

**FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA – FIA
MINISTERIO DE AGRICULTURA**

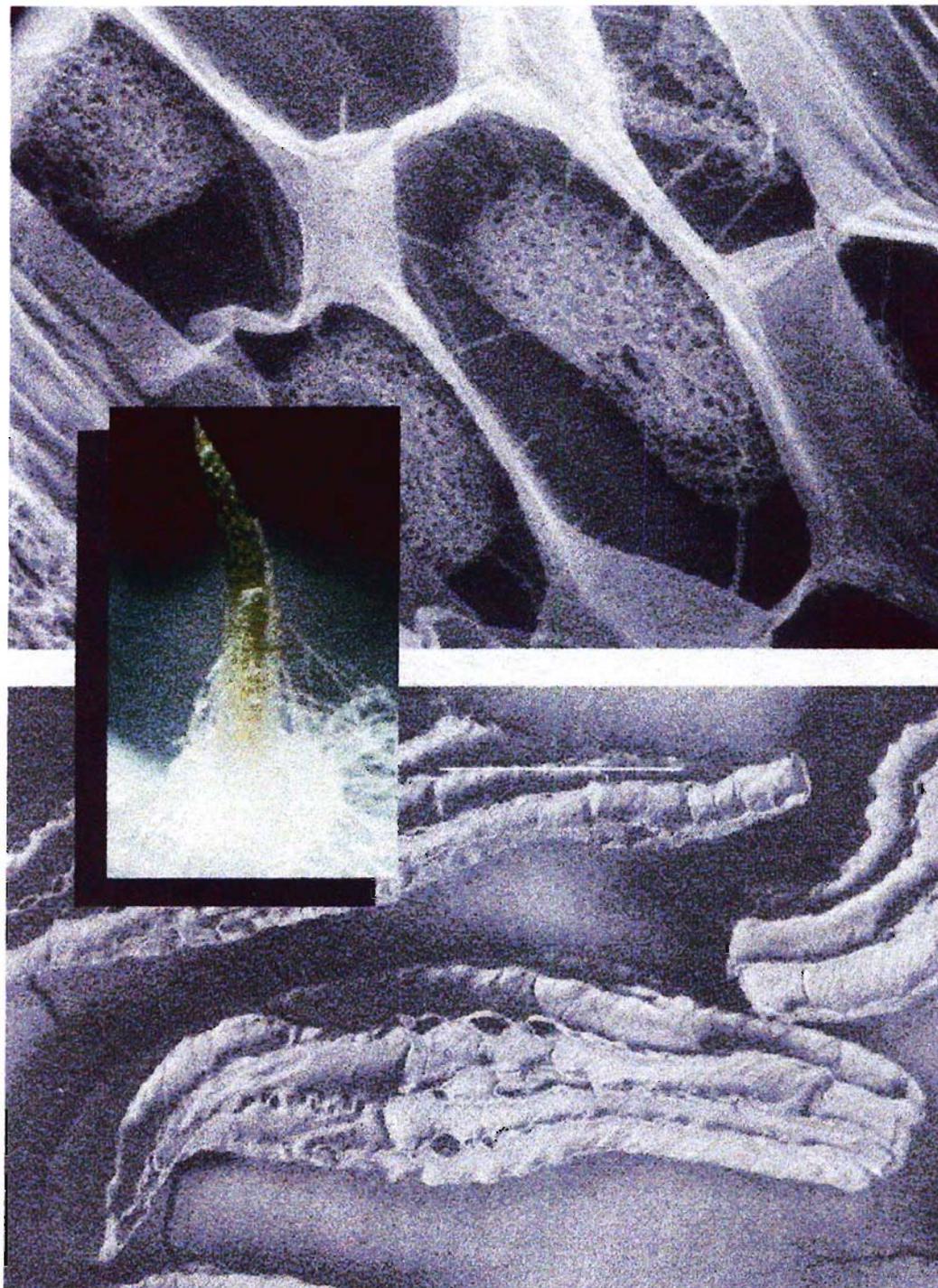
**INFORME TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN
ANTECEDENTES ADICIONALES**

**“CURSO DE TÉCNICAS ESPECIALIZADAS DE CONSERVACIÓN
DE ORQUÍDEAS Y CONGRESO INTERNACIONAL DE
CONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS”**

CODIGO F01-1-BT-082

Fecha de presentación: 25 de Marzo de 2002.

