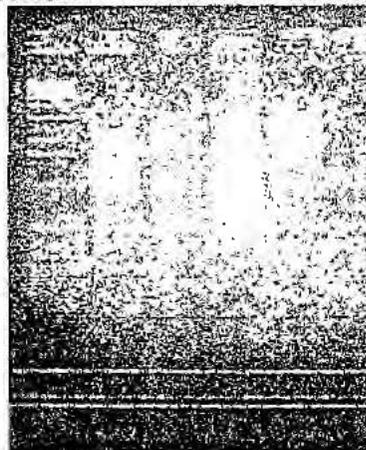
Reacción DAF sobre C. Blanca



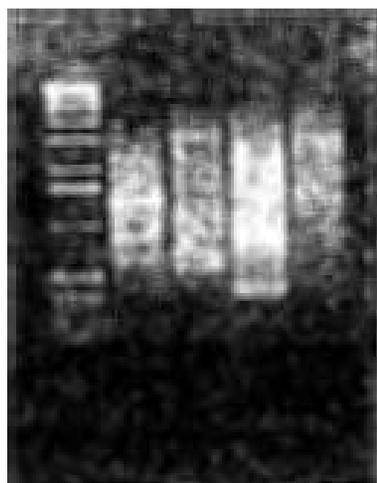
Reacción DAF sobre C. Bletoides



Reacción DAF sobre C. Amarilla



Reacción DAF sobre C. Virescens



Reacción DAF sobre C. Roja

Resultados numéricos de los resultados de amplificación DAF sobre las distintas especies de Chloreae

Resultado de la amplificación DAF para primer Roth A14, expresados en pb.

Gavilu	Disoides	Blanc a	Bletoid e	Amarilla	Viresce ns	Roja
		2978	2359	2353	2331	2268
		2253	1688	1865	1760	1353
		1939	1335	1598	1305	1093
		1386	917	1291	1366	793
		1093		918	813	876
		843		766	921	649
		622		622		
				454		

Resultado de la amplificación DAF para primer Roth G09, expresados en pb.

Gavilu	Disoide s	Blanca	Bletoide	Amarilla	Viresce ns	Roja
	2331	3361		3621	3282	3235
	789	2036		2567	2668	2460
		1291		2036	1893	1949
		1093		1672	1276	1672
		967		1291	968	1146
		746		1093	793	921
		622		918	736	718
				690	618	573
				561		

Resultado de la amplificación DAF para primer Roth T20, expresados en pb.

Gavilu	Disoide s	Blanca	Bletoide s	Amarilla	Viresce ns	Roja
2268	1018	2431	2192	5247	2331	2893
1865	841	1893	2448	3832	1770	2331
1709		1488	1913	2720	1529	1709
1567		1202	1581	2353	1220	1453
1018		746	1089	2036	899	1174
927		656	917	1672	306	649
825		918	603	1353	459	876
388		492	489	1488	396	459
473				1067		
				1146		
				786		
				607		
				430		

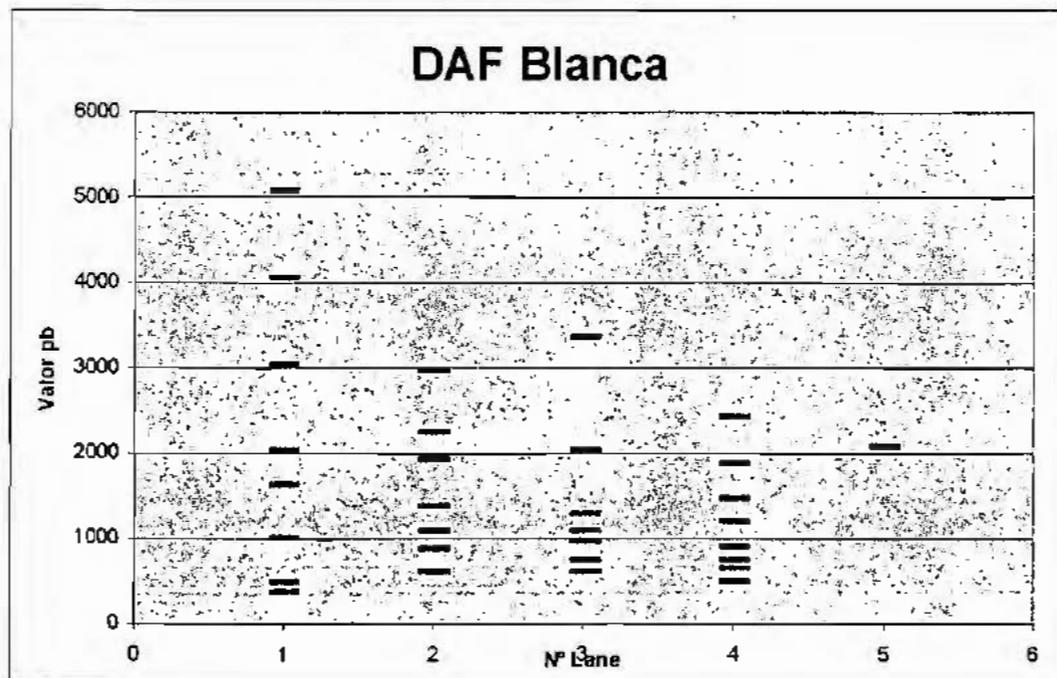
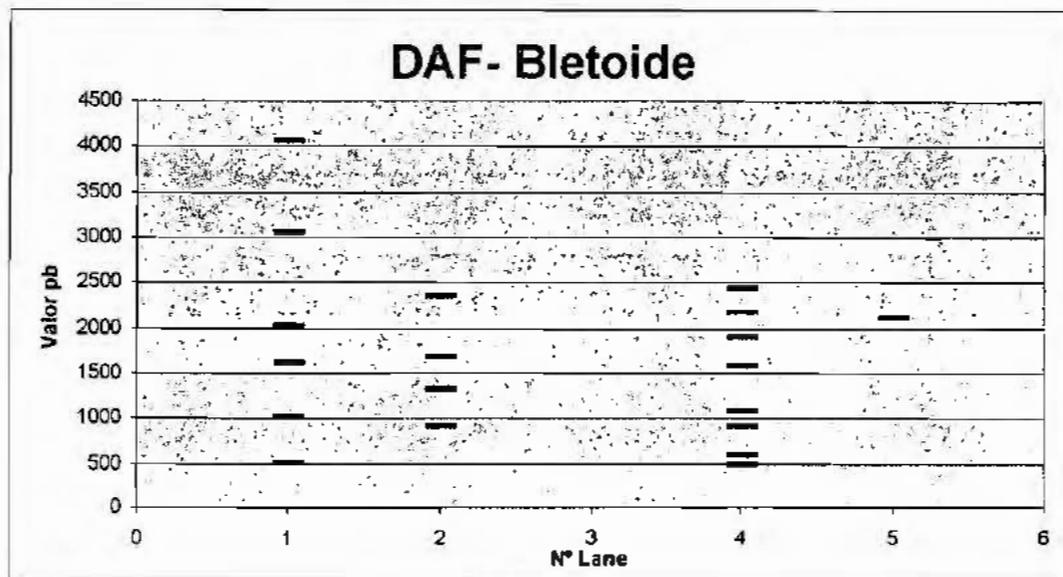
Resultado de la amplificación DAF para primer Roth P14, expresados en pb.

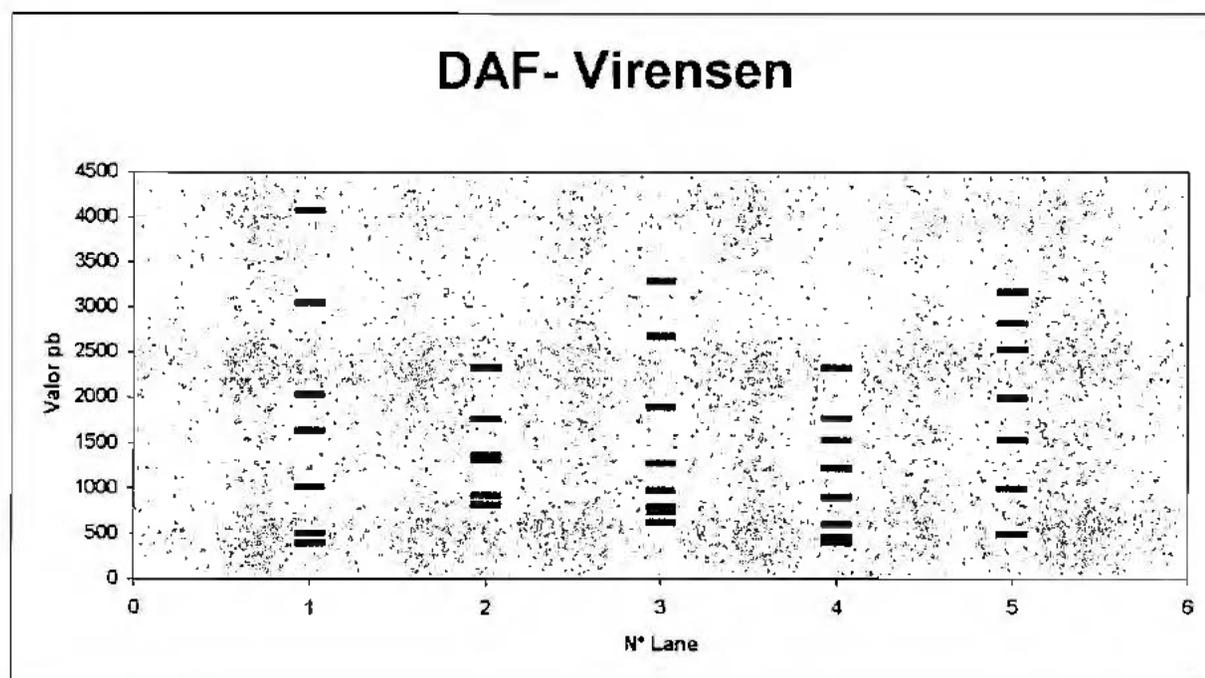
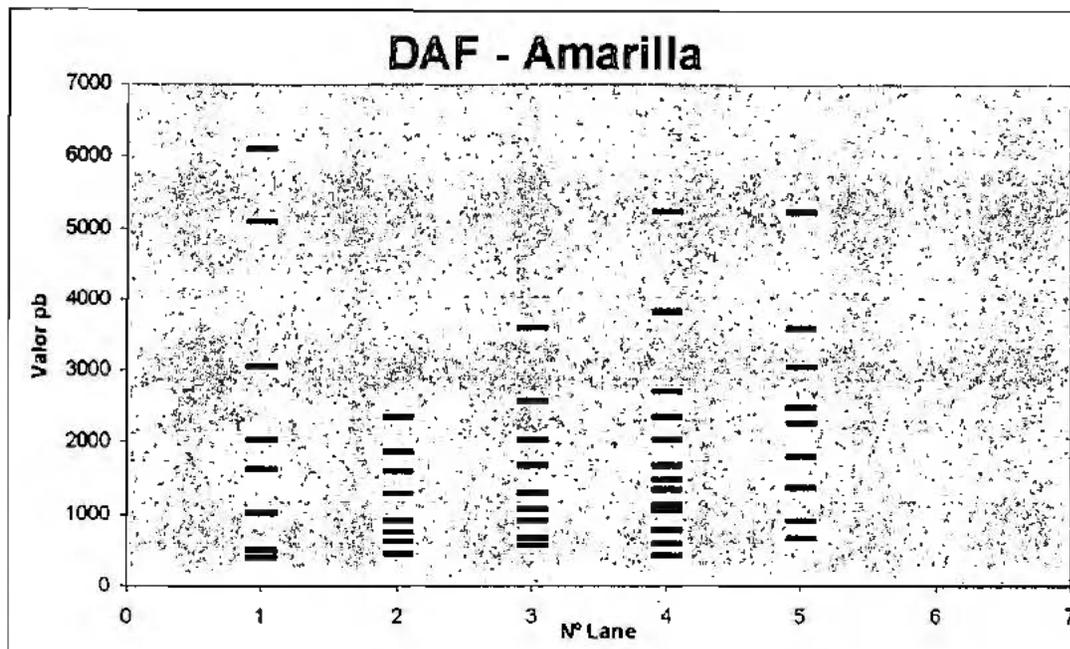
Gavilu	Disoide s	Blanca	Bletoide s	Amarill a	Virescens	Roja
		2088	2112	5247	3166	4072
				3621	2816	3426
				16		
				3054	2528	2816
				2286	1987	3143
				2494	1529	2528
				1825	993	1949
				1386	494	1453
				918		1202
				673		

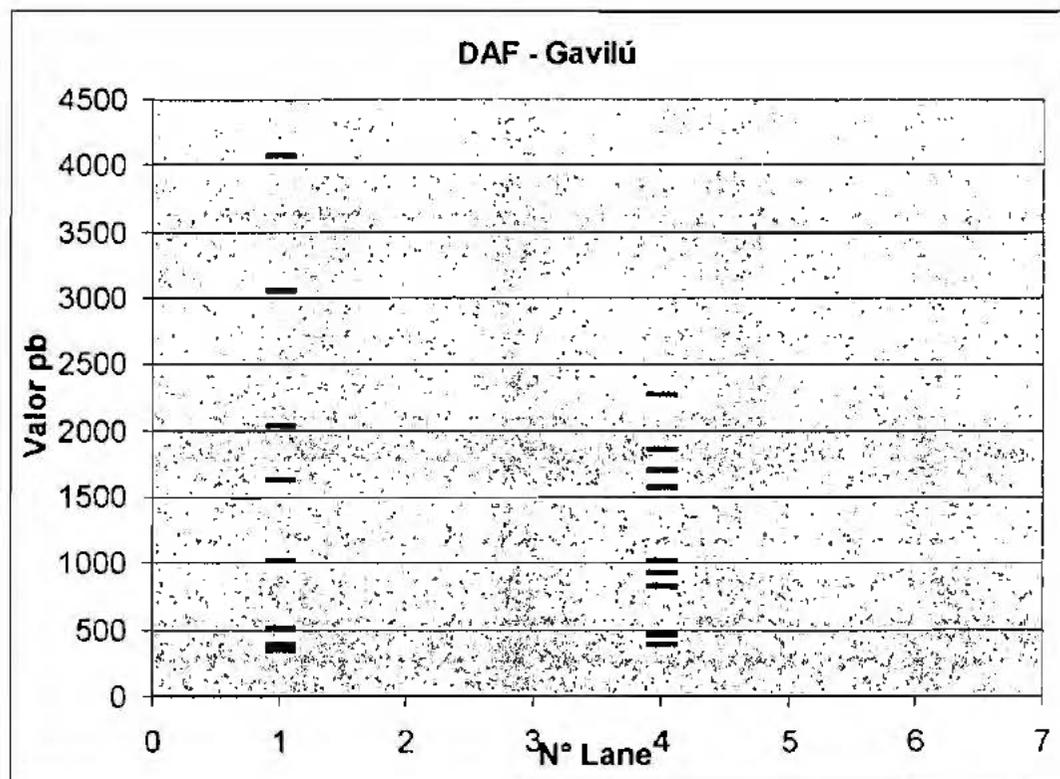
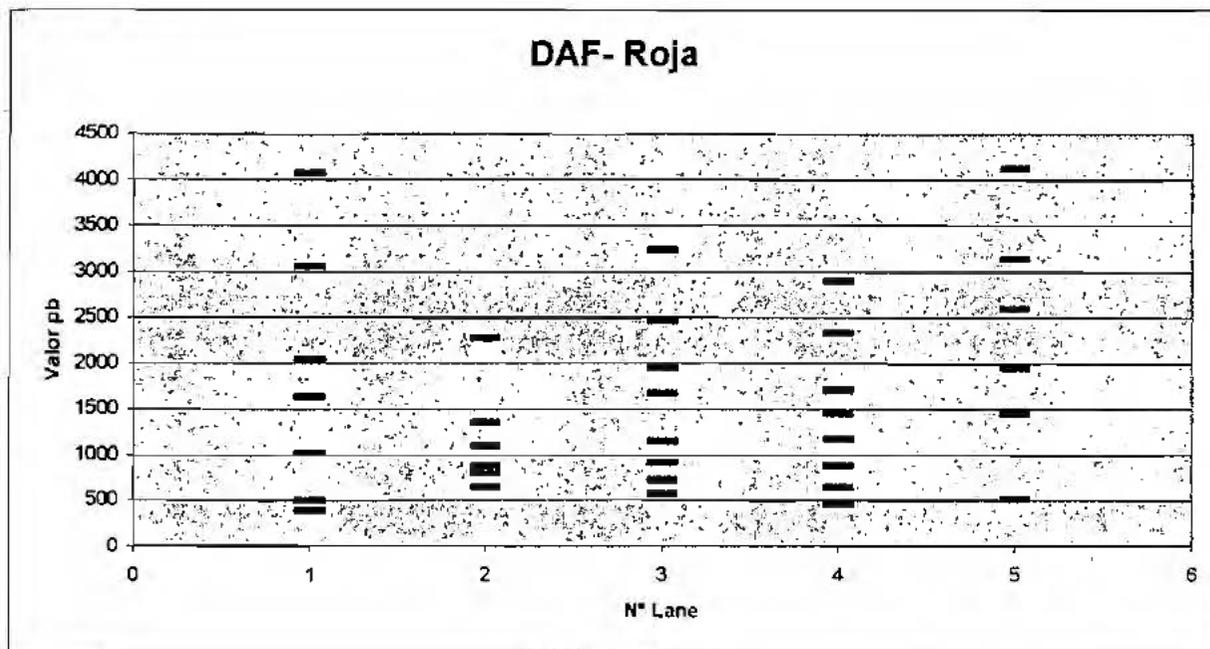
Ω Se han resaltado algunas bandas de tamaños similares

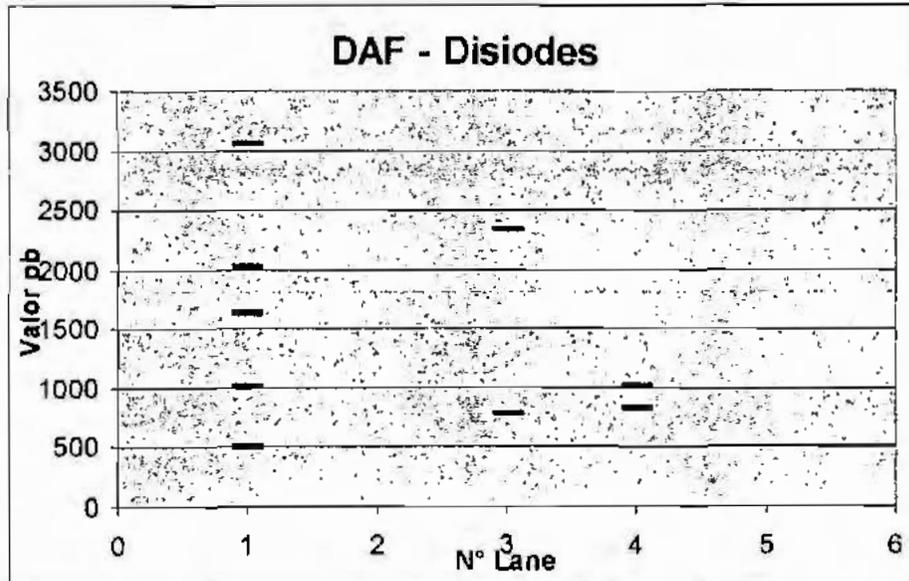
RELACIONES DE TAMAÑO

Datos obtenidos por el programa Lab Image 2.5 (Demo)









Durante la realización de las actividades propuestas se detectó una serie de problemas que decían relación con la PCR debido a la inestabilidad de los resultados obtenidos en cuanto a la aparición de bandas diferenciales y su reproductividad.

La solución empleada para resolver este problema fue una re-estandarización de las condiciones de PCR para DAF, comenzando con una curva de Mg^{+2} , curva de concentración de DNA, gradiente de temperatura, depuración de las muestras de DNA obtenidas con el proceso de CTAB/Fenol, para eliminar posibles contaminantes que precipiten algún componente de la reacción y chequeo de la confección del master Mix de reacción para PCR, junto con la integridad de los primers.

Finalmente se determinó que la concentración de Mg^{+2} originalmente establecida, así como la concentración de DNA y la calidad de los primers usados no presentaban problemas, los problemas de reproductividad de los resultados se mejoraron con la nueva temperatura detectada y que fue de $30.3\text{ }^{\circ}\text{C}$, finalmente no se encontraron contaminantes en las muestras provenientes de la reacción de CTAB/Fenol que pudieran alterar la reacción de PCR.

De los análisis numéricos de cada uno de los gels resultantes de la reacción DAF usando el programa LabImage, es posible inferir que existe un patrón de amplificación característico para cada especie de *Chloraea*, conformando una huella única de identificación, sin embargo pese a que en una primera instancia los primers de la serie ROTH escogidos presentaban una amplificación recurrente, se puede observar que algunos de ellos no amplifican en todas las especie de *Chloraea* analizadas lo que podría explicarse debido a una cantidad de polisacáridos presente y residual, aun cuando las muestras fueron sometidas a purificación de este interferente en presencia de LiCl 8M, que es en gran medida mayor a la concentración de LiCl usada para el estudio de Paul Bemwell et al. con el objeto de eliminar los mismos interferentes en muestras de plantas mucilaginosas, aunque esta interferencia es aleatoria, se podría explicar simplemente por el enmascaramiento aleatorio de la Taq DNA polimerasa durante la reacción; de igual forma fue probado el grado de implicancia de la concentración de DNA en la reacción resultando despreciable en la reacción y no considerándose un factor limitante en la reacción.

Es interesante señalar que, no existen referentes a estudios de esta naturaleza usando este tejido vegetal y que posteriores modificaciones del protocolo de extracción probadas al final de este estudio resultaron en éxitos relativos, frente al problema anteriormente mencionado, como es la adición de 1-

octanol a la extracción con CTAB que lograría eliminar en forma no total, pero si importante los interferentes del tipo polisacáridos.

Pese a lo anteriormente mencionado el estudio de marcadores moleculares usando la técnica DAF cumplió en gran medida los objetivos propuestos y que eran encontrar marcadores o huellas genéticas diferenciales a las diferentes especies de *Chloraea* colectadas, contribuyendo a la base de futuros estudios en este mismo sentido, generando información valiosa para la aplicación de otras técnicas moleculares de estudio como ser AFLP, RAPID, etc.