MANUAL DE TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS



**Curso Práctico – 1^{er} Congreso Internacional de
Conservación de Orquídeas. Perth, Australia.
Septiembre, 2001**

MANUAL DE TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS

PLANT SCIENCE, KINGS PARK & BOTANIC GARDEN.

Recopilado por Andrew Batty y Mark Brundett.

*Traducido por Ximena Alvarez G, Ximena Calderón B., Mauricio Cisternas B.
y Enrique Matthei J.*

Colaboradores:

Mark Brundett
K. Sivasithamparam
Margaret Ramsay
Siegy Krauss
Robyn Taylor
Aaron Hicks
Nura Abdul Karim
Nika Debeljak
Sofi Mursidawati
Bob Dixon
Colin Bower
Andrew Brown

Fotografías en cubierta. Arriba: ESEM de pelotón visible en LS de raíz de *Prassophylum fimbriata*. Abajo: Imagen de semilla de *Caladenia arenicola* en microscopio SEM. Al centro: Plántula simbiótica de *Thelymitra maginii*.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I. INTRODUCCION	3
CAPÍTULO 2. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS.....	10
CAPÍTULO 3. TÉCNICAS GENÉTICAS PARA LA CONSERVACION DE ORQUÍDEAS.	11
CAPÍTULO 4. TÉCNICA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEA	18
CAPÍTULO 5. AISLAMIENTO DE HONGOS DE ORQUÍDEAS.....	29
CAPÍTULO 6. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEA Y HONGOS	31
CAPÍTULO 7. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.	34
CAPÍTULO 8. PROPAGACIÓN.	48
CAPÍTULO 9. CRECIMIENTO DE ORQUÍDEAS.	51
CAPÍTULO 10. CAPTURANDO HONGOS MICORRÍTICOS EN EL SUELO.....	58
ANEXO 1. REFERENCIAS DE GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS.	62
ANEXO 2. CONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS (IUCN).	63
ANEXO 3. PRESENTACIONES EN CHARLA DE DIFUSIÓN.	71

Agradecimientos: Se han utilizado partes del libro de Brundett M., Bougher N., Dell B., Grove T., Malajczuk. 1996. *Working with mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Pirie Printers, Canberra.

CAPÍTULO I. INTRODUCCION

(Traducido por Enrique Matthei Jensen).

Las Orquídeas se encuentran en todos los continentes de la tierra a excepción de la Antártica. La mayor diversidad de las orquídeas se encuentra en los trópicos con un gran número de especies epífitas. La típica abundancia y diversidad de las orquídeas disminuye al aumentar la distancia que la separa del ecuador terrestre, así también al tornarse más templadas las condiciones climáticas, las orquídeas terrestres son las que empiezan a dominar. (Jones 1993).

Al aumentar la diferenciación en las condiciones climáticas alejándose de los trópicos, con variaciones estacionales de precipitaciones y temperatura, los ciclos de vida varían. Así por ejemplo, la mayoría de las orquídeas terrestres del suroeste de Australia Occidental su período de crecimiento se restringe a los meses de mayo a noviembre y se ven forzadas a sobrevivir la sequedad del período estival entrando a un estado de dormancia o latencia.

Diversidad de las Orquídeas.

Las orquídeas son consideradas como el mayor grupo de plantas sobre la tierra, con 20.000 a 35.000 especies agrupadas en más de 750 géneros (Jones 1993). El hecho que abarcan alrededor del 10 % de las plantas vasculares que florecen indica la gran capacidad de adaptación en un amplio y variado ángulo de hábitat. (Jones 1993).

Una de las razones que explican el alto grado de diversidad de las Orchidaceae puede ser atribuida a los agentes polinizadores (Darwin 1862; Benzing 1987; y Dressler 1981) La gran cantidad de diminutas semillas que contribuyen a su variabilidad genética y su alto grado de dispersión que alcanzan, atravesando barreras ecológicas y geográficas, con ciclos de vida relativamente rápidos, gran plasticidad tanto en la fragancia como en la arquitectura floral y preadaptación al epifitismo, contribuyen a la gran diversidad encontrada en las orquídeas (Gentry and Dodson, 1987; Burns-Balogh and Bernhardt, 1988).

Las flores de las orquídeas están entre las más evolucionadas, tienen gran diversidad en colores y fragancias (Kaiser 1993; Senghas 1993) así como también rangos en tamaños vegetales, que van desde plantas microscópicas como *Platystele and Bulbophyllum* a largas vainillas, hasta llegar a plantas gigantes como la *Grammatophyllum* y *Cirtopodium*.

Biología de las Orquídeas.