5.12. Criopreservación.

Los resultados se tabularon en la siguiente tabla:

		PESO SECO = 0,0062g		PORCENTAJE DE AGUA = 91,4			
# tubo	Tiempo	Peso (g)	P. Agua	%P. inicial	Var. Agua	%agua E.S.	Tetrazolium
1	0	0,0725	0,0663	100	100	91,4	+++
	5	0,0685	0,0623	94,5	94	90,9	
2	10	0,0656	0,0594	90,5	89,6	90,5	+++
	15	0,0640	0,0578	88,3	87,2	90,3	
3	20	0,0625	0,0563	86,2	84,9	90,1	++
	30	0,0597	0,0535	82,3	80,7	89,6	
4	40	0,0577	0,0515	79,6	77,7	89,3	++
	50	0,0558	0,0496	77	74,8	88,9	
5	60	0,0536	0,0474	73,9	71,5	88,4	+++
	80	0,0499	0,0437	68,8	65,9	87,6	
6	100	0,0461	0,0399	63,6	60,2	86,6	+
7	120	0,0433	0,0371	59,7	56	85,7	+++
8	140	0,0392	0,0330	54,1	49,8	84,2	++
9	160	0,0359	0,0297	49,5	44,8	82,7	+++
10	180	0,0325	0,0263	44,8	39,7	80,9	++
11	240	0,0244	0,0182	33,7	27,5	74,6	+
Desecación total	24h/60°	0,0062	00000	8,6	0,0	0,0	-
Control	Tetrazol						+++

La columna ennegrecida muestra el peso de agua de los tejidos, obtenido de la diferencia del peso frasco menos el peso seco de los embriones, es decir, menos 0,0062.

Por ejemplo: Peso inicial - Peso final = Peso de agua

$$0,0725 \quad 0,0062 = 0,00663$$

De esta forma se puede visualizar la pérdida del contenido de agua a medida que pasaba el tiempo de evaluación.

Como los embriones presentan un elevado contenido de agua (91,4%), son capaces de resistir largos períodos de tiempo en sistemas de deshidratación sin perder su viabilidad, debido a esto es que a las tres horas de haber sido sometidos a desecación recién comienzan a mostrar disminución en la tinción con Trifeniltetrazolium. Esta respuesta se observa en los tubos 10 y 11, de 3 y 4 horas respectivamente, los que casi no están teñidos.

Para los embriones que estaban intensamente teñidos igual que en el caso del control, se tabuló con +++ , en cambio para los que mostraban una disminución de la tinción con respecto al control, se tabularon con ++ , finalmente los que estaban levemente teñidos eran + , se encontró uno en blanco que sería tabulado - y correspondió al embrión totalmente desecado en estufa a 60 C por 24 horas. El reactivo fue previamente testeado con otros tejidos para ver su efectividad.

La columna ennegrecida muestra el peso de agua de los tejidos obtenido de la diferencia del peso fresco menos el peso seco de los embriones, es decir, menos 0,0062.

Por ejemplo: Peso inicial – Peso final = peso de agua

$$0,0725 - 0,0062 = 0,0663$$

De esta forma se puede visualizar la pérdida del contenido de agua a medida que pasaba el tiempo de evaluación.

Como los embriones presentan un elevado contenido de agua (91,4%), son capaces de resistir largos periodos de tiempo en sistemas de deshidratación sin perder su viabilidad, debido a esto es que a las 3 horas de haber sido sometidos a desecación recién comienzan a mostrar disminución en la tinción con Trifeniltetrazolium. Esta respuesta corresponde a los tubos 10 y 11, de 3 y 4 horas respectivamente, los que casi no están teñidos.

Para los embriones que estaban intensamente teñidos igual que el control se tabuló con +++, en cambio para los que mostraban una disminución en la tinción con respecto al control, se tabularon ++ y por último los que estaban levemente teñidos eran +, se encontró uno en blanco que sería tabulado – y correspondió al embrión totalmente desecado en estufa a 60°C por 24 horas. El reactivo fue previamente probado con otros tejidos para ver su efectividad.

5.13. Micorrizas

5.13.1 Aislamiento de cepas

En el periodo de estudio se aislaron hongos de *C. gaviu*, *C. Crispa*, *C. virescens*, *C. crispa*, y *Chloraea sp.*(Tabla N°2).

Obteniéndose los siguientes resultados resumidos en la siguiente tabla

Tabla N°1

Color del micelio	Numero de cepas por especie de Orquídea del género Chloraea			
	<i>C. gaviu</i>	<i>C. virescens</i>	<i>C. crispa</i>	<i>Chloraea sp.</i>
Blanco	2	9	8	5
Amarillo	-	2	1	-
Verde	-	8	-	-
rojo	-	2	-	-
Café	-	-	7	-
Negro	-	2	-	-
Naranja	-	-	3	-
Morado	-	20	2	-
N° total de cepas aisladas por especie	2	43	21	5

Cepas identificadas

Se han logrado identificar 2 cepas:

- la cepa aislada de *C. crispa* asignada como B_{2e} ha sido identificada como *Cenococum geophyllum*, hongo imperfecto que forma una asociación simbiótica con *Nothofagus sp.* (Garrido)
- La cepa aislada de *Chloraea sp.*(especie no identificada), asignada como Nm₃ ha sido identificada como *Rhizoctonia sp.* Lo que concuerda con lo revisado en la literatura.

Se realizaron ensayos en conjunto a la Dra. Ximena Calderón de la Universidad de Talca, tendiente a obtener una protocolo de inoculación de plantulas, probando 3 cepas de hongos , 5 tipos de sustrato para asentar la plantulas y cantidad de inóculo(micelio en semillas).

Un 75 % de los frascos presentaron contaminación por el ataque de otros hongos, de los 5 sustratos ensayados el que mejor resultado arrojó, fue el sustrato formado por 30% mantillo, 30% compost de corteza de pino, 40 % de arena. (esterilizado en autoclave) medio TEDI.

La cepa que logró mejores resultados en cuanto a la sobrevivencia de las plántulas inoculadas fue la cepa M_2 , que corresponde a una cepa aislada de *Chloraea gaviu*, en la Fig. 1 se observa que del rizoma salen hifas del hongo M_2 . en la Fig. 2 se observa la plántula a 1 año de haber sido inoculada.



Fig. 2 Vista general de la plántula observada con particularidad en la fig. 1

Fig. 1 Rizoma de orquídea de plántula producida in vitro a un año de haber sido inoculada in vitro, muestra las hifas saliendo del rizoma de la plántula. Foto tomada 18/06/2003



Un 25% de las plántulas con sustrato TEDI, e inoculadas con la cepa M_2 , se encuentran a 1 año de haber sido inoculadas con vida, en contraste con los otros tratamientos en los que todas las plántulas murieron, esto se debió principalmente a la contaminación con hongos oportunistas ambientales que contaminaron el experimento y la excesiva cantidad de inóculo que se puso en el sustrato lo que conllevó a un excesivo crecimiento del hongo en el recipiente usado para el experimento.

En el ambiente así como en cultivos comerciales las plántulas, presentan el ataque de hongos fitopatógenos que afectan su crecimiento y pueden producir la muerte de un porcentaje importante de plantas, estos hongos fitopatógenos pueden ser controlados por fungicidas comerciales, en este contexto se realizó un ensayo con distintos fungicidas para evaluar si estos inhibían el crecimiento de las cepas de hongos aislados al eventualmente ser aplicados a plantas creciendo en cultivos comerciales.

Así se logró determinar que usando discos impregnados con cantidades de; oxiclورو de cobre 132 μg . y 264 μg ., Manzate 96 μg . y Captan 86 μg ., el micelio de la cepa M_1 pudo a estas seguir creciendo, estas cantidades que equivalen para oxiclورو de cobre a 1 y 2 aplicaciones con una solución a una concentración de 10,5 grs./lt. , para Manzate esta cantidad equivale a una aplicación con una solución de concentración 9,6 grs./lt., y para Captan esta cantidad equivale a una aplicación con una solución de concentración 8,7 grs./lt..

Las concentraciones de los fungicidas fueron preparadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos.

Así también se evaluó la actividad usando fungicidas combinados donde no se observó crecimiento del hongo testeado.(Tabla N° 3)

De las plántulas inoculadas con los hongos se tomó un individuo de cada una y se procedió a aislar los hongos usando el mismo protocolo para aislarlos en la primera vez, y se observó que al poner el rizoma en la placa de cultivo, en todos los cortes creció el hongo inoculado(Fig.3).

Preparación de Semilla

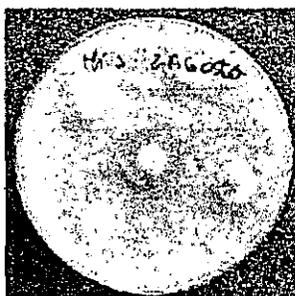


Fig.3 en donde se observa sembrado 4 cortes de rizoma de orquídea inoculado con la cepa M_1 .

En microbiología se aplica el término semilla a la preparación de inóculo del organismo a mayor escala, para este caso se usó semilla de mijo con medio Pda. Líquido el cual se autoclavó e inoculó con las distintas cepas testeadas.

Al cultivarlas a 25 °C. durante 75 días se produce la infección del sustrato que nos va permitir inocular plántulas con semillas de mijo que contienen la micorriza en su interior(fig.4).

Esto tiene un costo aproximado en materiales de \$ 10.000.- por cada kilogramo de mijo.

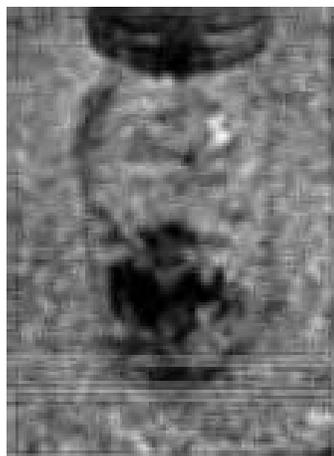


Fig.4 . Se puede observar las semillas de mijo invadidas por la cepa NM_3 , la que se encuentra lista para inocular plántulas.

Trabajo en proceso

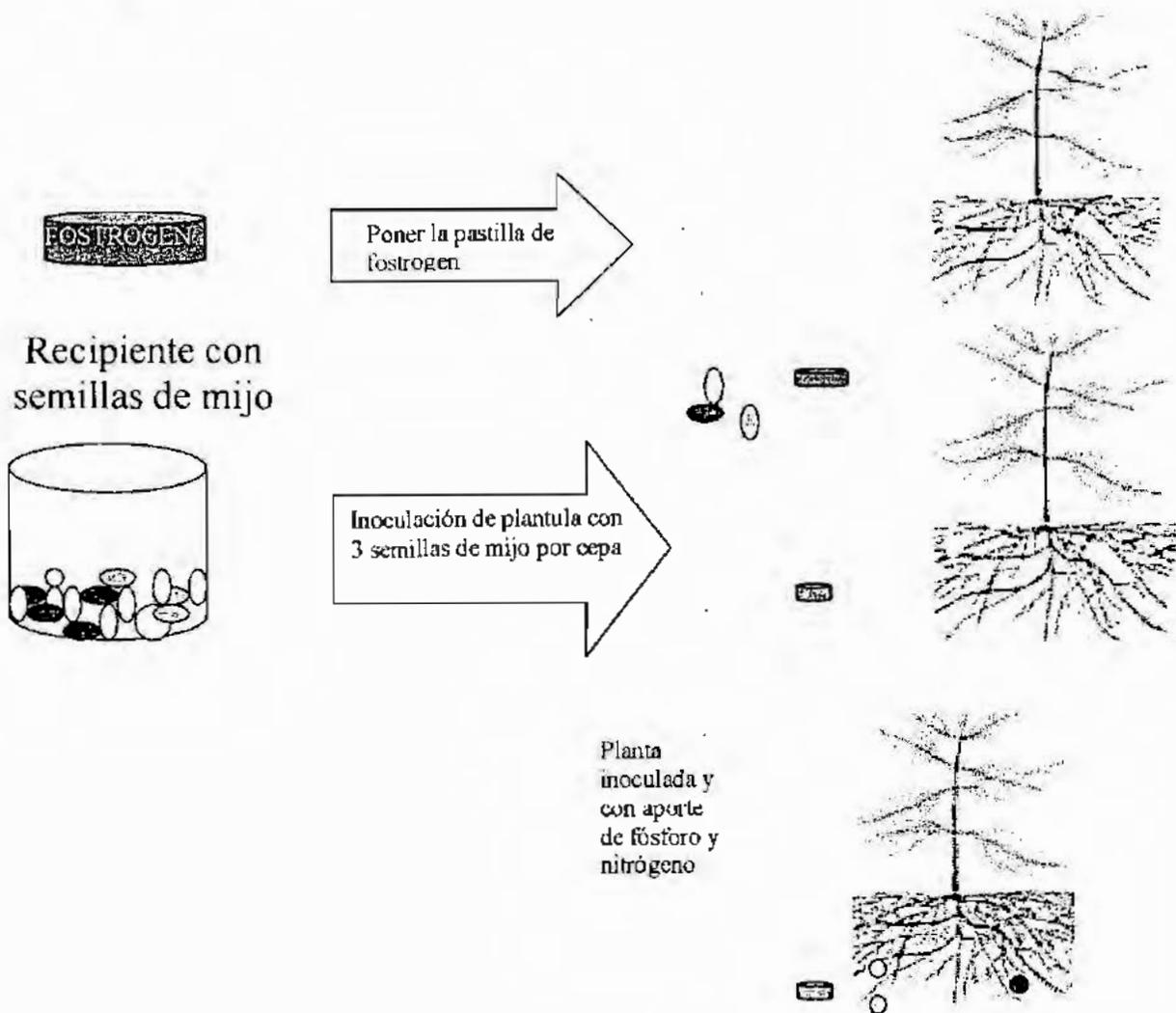
Actualmente se esta evaluando la reacción de las plántulas frente a las demás cepas aisladas, así como también se están realizando ensayos tendientes a realizar la inoculación las orquideas en el estado de protocormo, ya que en este estado se observa con claridad la infección por los pelos radicales.

La identificación de las cepas restantes requiere de materiales con los que no se cuenta en este momento.

Protocolo de infección y trabajo con las Plántulas inoculadas

Primero trasplantar las plántulas al sustrato definitivo, regarlas antes de la inoculación y ponerles la mitad de una pastilla de fostrogen(nombre comercial)sin disolver a 30 cm. Del tallo de la planta, posterior a esto inocular con 3 semillas de mijo por cepa una cepa por vez en forma radial y a 20 cm. Del tallo, cada una semana.

Fig.5



6. FICHAS TÉCNICAS Y ANÁLISIS ECONÓMICO.

Ficha técnica Chloraea

LABOR	año 1		
	Cantidad/ha/año	\$ anual	\$ unitario
preparación de suelo			
rotura	1JTractor	8.000	8.000
confección de mesas	1 J rotovator	8.000	8.000
plantación	6JH	5.000	30.000
Mantenición de plantas			
limpias	36JH	5.000	180.000
riegos	10JH	5.000	50.000
fertilización	8JH	5.000	40.000
Aplicación de productos	8JH	5.000	40.000
productos 1			126.000
TOTALES ANUALES			482.000

LABOR	año 2 al 4		
	Cantidad/ha/año	\$ anual	\$ unitario
Mantenición de plantas			
limpias	36JH	5.000	180.000
riegos	10JH	5.000	50.000
fertilización	8JH	5.000	40.000
Aplicación de productos	12 JH	5.000	60.000
productos 1			252.000
TOTALES ANUALES			582.000

LABOR	año 5 ficha teórica		
	Cantidad/ha/año	\$ anual	\$ unitario
Mantenimiento de plantas			
limpias	36JH	5.000	180.000
riegos	10JH	5.000	50.000
fertilización	8JH	5.000	40.000
Aplicación de productos	12 JH	5.000	60.000
productos 1			252.000
cosecha			
mano de obra	20 JH	5.000	100.000
selección y embalaje	10 JH	5.000	50.000
material de cosecha 2			98.000
TOTALES ANUALES			830.000

1 productos considerados

Switch	2 aplicaciones de 80 g por 100 litros de agua
Rovral	2 aplicaciones de 75 g por 100 litros de agua
manzate	2 aplicaciones de 200 g por 100 litros de agua
benlate	2 aplicaciones de 70 g por 100 litros de agua
fast	6 aplicaciones de 100 cc por 100 litros de agua
ultrasol	30 kg parcializado en 14 aplicaciones

2 material de cosecha

cajas de cartón para 200 varas a 700 la unidad	
bolsas microperforadas para ramos de 10 varas a 50 la unidad	
elásticos	10.000
preservantes para 8000 flores	20.000

7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

El principal problema enfrentado en la realización de este proyecto fue la gestión financiera, como ha sido informado a FIA, se rescata sin embargo el hecho que pese a los problemas se ha logrado mantener el proyecto con aportes del empresario y de los propios investigadores, sin embargo un adecuado financiamiento permitiría concretar los avances. En estos momentos se cuenta con stock de semilla híbrida de segundo año sin plantar, se debe recordar que en almacenaje la especie pierde viabilidad rápidamente.

Otro problema enfrentado en la ejecución de este proyecto ha sido la casi nula información existente en la literatura especializada. Pareciera incluso que nuestros botánicos las hubieran relegado a un segundo plano.

El frágil aspecto que presentan nuestras orquídeas silvestres que crecen desapercibidamente en nuestros campos hace pensar, erróneamente, que son difíciles de cultivar sin embargo son resistentes. Con pocos enemigos naturales y los que las atacan son fácilmente controlables si se detecta el daño en forma precoz.

8. CALENDARIO DE EJECUCIÓN Y RESUMEN DE COSTOS.

Este ítem lo enviará directamente Enrique Matthei.

9. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS:

A medida que comprobábamos con nuestros ojos los avances de adaptación, crecimiento y floración de las orquídeas bajo cuidado, empezamos a divulgarlos.

Sin lugar a dudas, que los congresos internacionales son una excelente tribuna para dar a conocer los trabajos de investigación. Fueron aprovechados estos eventos para divulgar los avances tanto en nuestro país, como en Argentina, Centroamérica y Australia.

Así, previó al Congreso en Perth, asistimos a un curso de Técnicas de Conservación en el laboratorio de la Universidad de Western Australia, contíguo al Kings Botanical Garden.

El poder compartir una conversación cara a cara con los expositores, profesores, investigadores y cultivadores de tan alto nivel, es una experiencia que deja un impacto imperecedero. Agréguese a esto el alto interés que todos manifestaron por nuestras orquídeas del género *Chloraea*, por su belleza, por ser más llamativas y grandes, y por ser aún tan poco conocidas. Estos contactos personales, donde al instante se intercambian tarjetas, son de una importancia impredecible.

Al participar en el Congreso nos dimos cuenta de la meteórica ascensión del cultivo de las orquídeas en las últimas décadas a nivel mundial. Se percibe por la calidad y cantidad de publicaciones, por los eventos científicos, exposiciones de flores, congresos internacionales y el esfuerzo que se despliega a través de varios organismos conservacionistas, que se vive una verdadera "fiebre de las orquídeas."

Fue también altamente estimulante poder comprobar el buen pie en que nos encontramos en cuanto a preparación científica, pese a nuestro inferior desarrollo económico. Lo nuevo que captamos, y que pudimos aplicarlo al instante, son solo diferencias de matices y percepciones marginales.

Tuvimos la posibilidad de contactarnos con la plana mayor de las Organizaciones Conservacionistas Internacionales que también participaron en el Congreso. A Shelagh Kell, Executive Officer de IUCN/SSC Orchids Specialist Group, con sede en el Reino Unido le enviamos un artículo prometido sobre nuestras orquídeas nativas para ser divulgado en sus publicaciones.

Pudimos interiorizarnos que la familia Orchidaceae es una de las angiospermas mejor estudiadas desde el punto de vista filogenético. La nomenclatura celular, basada en el ADN ha contribuido enormemente a su reclasificación, lo que ha sido una verdadera revolución entre los botánicos taxonómicos.

Nos impactó el esfuerzo realizado por Margaret Ramsay del Royal Botanic Gardens, Kew, Inglaterra, en la reintroducción de especies de orquídeas terrestres desaparecidas en esos ambientes naturales utilizando procedimientos conservacionistas que ella misma impartiera durante el Congreso.

Fue muy emotivo compartir momentos con la investigadora danesa Hanne Rasmussen, cuyo texto sobre micorrizas de las orquídeas habíamos leído, así como escuchar del profesor K. Sivasithamparam que había conocido en Europa al Dr. Norberto Garrido.

El trabajo sobre micorrizas presentado por Rodrigo Reinoso, de la Universidad de Concepción, por la similitud, derivada posiblemente del Continente Gondwana, entre las asociaciones fúngicas australianas y chilenas tuvo elogiosos comentarios.

Digno de destacar es el trabajo fructífero que realizan organizaciones conservacionistas como la Australian Native Orchids Society, similar a nuestros clubes de jardines, que van a terreno y transplantan, cuidan y reinsertan plantas amenazadas a sus lugares de origen. Lo que más nos llamó la atención es que no solo jubilados hacen este trabajo voluntario, sino que también muchos jóvenes que están sensibilizados con estos conceptos ecológicos. Para estos fines cuentan con el apoyo de un microsatélite.

Se describieron un sinnúmero de agentes polinizantes naturales y se analizaron técnicas de polinización con fines conservacionistas y genéticos para la obtención de nuevos híbridos, así como preservación de nuevas especies amenazadas.

Se describieron técnicas de polinización artificial practicada a pleno campo a fin de apalear la merma de polinizantes naturales disminuidos notoriamente por los agroquímicos. También aquí nos llamó la atención la cantidad de voluntarios bien capacitados, de todas las edades, que tomaban parte con entusiasmo y convicción. En estas especies con disminución progresiva de plantas, se detectó que muchas quedaban prácticamente sin ser polinizadas por largos periodos, lo que hacía peligrar su sobrevivencia.

Se dieron a conocer las técnicas más avanzadas de reproducción in vitro con aplicación inmediata para los cultivadores de orquídeas a gran escala. Como dato ilustrativo queremos mencionar el estudio de las orquídeas realizado en Nueva Guinea, y presentadas en CD Room, por el Dr. Ed de Vogel. Es una forma moderna y funcional que va a probar la enorme utilidad de esta nueva técnica de divulgar la ciencia. En esta isla, que es la más grande después de Australia, aún existen cientos de orquídeas que no han sido descritas por ningún botánico y es más, hay especies ya extinguidas que nunca fueron documentadas y que fueron arrasadas por coleccionistas inescrupulosos.