Las orquídeas carecen de un sistema radicular primario y en su reemplazo tiene raíces adventicias que emergen del tallo. Las raíces de las epífitas pueden durar un par de años y crecen profusamente. Las raíces aéreas son a veces fotosintéticas, cilíndricas, en contacto con el aire o lisas cuando se adhieren a un sustrato. Una característica distintiva de las orquídeas epífitas es su velamen, que está hecho de células de paredes gruesas que forman una funda alrededor de la raíz, capaz de absorber agua y nutrientes. Sin embargo, las raíces o rizomas de las orquídeas terrestres, son más bien carnosas, pocas en número y adaptadas para crecer sólo en una temporada, alrededor de seis meses. Algunas orquídeas terrestres, como las pertenecientes al género *Caladenia* y *Pterostylis* tienen raíces muy reducidas o casi ausentes (Ramsay et al. 1986). Las raíces de muchas orquídeas terrestres son órganos carnosos conocidas como rizomas, almacenan alimentos y permanecen durante condiciones adversas, (Dixon, 1991). El rizoma contiene un brote apical que al elongarse forma un nuevo tallo que también genera nuevas raíces. Algunas especies de orquídeas terrestres producen más de un rizoma de reemplazo cada año, formando verdaderas colonias (reproducción asexual) sin embargo, generalmente es sólo un rizoma de reemplazo el que alcanza un desarrollo normal produciendo semillas (reproducción

sexual). Los tallos portaflores pueden ser muy variados, a veces restringidos o largos e hinchados. Los tallos de las orquídeas terrestres son carnosos y suculentos (Hoffman y Brown 1992; Jones 1993).

Las semillas de las orquídeas son diminutas y carecen generalmente de componentes estructurales que se encuentran en otras semillas de angiospermas. Generalmente las semillas miden 2 milímetros de largo por 1 de ancho (Arditti 1992; Arditti y Ghani 2000). La diferencia más significativa está en la ausencia de células diferenciadas y la falta de reservas nutricionales, como el endospermo. Hay una pequeña cantidad de lípidos almacenados en su interior, la envoltura de las semillas de las orquídeas es una cubierta lipolítica (Arditti 1979).

Las semillas de las orquídeas maduras poseen un embrión simple formado por células parenquimáticas, que contienen cuerpos proteicos y lipídicos (Manning and van Staden 1987; Rasmussen 1990; Richardson et al., 1992). Para mayores detalles de las estructuras de las semillas consúltese la recopilación de Peterson et al. (1998). Una característica distintiva de las semillas de las orquídeas es la ausencia de un tallo meristemático apical diferenciado o meristema apical radicular, una vez maduro (Veyre 1974).

Micorrizas.

Las micorrizas (hongos radiculares) son una asociación simbiótica entre hongos específicos del suelo y las plantas comprometidas en una transferencia de nutrientes (Brundrett (2001) para una definición más completa). Las orquídeas poseen una asociación micorrítica, que es morfológicamente diferente a otros tipos de micorrizas que involucra fisiológicamente a distintos tipos de hongos terrestres. (Hadley 1982; Rasmussen 1995; Currah et. Al. 1997; Smith y Read 1997).

A principio del 1900, los investigadores tuvieron éxito en la germinación in vitro observando los procesos de infestación de embriones y semillas (Bernard 1903; Burgeff 1909). Las opiniones diferían en cuanto a la relación entre las orquídeas y las micorrizas basándose en las estructuras observadas. Las micorrizas de las orquídeas se caracterizan por la presencia de densas espirales en las células corticales en la raíz, vara y protocormos (Harley y Smith 19983; Masuhara y Katsuya 1994). Investigaciones histológicas recientes han reconocido dos tipos de micorrizas en las orquídeas (i) tolypophagy, que se encuentra en la mayoría de las especies y (ii) ptyophagy, encontradas en un reducido número de especies microscópicas (i.e. *Gastrodia*). Esta fitofágea se interpreta como una deformación o lisis (llamada también digestión) de las puntas de las hifas intracelulares, donde el contenido de las células fúngicas es liberado (Burgeff 1959) pero esto necesita ser confirmado, con investigaciones más acuciosas, utilizando el microscópico electrónico. En la mayoría de estas asociaciones el endófito forma nítidos rollos, llamados pelotones, en células infectadas antes que tenga lugar la mencionada lisis o digestión. Sucesivas olas de formación de pelotones de digestión y reinfección han sido informadas (Burgeff 1959; Smith y Read 1997). La transferencia de metabolitos a través de hongos hospedantes, más en interfase que en digestión, se considera ahora como un modo primario de transferencia de nutrientes en todo tipo de micorrizas, pero los flujos no han sido medidos en orquídeas (Smith y Read 1997). Este proceso se considera como un mecanismo general defensivo en respuesta a la invasión del hongo y se considera como una regulación de los procesos metabólicos en asociación con la planta (Brundrett 2001).