Durante las salidas a terreno pudimos palpar el interés, el cariño, la veneración, la preocupación para que no se dañen ni se extingan que demostraban todos los participantes por estas plantas. Era notorio que ese espíritu conservacionista estaba en su patrón de cultura arraigado desde generaciones.

Se adjuntan también artículos publicados en diarios y revistas así como también en la televisión.

La respuesta a esta difusión a sido sorprendente y estimulante tenemos una lista de personas que nos han llamado o se han comunicado con nosotros demostrando un alto interés en nuestras orquídeas nativas.

10. IMPACTO DEL PROYECTO.

Después de haber estudiado durante años con un grupo de investigadores de tres Universidades chilenas, en invernadero, bajo sombreadero y a cielo descubierto, y de haber hecho un seguimiento riguroso y sistemático de su hábitat natural y en laboratorio, pensamos que la magia de este proyecto, fuera de preservar un valioso, endémico e irremplazable patrimonio genético amenazado y de tratar

de obtener un híbrido exportable, está también la posibilidad en hacer crecer, sin mayor problema, como cultivo intercalado, a la orquídea silvestre bajo el acogedor sosiego de los añosos bosques de pinos, cristalizando así las tantas veces enunciada, pero tan difícil meta de alcanzar, armonía entre el desarrollo económico y el equilibrio ambiental.

El pino radiata, procede del sur de los Estados Unidos, zona de Monterrey, California. Introducido en Chile, hace más de un siglo a la VIII Región, ha tenido un desarrollo vertiginoso, siendo por excelencia el árbol responsable del exitoso avance forestal. Al intervenir estas masas boscosas artificiales, con raleos oportunos y podas en altura, es posible, y aquí está la innovación tecnológica, incrementar ostensiblemente las condiciones naturales de microclima favorable al desarrollo de las orquídeas terrestres, como cultivo intercalado, derivando a una nueva actividad altamente rentable.

El desafío está en sacar provecho de esta circunstancia de establecer relaciones equilibradas ritmos y pautas de crecimiento como para establecer una agroforestería incipiente.

Se trata entonces de prolongar la edad de las rotaciones boscosas, preservar al máximo su desarrollo sustentable, incorporando de un modo sabio y constructivo, el cultivo intercalado de las orquídeas silvestres, transformándose en un recurso compuesto de potencialmente enorme valor.

Al aumentar la diversidad biológica, de estos silenciosos e imponentes bosques hasta ahora tan inadecuadamente estudiados, se podrían utilizar no solo como fuentes de producción de madera sino que también satisfacer una necesidad básica del alma humana, la belleza, con flores de orquídeas emergentes.

Expresado comparativamente, se trata de emular en forma aleatoria al compositor Richard Wagner, quién trató de lograr en sus óperas el concepto de Gesamtkunstwerk, quiere decir una obra de arte total. Un bosque hortícola, imponente como una catedral, donde se escuche el silencio repleto de flores, follaje, pájaros e insectos polinizadores, hongos micorrícicos en su suelo alfombrado y fascinantes aromas, puede llegar a ser una obra de arte vegetal comparable a una sinfonía.

El informe de las Naciones Unidas de las relaciones de la humanidad con su planeta es bastante pesimista. Cada día se cortan 159 kilómetros cuadrados de bosques.

Las zonas con cubierta vegetal se hacen cada vez más escasas. Sube el nivel del mar y aumentan los índices de contaminación. En síntesis, el sistema de modelo de desarrollo compromete la seguridad a largo plazo del planeta y su gente.

Así, entonces esta antigua tecnología de bosque mixto es capaz de revertir este oscuro panorama que tiene un verdadero sentido de urgencia. Constituye una alternativa segura, sustentable, no contaminante y sobre todo profundamente práctica. Debe ser desarrollada, tal como lo afirma Robert Hart en su libro *Forest Gardening*, para que pueda ayudar a conducirnos a la Era Postindustrial, más segura, gentil, calmada, pacífica y amigable con el medio ambiente.

Las técnicas conservacionistas de propagación, cuyos conocimientos se potenciaron con la participación al Congreso en Perth, tanto por semillas como vegetativamente en laboratorio, aplicadas por primera vez a este género por este Proyecto FIA servirá para salvar del peligro de extinción a especies endémicas chilenas que ya figuran en los Appendix de plantas amenazadas.

Por otra parte la estrategia más importante para conservar las orquídeas es conservando su hábitat. En tal sentido este Proyecto FIA ha venido a llenar un vacío existente al comenzar una investigación ecológica básica de *Chloraea* nativas, que si bien es cierto están descritas desde hace siglos, es muy poco lo que se sabe de ellas.

Otro logro, dentro de la gran variabilidad que presentan, fue el hallazgo de una *Chloraea crispa* de mayor tamaño y vistosidad que creciera por más de cien años en un nicho ecológico artificial, largo y

estrecho, paralelo a la línea del ferrocarril a la antigua zona carbonífera costera de la provincia de Arauco. El carboncillo así como la fertilización orgánica, produjeron estos ejemplares, de los cuales se está utilizando su polen, que ya tienen una nomenclatura genética distinta.

Las condiciones de fertilidad favorecieron su exuberante crecimiento logrando una variabilidad genética diferente. Distinta a sus progenitores que existieron antes de 1886, cuando empezaron a correr los primeros trenes de la Compañía Arauco limitada, que unía a la capital de la Octava Región con Curanilahue.

Pensamos que también debe considerarse como un impacto del proyecto el hecho de haber podido comprobar, que todas las actividades que se realizaron para igualar y mejorar las condiciones naturales en que se desarrollan, repercutió a la larga, favorablemente a su excelente adaptación y respuesta positiva. El mero hecho de haber transplantado plantas de orquídeas de distintas edades para ser estudiadas más de cerca, y de haber tenido un altísimo porcentaje de prendimiento fue algo que nos sorprendió. Siempre les decía a los trabajadores que se debió a la "buena mano".

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Conclusiones Generales

La demanda por nuevas especies y nuevos híbridos es incesante. Este es el nicho de oportunidades que debemos aprovechar. La singular belleza de nuestras orquídeas silvestres algunas de ellas endémicas, sigue siendo tan desconocida tanto aquí como en el extranjero.

Particularmente en años recientes se vislumbra un incremento en el interés por la diversidad ecológica, debido a que el progreso tecnológico ha dado como resultado un mundo en que los recursos naturales disminuyen rápidamente.

En tal sentido, la gente, la tierra y la vida silvestre están estrechamente entrelazadas. Los cambios en uno de los componentes inducen cambios en los otros dos. Indiscutiblemente, en algún momento, en el transcurso del tiempo, podemos manejar a nuestro albedrío el sotobosque de las plantaciones artificiales de *Pinus radiata* que gozan de un microclima particularmente grato a nuestras Chloraeas. La Dra. Hanne N Rassmussen, que tuviéramos la oportunidad de conocer en el Congreso Internacional en Australia describe un hongo micorrízico europeo que lo comparten tanto las coníferas como las orquídeas, potenciando ambos su desarrollo.

No sería de extrañar, al proseguir con el aislamiento de las micorrizas obtenidas a los rizomas que alguna de ellas compartiera también los efectos simbióticos con los pinos u otras especies. Tal vez esto ayudaría a explicar la abundante colonización espontánea de estas plantas en las especies arborescentes de coníferas introducidas.

Aprovechando estas condiciones específicas, es posible, cultivarlas en este microclima, bajando así los costos y pensando no en una competencia, sino en una planta agregada, generadora de belleza y divisas, al bosque.

Indiscutiblemente que debemos preocuparnos más de nuestras orquídeas nativas, sobre todo, de las endémicas ya que crecen solo en nuestro territorio. La disminución poblacional es evidente.

Al final, con mucha modestia pero a la vez con profunda emoción me atrevo a opinar que con este proyecto FIA de investigación C98-1-A-022 las técnicas conservacionistas aprendidas y aplicadas a nuestras orquídeas en situación desventajosa va a contribuir a su multiplicación masiva, y acelerada, lo que las alejará de su extinción definitiva. Precisamente de la suma de buenas acciones individuales, como pudimos observarlo en los grupos conservacionistas en Perth con nuestros propios ojos,

depende, en definitiva que el justo equilibrio con la naturaleza pueda asegurarnos su legítima subsistencia.

Conclusiones específicas

a) Evaluaciones fenológicas y de crecimiento

Después de las evaluaciones fenológicas y de crecimiento realizadas a las diferentes poblaciones se concluye que el crecimiento de las plantas se define en 5 etapas. Donde el desarrollo vegetativo se presenta a inicios de otoño (inicio de precipitaciones), seguido de una alta tasa de crecimiento durante el invierno, hasta llegar a la estabilidad del crecimiento vegetativo en primavera e inicio de floración.

Esta especie presenta un rizoma perenne que cada año forma nuevas raíces sobre el rizoma inicial, presenta hojas acaules (roseta basal) y una inflorescencia indeterminada como espiga, desarrollando entre 10-20 flores, alcanzando entre 80-100 cm. de altura, conformando una vara erecta y gruesa, que permite que sea autosoportante, teniendo buenas cualidades como flor de corte. La apertura floral es acrotónica y la duración de postcosecha es de alrededor de 20-25 días. Ensayos preliminares de postcosecha indican que los estados primarios de cosecha (botón cerrado) son inadecuados por presentar menor porcentaje de flores abiertas, los otros estados evaluados presentan buen desarrollo floral, sin embargo posteriores trabajos son necesarios para poder concluir al respecto.

A pesar que las poblaciones evaluadas presentan homogeneidad en cuanto al color y forma de las flores, no se detectaron indicadores de correlación lineal entre características morfogénicas y productivas, que pudieran ser usadas como indicadores de calidad antes de tener flores en un programa de mejoramiento genético.

A si mismo se observó que la floración ocurre año por medio en la naturaleza, patrón de comportamiento que puede ser modificado parcialmente, con manejos de fertilización.

En este punto se requiere mayor investigación para dilucidar los procesos que intervienen en la inducción floral.

b) Evaluaciones de plantas creciendo en Yumbel

Se concluye que la especie tiene requerimientos térmicos definidos, indicando que las plantas responden a temperaturas medias de entre 15-20° C durante su desarrollo, y en estado iniciales (vegetativos) se aprecia una resistencia a las bajas temperaturas (hasta -6° C). Así mismo temperaturas mayores a 33° C, afectan el desarrollo de estas induciendo a un estado de receso. Además la diferenciación floral comienza en la etapa III, con el aumento de las temperaturas.

Como primera aproximación la especie requiere 1500 días grados para iniciar el proceso de elongación floral, llegando a los 2000 días grados para la aparición de la inflorescencia, requerimientos alcanzados en los meses de noviembre y diciembre en la localidad de Yumbel.

El mejor desarrollo de plantas se obtuvo en los cultivos realizados en invernadero en macetas, donde se pudo controlar de mejor manera los diferentes factores que afectan su desarrollo, tales como plagas y enfermedades, fertilización, y riego.

Esta especie crece naturalmente en dunas estabilizadas, donde el suelo presenta textura arenosa y una densidad aparente de 1.09 gr/cc, confiriéndole una alta porosidad al suelo (58%), la cual es adecuada para el cultivo de especie geófitas.

d) fertilización en macetas

Se puede realizar fertilización vía suelo y foliar, lográndose mejores resultados con fertilizaciones al suelo, donde en un primer ensayo se logra revertir alrededor de un 10% la bianualidad de las plantas. Trabajos posterior son necesarios para obtener información confiable respecto a este punto.

e) detección experimental de comportamiento reproductivo

La polinización de esta especie se realizada con polen de la misma planta, como de otras plantas de la misma especie, indicando que la especie es autocompatible. Siendo factible realizar hibridación por medio de la polinización cruzada, para la obtención de variedades comerciales.

Esta actividad no estaba considerada en el proyecto, por lo que significa un aporte extra al mismo, generándose el inicio de un programa de hibridación

f) Ensayos de germinación micorrícica

Se concluye que se logró establecer un protocolo de germinación micorrícica en semillas de orquideas del género *Chloraea*, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, puesto que se lograron obtener plántulas a partir de semillas.

A la luz de los resultados se recomienda desinfectar las semillas de *Chloraea crispera* con una concentración de hipoclorito de sodio no superior a 2% por 3 minutos, a través del método del tubo.

Se seleccionó el hongo NM3, después de evaluar la especificidad de 6 hongos en la germinación simbiótica de semillas del género *Chloraea*. Es destacable notar que el hongo NM3, perteneciente al género *Rhizoctonia* y que fue aislado originalmente desde plantas de *Chloraea crispera*, presentó características beneficiosas como agente micorrícico, en el proceso de germinación de semillas de la especie *Chloraea crispera*.

g) Propagación vegetativa

Para esta etapa, se eligieron plantas provenientes de terreno a las cuales se les extrajo un sector de tejido entre el tallo aéreo y el rizoma, que corresponde a la zona meristemática donde se encuentran las yemas. Los explantes fueron sembrados en medio Van Waes.

En la primera etapa de este ensayo se probaron 6 métodos de esterilización superficial. Sin embargo persistió una intensa contaminación (100%) con hongos indicando que ninguno de ellos es efectivo.

El establecimiento en condiciones axénicas (estériles) fue un problema no resuelto. El alto índice de contaminación no permitió obtener plantas por esta vía. Sin embargo, los métodos empleados no atentaron contra la viabilidad del material, de manera que es posible superar este objetivo en una segunda etapa.

h) propagación por semillas maduras e inmaduras

El proceso de inducción y multiplicación de embriones somáticos, así como el desarrollo de raíces de las plantas obtenidas se realizó con semillas de 46 plántulas diferentes. En todos los casos se llevó a cabo a cabo exitosamente la regeneración, y las plantas obtenidas, adecuadamente identificadas fueron trasladadas tanto a Quillota como al Fundo Los Ríos de Yahuillo.

Se desarrollo un método eficiente para acortar el período de germinación y formación de plántulas. Utilizando el medio de inducción Van Waes suplementado con BAP se desarrollaron los embriones. Para la obtención de plántulas a partir de E.S., se utilizó el medio Murashige-Skoog, 1962 (MS), suplementado con 20 g/L de carbón activo y 1000 g/L de plátano. Se evaluó comparativamente la aparición de clorofila (días), altura de las plantas (cm), número de hojas en el tiempo. Y macollamiento (=tasa de propagación). Con un tamaño mínimo de 1 cm son transferidos a medio de enraizamiento.

Al medio Murashige-Skoog, 1962 (MS) se adicionó carbono activado con diferentes concentraciones de auxina para la inducción de raíces.

Es posible regenerar plántulas tanto con semillas maduras como inmaduras, prefiriéndose las segundas por efectos de menor contaminación.

En este momento hay 32 clones en etapa de multiplicación, 2 en etapa de enraizamiento y 24 en etapa de desarrollo embrionario. Han salido 24 clones a campo en los 4 años.

i) Mantenimiento de líneas seleccionadas

Respecto a los cruces dirigidos tenemos 7 en oscuridad en etapa de desarrollo embrionario, 4 en foto período en etapa de multiplicación, 2 en etapa de enraizamiento y, 7 de ellos han salido a campo.

j) Criopreservación

Esta actividad no estaba considerada en el proyecto, por lo que significa un aporte extra al mismo.

Bajo el marco de Unidades de Investigación (3), dentro del Programa de Doctorado en Biología Molecular se determinó el contenido de agua de embriones somáticos mediante curvas de desecación, así como también se definió el tiempo máximo que los embriones soportan la desecación sin perder viabilidad. También que los protocormos de tamaño pequeño y aspecto cristalino no sobreviven al precultivo, pero los de mayor tamaño son capaces de soportar en mejores condiciones la fase de precultivo. Se recomienda el uso de protocormos de mayor tamaño y/o desarrollo y aumentar el número de muestras, verificando su viabilidad antes de comenzar otros ensayos.

k) Semillas sintéticas

Los embriones encapsulados crecen y se desarrollan en plantas, de inmediato, por lo que se ideó formas para que no germinen en forma espontánea sino que ingresen a un periodo de dormición, para finalmente tener un banco de germoplasma de semilla sintética la cual debiera ser potencialmente capaz de germinar al lixiviar los inhibidores. La actividad consistió en detener el proceso natural de germinación del embrión somático, a través de la elaboración de una cápsula de alginato de sodio que rodea al embrión, con diferentes agentes inhibidores, tales como ácido abscísico (ABA), manitol o ambos y evaluar el efecto de la temperatura en la dormición del tejido. Este objetivo no se ha logrado completamente.

El protocolo desarrollado para la generación de semillas sintéticas permitió infectar éstas con los hongos identificados, indicando que no es el mejor material para ello. No así las plantas que sí mostraron una respuesta efectiva al proceso de infección, tanto en campo como en laboratorio.

l) Identificación de patrones genéticos mediante DAF

La técnica de marcadores moleculares para la determinación de especies vegetales usando para ello PCR y primers aleatorios, demostró ser una buena herramienta en la determinación de patrones genéticos de *Chloraea* sp. El estudio de marcadores moleculares usando la técnica DAF cumplió en gran medida los objetivos propuestos y que eran encontrar marcadores o huellas genéticas diferenciales a las diferentes especies de *Chloraea* colectadas. Hemos contribuido a generar la base de futuros estudios en este mismo sentido, generando información valiosa para la aplicación de otras técnicas moleculares de estudio como ser AFLP, RAPID, etc.

Esta técnica no ha sido descrita para el material vegetal presentado, por cuanto no existen experiencias previas al respecto, en bibliografía básica ni en estudios de laboratorio, de igual forma tampoco existe información relativa a la obtención de material genómico no encontrándose optimizado

este procedimiento. Para este último punto se utilizó el procedimiento de CTAB descrito por Weising et al. (1990) y modificado en el laboratorio para la optimización del mismo.

m) Contaje cromosómico

Esta actividad no estaba considerada en el proyecto, por lo que significa un aporte extra al mismo.

Fue abordado tanto por el Licenciado Rodrigo Reinoso, quien hizo el recuento cromosómico de *Chloraea virescens* (46) y lo envió a publicación, como en Unidad de Investigación del Doctorado en biología Molecular con *C. crispata*. Utilizando el método de la hidroquinolina (Hommo y Sakilahti, 1985) se determinó que esta especie tiene 42 cromosomas. Es necesario repetir esto en otras especies.

Se ensayaron diferentes metodologías, indicando que la colchicina no es efectiva, puesto que los cromosomas de *Chloraea sp.* son muy pequeños y se compactan aún más.

n) Manuscritos para publicación

El grupo de cultivo de tejidos envió un manuscrito para publicar en revista ISI. Aún está en revisión.

o) Anatomía foliar

Esta actividad no estaba considerada en el proyecto, y se abandonó por acuerdo tomado en reunión técnica. Sin embargo, queremos señalar que los cortes transversales a mano suelta de hojas jóvenes de *Chloraea sp.* para distinguir su anatomía entre C3, C4 o CAM señalan una cutícula delgada, epidermis monoestratificada y un abundante parénquima clorofiliano, sin rastros de anatomía Kranz, como cabría esperar si se tratara de una planta C4. Se recomienda hacer análisis enzimático para actividad de PEP carboxilasa o detección de niveles de ácido málico.

p) Protoplastos

Esta actividad no estaba considerada en el proyecto, sin embargo establecimos el protocolo para aislar protoplastos y regeneramos hasta la etapa de callo.

q) Micorrizas

Sin duda que quedan muchos ensayos que realizar para aumentar la producción y la eficiencia en el cultivo de Orquídeas Chilenas, pero los ensayos realizados indican que ya se puede comenzar a trabajar con los resultados que existen.

Las cepas M2, *Rhizoctonia sp.* (NM3) y *Cenococcium geophilum* presentan un buen punto de partida para inocular las plantulas a escala comercial, el método planteado en la fig.5. esta fundamentado en el hecho de que las micorrizas del tipo orquidacea transportan sustancias del suelo a la planta cerca de 30 cm., por lo que la pastilla de fostrogen entrega la fuente de fosfato para que la micorriza este activa realizando el traspaso de fósforo a la planta.

El estudio de toxicidad realizado, presenta un avance en el control de los hongos fitopatogenos, ya que relaciona el funcionamiento del simbiote con la defensa de la planta, por lo que se puede usar oxiclورو de cobre en la defensa de la planta frente al ataque de los hongos fitopatogenos.

Así también se aconseja en estudios futuros aislar las cepas de patógenos que atacan a la planta para buscar las posibles protecciones al ataque de estos hongos.

r) Haploides

Esta actividad no estaba considerada en el proyecto. Sin embargo colectamos yemas florales en distinto estado de desarrollo para determinar su relación con el estado de desarrollo de la microspora. También cultivamos óvulos. Ambos ensayos están en curso.

s) Congresos internacionales

Se presentaron 3 trabajos. Uno en Costa Rica, otro en Argentina, otro en Cuba.

t) Congresos nacionales

Se presentaron 4 trabajos nacionales

u) Giras tecnológicas

Se realizó una gira tecnológica a Australia, contando con la participación de 4 miembros del proyecto.

12. OTROS ASPECTOS DE INTERÉS

Al profesor de botánica de Londres John Lindley (1799- 1865) se debe la creación del género *Chloraea*, en el año 1827. Se basó principalmente en los herbarios de colecciones chilenas, alguna de las cuales fueron descritas por primera vez más de un siglo atrás, vale decir en 1714 por el explorador, astrónomo y botánico francés Padre Luis Feuillée, al visitar nuestras costas.

Nos permitimos copiar una parte en latín de la acuciosa y detallada descripción botánica de la *Chloraea crispa* Lindl. Llamada comunmente "liño de campo": *C. labello subrotundo -oblongo apice crispo nudo basi subintegro et pone margines pilloso, venis centralibus 7-9 setosis, sepalis lateralibus apice vix incrassatis, petalis acutis parum brevioribus basi granulosis. Hab. In Chile prope Concepción*".

Hasta hace poco existía entre los expertos acaloradas controversias taxonómicas debido en parte a lamentables confusiones de sinónimos. Esto se explica por el abultado número de nombres que poseía una misma planta. En gran medida se debió a que fueron descritas y registradas por distintos naturalistas con intervalos de tiempo muy prolongado, ignorando los últimos que la orquídea que tenían ante sus ojos, ya había sido descrita, clasificada y registrada en alguna publicación pretérita.

Hasta las últimas décadas la clasificación de una planta se basaba en la descripción de sus caracteres morfológicos. Pero recientemente nuevas técnicas que se afirman en la biología molecular, han causado una verdadera revolución en la forma de pensar de los botánicos.

Por su rigor científico desde ahora en adelante están obligados a adherirse a la utilización de este nuevo código clasificatorio. Con la ayuda de computadoras, es posible, en un abrir y cerrar de ojos, descifrar, junto al ADN y un sinnúmero de variables, el equivalente a la huella digital de cada planta.

Los australianos, en general todo el mundo anglosajón, que habita en la Comunidad Británica de Naciones, viven en un estrecho contacto con sus orquídeas nativas, que cuidan y veneran. Son respetuosos al grado sumo de la vida silvestre y disfrutan inteligentemente de la abundancia y beneficios que les ofrecen las flores del "Bush" se han impregnado con la honda conservacionista. Prácticamente son los líderes mundiales de toda la legislación proteccionista de la flora y fauna amenazada o en peligro de extinción. Esta actitud es contagiante. Lo pudimos palpar en carne propia durante las salidas a terreno en Perth.

Son numerosas las organizaciones no gubernamentales que reúnen a una gran cantidad de jóvenes y adultos para ejecutar trabajos con miras a salvaguardar y proteger especies de orquídeas amenazadas. No solo las han estudiado exhaustivamente, sino que en muchos sitios, donde la merma poblacional era evidente, se preocuparon de reinsertarlas y protegerlas en forma artificial.

En 1998 la World Conservation Union, IUCN, al publicar la lista roja de las 33 mil plantas vasculares amenazadas, estimó que más de un 5 % de esta lista corresponde a orquídeas.

Surgieron así una serie de organismos internacionales que se preocuparon de legislar para salvaguardar esta especie. Chile a suscrito estos convenios.

No siempre se han logrado los objetivos proteccionistas que persiguen éstas organizaciones como CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna), cuya última sesión plenaria la efectuara en Santiago a fines del año 2002.

Así por ejemplo, la reacción que surgió a esta aparente buena intención para salvaguardar a las especies más raras y amenazadas fue precisamente lo contrario. Hizo subir dramáticamente los valores de mercado de estas especies más escasas que crecían en la naturaleza en los rincones más apartados del mundo.

Otro error involuntario en que incurrieron los legisladores de esta organización proteccionista fue que echaron en un mismo saco a los coleccionistas de orquídeas que trabajaban mancomunados con prestigiosos organismos de investigación botánica y los contrabandistas de orquídeas que se relacionaban con viveristas y comerciantes inescrupulosos.

Lo digno de destacar es que con CITES se logró atraer la atención hacia la flora amenazada, pues antes, captaban todo el interés en salvaguardar solo al reino animal, especialmente elefantes, rinocerontes, y otros animales en peligro de extinción.

Lo que sorprende, es el inmenso poder que ha logrado acumular en sus manos, en un corto plazo, esta organización con sede en Ginebra. Su estructura autocrática y casi dictatorial, donde no es posible apelar a un fallo, hace que en la realidad se observen efectos boomerang en la salvaguarda de especies botánicas amenazadas.

Han sido las técnicas de reproducción masiva en laboratorio lo que ha venido a rescatar de la extinción a numerosas especies.

Indiscutiblemente que la meca en la reproducción artificial de híbridos de orquídeas exóticas está en la denominada O.Z (Orchids Zone) cerca de Watsonville, California, Estados Unidos.

Con invernaderos que abarcan enormes superficies albergan más de 1 millón de orquídeas exóticas bajo cultivo intensivo con tecnología de punta, donde se controlan por computadoras la luminosidad, temperatura y humedad relativa.

Como algunas especies no son reproducibles mediante las técnicas de cultivo de tejidos, hay que recurrir a la polinización artificial para propagarlas. Los genetistas sueñan y juegan para hacer resaltar características morfológicas de las flores que realce su belleza y poder de atracción.

En torno a la hibridación de orquídeas ha nacido toda una industria. Es un acto de creación que refleja un estilo individual. Es más arte que tecnicismo. Desde la germinación de la semilla hasta llega a florecer, pueden transcurrir de 6 a 18 años, con grandes inversiones de capital, paciencia, jactancia y fe ciega.

Si bien es casi seguro que los genetistas jamás han pisado el lugar donde las orquídeas crecen en forma natural, han aprendido que liberándolas de los agentes estresantes, dosificando y

administrando en forma adecuada el balance de nutrientes, agua, luz, temperatura, humedad relativa y circulación de aire, son capaces de obtener flores altamente atractivas, donde un solo ejemplar de un nuevo híbrido exótico puede llegar a costar 75 mil dólares.

En esta región tan especial del mundo de las orquídeas se producen 10 mil plantitas de nuevos híbridos mensualmente y un solo cultivador es capaz de generar 2 mil nuevos híbridos al año.

En la década de los 60 la clase media norteamericana se había contagiado con la pasión por el cultivo de orquídeas dejando de ser un pasatiempo elitista, ya que los *Cymbidium*, *Cattleyas* y *Phalaenopsis* estaban al alcance de sus manos gracias a las técnicas de clonación meristemática que permitía reproducirlas masivamente.

Como sucede con la sobreoferta y saturación del mercado, la gente se aburría de adquirir siempre esta misma especie y optó por la búsqueda de nuevas flores. Se repitió así el mismo fenómeno acaecido a mediados del siglo XIX, ir tras la búsqueda de nuevas especies exóticas que crecen en ultramar. Como se trata de una industria en la cual se transan año a año, millones de ejemplares, surgió nuevamente el temor que las especies exóticas más solicitadas eran precisamente las que estaban en la lista roja de especies amenazadas o en vías de extinción.

Surgió así en la década de los 80, una tendencia a legislar en forma estricta el tráfico internacional.

Si bien aparentemente pareciera que todo está bajo control la realidad indica que todavía queda un largo camino para salvaguardar aquellas especies más sensibles a la depredación

13. ANEXOS.

El origen de la fascinación provocada por las orquídeas se remonta a la antigua China. Según la leyenda, dos mil ochocientos años antes de Cristo ya se cultivaban estas plantas con fines medicinales, tradición aún vigente en todo el sudeste asiático. Confucio las llamó "la reina de las plantas aromáticas". Posteriormente su popularidad se extendió a Japón, donde los miembros de la realeza la utilizaban para perfumar sus vestimentas. Los samuráis las cultivaban en sus ratos de ocio.

Seguramente fue el hechizo de su belleza que sedujo a los primeros viajeros y naturalistas, que desde tiempos coloniales, arribaron esporádicamente a nuestras costas, para describirlas, registrarlas y perpetuar su nombre, tanto en sus crónicas de viaje como textos de botánica. Cada uno, tras un minucioso trabajo de campo, sin saber que ya era conocida, le fue agregando un nombre en latín, que a su modo de ver, le parecía apropiado.

Así por ejemplo, nuestra esbelta y de escultural elegancia *Chloraea gaviu*, Lindl, de un llamativo color amarillo intenso, fue acumulando las siguientes denominaciones con el paso del tiempo, después del primer registro realizado por Feuillée en 1714. :*Cymbidium luteum* Willd. (1805).*Chloraea lindleyii* Pöpp, (1833), *Chloraea virescens* Lindl. (1840), *Chloraea spectrum* (Reichb. f. (1891) *Chloraea semitensis* Kränzl. (1904).. *Chloraea lutea* (Willd) (1914). *Chloraea lotensis* Rolfe (1916)

Se debe a la Dra. en Ciencias Naturales argentina Maevia M. Correa, tras una concienzuda revisión, tanto de la literatura botánica como de herbarios y museos de América y Europa, el haberlas reclasificado y catalogado de acuerdo a sus caracteres morfológicos relevantes.

La era del colonialismo europeo extendió su expansión en forma acelerada. A comienzos del siglo XVI la *Vainilla paniflora*, una orquídea proveniente de México, era enviada a España como perfume y saborizante del chocolate caliente. La Compañía Holandesa East India recolectaba especies desde India, Java; Japón e Isla de las Especies y también los misioneros jesuitas, mercaderes, e incluso los filibusteros James Cook y Francis Drake.

El apogeo de la depredación y su posterior aclimatación en invernaderos alcanzó su clímax en Inglaterra durante la Era Victoriana. Era signo de status social cultivar orquídeas provenientes de las regiones más remotas, no solo del Comun Welth, sino que del mundo entero.

Lo sorprendente de estas plantas es que son utilizadas también en la obtención de alimentos, vestimenta, pigmentos, medicina, lubricantes, afrodisiacos, adhesivos, cuerdas para instrumentos musicales, cosmética, perfumes, saborizantes, (como la ya mencionada vainilla) además de su carácter místico o religioso que se le da en ciertos países del Asia.

Todavía son consideradas la realeza de las flores. Un símbolo sofisticado y exótico por ser tan delicadas y raras. En la pendiente del traje de noche de muchas famosas estrellas de cine y en el ramo de las novias de todo el mundo siguen siendo protagonistas de un momento estelar, fugaz y llamativo. Siempre están de moda. Sus flores son enviadas con la asesoría de floristas exclusivos en delicados envases con dedicatoria.

Desde siempre se las asocia con la exclusividad y el ultra refinamiento. El listado de personajes históricos que han demostrado su fascinación por ellas es interminable. Muchos coleccionistas, hoy en día, pagan miles de dólares por sus variedades más exclusivas.

En los países desarrollados su cultivo a comienzos de 1950 con aficionados en el patio trasero, ha derivado a una industria altamente especializada que mueve más de nueve billones de dólares a nivel mundial.

Solo la American Orchids Society, una de las asociaciones de plantas más grandes de los Estados Unidos reúne a más de 26 mil miembros.

En Nueva Guinea, por ejemplo el paraíso de las orquídeas según los expertos, hubo especies, hoy ya desaparecidas, que no alcanzaron a ser descritas, ni catalogadas y registrada por los botánicos. Una pérdida irreparable.

Sin ir más lejos en la V Región de Chile, una orquídea endémica la *Chloraea heteroglossa* ha disminuido su población en proporciones inquietantes, sospechándose que debe darse por extinguida.

Pese a los organismos y acuerdos internacionales que velan por ellas y tratan de salvarlas, dado a la gran demanda y a las redes de traficantes que aún subyacen operativas, las han llevado a una merma peligrosa. Muchas especies hoy se encuentran en la lista roja de plantas amenazadas.

En 1973 las orquídeas quedaron protegidas, en teoría, por el Acuerdo de Washington sobre el Comercio Internacional de Especies de Fauna y Flora en Peligro. Chile ratificó ese acuerdo.

Otras de estas entidades, con una legislación muy estricta, con sede en Ginebra, se conoce por la sigla CITES (Convention on International Trade in Endangeret Species of Willd Flora and Fauna) que publica, año, tras año, un Appendix o listas de animales y plantas amenazadas o en vías de extinción. La principal asesoría botánica proviene del Royal Botanic Gardens, Kew, Inglaterra.

Mencionemos además IUCN (The World Conservation Union) SSC (The Species Survival Comission) Orchids Specialist Group, también con sede en Suiza, a la cuál han adherido 188 países y realiza una encomiable labor de difusión sobre diversidad biológica y su conservación.

Queda en claro, que en estos países que suscribieron este acuerdo, donde Chile también está incluido, no está permitido exportar orquídeas nativas. Lo que sí se puede son los híbridos obtenidos por cruzamientos y selección genética. Precisamente esta es una de las interrogantes aún sin resolver de nuestro proyecto de domesticación de orquídeas nativas.

A fin de estar al día en todo lo referente al cultivo y futura comercialización de nuestras orquídeas, respetando todos los convenios internacionales que al respecto Chile ha suscrito, hemos cumplido con fecha 5 de Agosto del 2002 este trámite ante el Servicio Agrícola y Ganadero. El Certificado de Inscripción N° 479 otorgado a Chilean Terrestrial Orchids acredita que se encuentra inscrito en el Registro Regional bajo el N° OR- 724-LA.

Orquídeas silvestres chilenas futuras embajadoras.

Una vez finalizado el Proyecto de Domesticación de nuestras orquídeas silvestres, que ha contado desde sus inicios con el respaldo de la Fundación para la Innovación Agraria, habrá que otorgarles un pasaporte oficial para desempeñar misiones de representación florística como embajadoras plenipotenciarías. Reúnen las más excelsas condiciones, tanto por su rancio linaje, como por ser genuinamente chilenas, para cumplir estas exclusivas y originales funciones. Han alzado su fina y esbelta figura, en nuestro suelo patrio, desde sus más remotos orígenes.

Ya pudimos apreciar el poder de atracción y convocatoria que poseen, al participar en el Primer Congreso Internacional de Conservación de Orquídeas, celebrado en Perth, la capital de Australia Occidental. Con su elegancia y exotismo son capaces de superar fronteras, profundizar la amistad y concitar simpatía y admiración. La fascinación que provocan e irradian es contagiante. El cultivo de las orquídeas en países del hemisferio norte, ha generado una honda expansiva que ha derivado en una industria altamente especializada que mueve millones de dólares.

Son únicas, las que en algo se les asemejan, son sus parientes lejanas, allá en la Última Frontera, en Papua y Nueva Guinea, cuando con toda esa masa de tierra estábamos unidos hace ya 60 millones de años. Con la derivación de los continentes se fueron separando y adaptando a las nuevas condiciones. Sin embargo, guardaron sigilosamente a través del tiempo geológico, caracteres en su nomenclatura genética que las identifican. Y es más, esa similitud también se aprecia en las micorrizas, hongos radicales específicos, con los cuales conviven asociados desde siempre.

Queda entonces, según la visión de apreciar esta realidad de paleontólogos y botánicos un puente de unión, por tenue e imperceptible que parezca, con aquellas orquídeas terrestres, en esas, ahora distanciadas islas de la Oceanía.

Este breve paréntesis filogenético, explica en parte porque la gran mayoría de nuestras orquídeas silvestres son endémicas. Esto quiere decir, que crecen únicamente en esta parte del planeta. Algunas con una restringida área de distribución lo que las hace más vulnerables. Pese a su belleza, fragancia y exclusividad, su presencia, para la gran mayoría de nuestros connacionales, así como también de cultivadores y coleccionistas de estas flores, de otras partes del mundo, ha pasado casi inadvertida.

Lo más penoso aún, hay una creciente merma poblacional de este valioso e insustituible patrimonio genético nuestro.

Chile ha suscrito una serie de convenios internacionales que se preocupan de conservar y evitar su disminución, al incluirlas en los registros o apéndices de plantas amenazadas.

Tal vez uno de las causantes de mayor incidencia y que tiene por lo demás ribetes internacionales, es la pérdida y destrucción de su hábitat.

Llama la atención que en los lugares que dieron a conocer los botánicos y naturalistas, donde las encontraron y describieron, no hace mucho tiempo, hoy día ya no existen. La tala de los bosques, el aumento de la población humana, introducción de malezas competitivas, y uso y abuso

indiscriminado de agroquímicos, que junto con aniquilarlas, eliminan antes a los agentes polinizadores naturales, lo que impide la perpetuación de la especie. Estas son causales, por mencionar solo algunas, que inciden en su sobrevivencia.

Posiblemente se creyó que las Reservas y Parques Nacionales serían suficientes para cobijar para siempre a estos tesoros botánicos nuestros. Lamentablemente, el Parque Nacional y el Santuario, constituyen tan solo soluciones locales y parciales, pues no todas las orquídeas tienen como hábitat esos lugares.

Sin embargo, a todo este panorama de sobrevivencia oscuro y deprimente, que tiene un verdadero sentido de urgencia, se le está poniendo atajo y revirtiendo la tendencia. Con técnicas sencillas pero eficaces de polinización artificial controlada, así como siembra de semillas en laboratorio y reproducción *in vitro*, en otros países, no solo han rescatado del abismo a estas verdaderas joyas de la biodiversidad, sino que han incrementado las poblaciones, al reimplantarlas donde estaban escaseando peligrosamente.

Con fondos aportado por la Fundación para la Innovación Agraria, más la colaboración de tres universidades chilenas, se han estado estudiando todos los procesos, no solo para conservarlas y protegerlas, en un Proyecto de Domesticación de nuestras orquídeas nativas, sino que también con miras a comercializar sus flores mejoradas genéticamente. Logrado este propósito será posible exportarlas, cumpliendo así con la exigente normativa proteccionista que nuestro país ha suscrito, como genuinas y bellas representantes de nuestra flora autóctona.

14. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

AGRIOS, G. 1996. Fitopatología 2° Edición. Editorial Limusa SA. Mexico. 838 p.

ARDLEY, N, GROMAN, J. y VARLEY H.1982. Guía práctica ilustrada "El jardín en casa". Barcelona. Blume. 256p.

ARDITTI, J. 1982. Orchid biology: reviews and perspectives II. Joseph Arditti. New York. 113p.

BARTRINA, M. 2002. Orquídeas, propagación in vitro, (on line).www, personales. com/espana / tarragona /invitro.htm

BATTY, M. and BRUNDETT, M. 2001. Orchid conservation techniques manual. First International Orchid Conservation Congress-Training Course. Australia. September 2001. sp.

BESNIER, F. 1989. Semillas Biología y tecnología. Madrid. Mundiprensa. 637p.

BORIE; F: 1986. Micorriza: su rol en la ecología y la nutrición vegetal. Vol5 (48):9-13.

CALDERON, X. 2001. Primer informe de avance técnico, proyecto FIA C98-1-022. Universidad de Talca. Talca. 9p.

CARLING, D., POPE, E., BRAINARD, K and CARTER, D. 1999. Characterization of Mycorrhizal Isolates of *Rhizoctonia solani* from an Orchid, Including AG-12, a New Anastomosis Group. Ecology and Population Biology. 89 (10): 942 – 945.

- CHEBUCTO. 2002. English common orchid names HS to latin names, (on line)
<http://77www.chebucto.ns.ca/Recreation/OrchidSNS/bot-a-h.htm>
- CLEMENTS, M y ELLYARD, R. 1979. The symbiotic germination of Australian Terrestrial orchids. American Orchid Society Bulletin. 48(8): p.810-816.
- COPELAND, L y MCDONALD M. 1995. Seed science and technology. Boston. Kluwer academic publishers. 409 p.
- CORREA, M. 1969. Chloraea, género sudamericano de Orchidaceae. Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 499p.
- CUYA, M. 2002. Micropropagación de las semillas de orquídeas, (on line).
www.lamolinaedu.pe/Facultad/Agronomia/horticultura/propagacion/biotecnologia/cuya_resumen.htm
- GIL, F. 1994. Elementos de fisiología vegetal, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 1147p.
- HIKS, A. 1999. Orchid seed germination. The orchid seed bank project. United States of America. 383p.
- LABTAFOR. 2002. Las micorrizas: "hongo-raíz", una simbiosis muy importante, (online).
<http://labpatfor.udl.es/plantnico/micorrizacast.html>
- MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Ediciones Mundiprensa. Madrid. 230p.
- MARTINES y DURAN. 1995. Viabilidad, germinación y vigor: tres conceptos distintos para un mismo lote de semillas. Junta de Andalucía. II Jornada sobre semillas y semilleros hortícola
- MCKENDRICK, S. 2002. Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Copyright, Almería 29,30,31 de mayo de 1995. pp181 - 190 2000, Ceiba Foundation for Tropical conservation. 17p.
- MICORRIZA. 2002. ¿Que es una micorriza?, (on line)
http://www.geocities.com/jango_es/micomiza.htm
- MITCHELL, R.. 1989. Growing hardy orchids from seeds at Kew. Plantsman 11(3): p. 152 – 169.
- ORCHILADY. 2002. The orchid Lady's Orchid Enciclopedia, (on line) http://www.orchidlady.com/dict_c.html
- ORCHIDS. 2002. Chloraea crispa, (online)
<http://www.orchids.org/oc/Genera/Chloraea/crispa/index.shtml>
- QUAY, L., MCCOMB J., y DIXON W. Methods for ex vitro germination of Australian terrestrial orchids. Hortscience. 30(7):p. 1445 - 1446.
- QUIÑONES M. Y MANRIQUE S. 2002. Las orquídeas y las modernas tecnologías de propagación y conservación, (online) www.concytec.gob.pe/investigacion/biotecnologia/orqui.
- RASMUSSEN, H y WHIGHAM, D. 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. American Journal of Botany. 80(12):p. 1374 – 1378.
- RENDICH, A. 2001. Evaluación de crecimiento y floración de orquídeas nativas de la especie Chloraea crispa. Taller de Licenciatura. Ing. Agr. Quillota, Chile, Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 81p.

- REYES, R. 2000. Control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate mediante el empleo de antagonistas bacterianos. Memoria de título Ing. Agr. Santiago, Chile, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 81p.
- RICHARDSON, K., PETERSON, R. Y CURRAH, R. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). Canadian Journal of botany. 70(2):p. 291 -300.
- RIEDEMANN, P y ALDUNATE, G. 2001. Flora nativa de valor ornamental. Editorial Andres Bello. Chile. 566p.
- RIVAS, M., WARNER, J. Y BERMUDEZ, M. 2002. Presencia en orquídeas de un jardín botánico neotropical, (online) <http://www.ots.duke.edu/tropibiojnl/claris/46-2/rivas.htm>
- SUMMER, D., SMITTLE, D., THREADGILL, E., JOHSON, A. Y CHALFANT, R. 1986. Interactions of tillage and soil fertility with root diseases in snap and lima bean in irrigated multiple-crooping systems. Plant Dis. 70:730-735.
- UNIVERSIDAD MICHOACANA. 1996. Orquídeas, (online) www.ccu.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/orquideas/orquideas
- URIBE, E. 2000. Descripción del ciclo fenológico de orquídeas nativas pertenecientes al género *Chloraea* y registro de características de interés agronómico de la especie. Taller de licenciatura. Quillota, Chile. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 65p.
- VAN WAES, J. 1986. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. Physiol. Plant. 66:435-442.
- VASQUEZ, R. 1995. Las orquídeas en Bolivia, (online) www.bolivianet.com/cultura/encuentro/orquideas/
- WARCUP, J. 1980. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. New Phytl. (1981). 87, 371 - 381