Hay una variación considerable en la distribución de las micorrizas, ya sea en el tallo o rizoma de la orquídea. La colonización de las micorrizas ha sido estudiada como esporádica en la mayoría de las epífitas, pero en general, más diseminadas y consistentes en las orquídeas terrestres (Burgeff 1959; Rasmussen 1995). Diferentes géneros de orquídeas terrestres pueden tener patrones de colonización distintos en sus raíces y tallos (Ramsay et al. 1996). Estos patrones de infección micorrítica en toda la planta (raíz, corola, tallo, rizoma, etc.) puede estar asociado a tipos de

hongos específicos (Ramsay et al. 1986). Los patrones de colonización de hongos micorrícicos en las plantas están determinados primariamente por las propiedades de las células hospederas, pero los rasgos morfológicos pueden estar correlacionados por la presencia de ciertos hongos. (Brundrett 2001).

Hongos de las Orquídeas.

Identidad y especificación.

Los hongos conocidos que forman micorrizas en las orquídeas, son los Basidiomycetes y la mayoría pertenece al género *Rhizoctonia* (Sneh et al. 1991; Currah et al. 1997). Estas son reconocidas por el rasgo general del micelio en cultivo, la presencia en la mayoría de las aisladas, de pequeños segmentos abultados que asemejan a esporas y la formación de agregados separados de hifas semejanado un poco a una esclerótica poco desarrollada. (Hadley 1982). Aisladas a veces, forman estados sexuales en cultivo, (un procedimiento difícil de repetir), Pertenecen al género basidiomiceto *Ceratobasidium*, *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Sebacina*, *Thanatephorus* y *Tulasnella* (Warcup and Talbot 1967; 1971; Currah et al. 1997). Diversas combinaciones de hongos pertenecientes a otros grupos también han sido alistados, pero muchos de ellos no son beneficiosos. (Currah et al. 1997).

La interrogante de la especificidad en las Orchidaceae ha sido un punto de discusión por muchos años. Knudson, pensaba que existían bajos niveles de especificidad en las epífitas tropicales. Contrariamente Burgeff (1909; 1959) que trabajó con muchas orquídeas terrestres, concluyó que existía una especificidad muy fuerte en las asociaciones entre orquídeas y hongos. Burgeff (1909) distinguió siete categorías en la relación hongo/semilla, variando, entre totalmente incompatible, hasta plena compatibilidad. Lo que ha probado ser adecuado para describir el rango completo de interacción. Evidencias adicionales confirmadas hoy en día, afirman que estas hipótesis son correctas. (Arditti 1992)... Cultivos y tests de simbiosis han demostrado que existen varias razas con variaciones fisiológicas y morfológicas con respecto al espectro de cada especie o grupo similar. Por ejemplo Harvais y Hadley (1967), aislaron 244 especies de *Rhizoctonia*, desde *Dactylorhiza purpurella* y otras orquídeas del norte de Inglaterra. Estas pertenecían a 15 grupos mayoritarios, pero la mayoría de los grupos fue difícil su obtención en más de un hábitat, con la excepción de *R. Perens* que estaba más diseminada. Curtis (1939) argumentó que la distribución ecológica del hongo está relacionado más con el hábitat circundante que con el hospedero. Hadley (1967) demostró también que la *Dactylorhiza purpurella* era simbiótica con casi todas las aisladas. Sin embargo, hay otras orquídeas como las del *Goodyera repens*, que generalmente está infectada por un solo hongo (*Ceratobasidium cornigerum*) en su estado adulto (Hadley 1982). Estas observaciones pueden explicar el porqué la *G. repens* se encuentra en áreas más restringidas que la *D. purpurella*. Muchas otras orquídeas que han sido estudiadas parecen tener asociaciones muy específicas con los hongos y en menor grado con el hábitat (eg. Warcup 1981; Ramsay et al. 1987; Currah et al. 1997; Sen et al. 1999).

Smreciu (1989) demostró que semillas de *Platanthera hyperborea* germinadas y protocormos, se desarrollaban tanto en un medio asimbiótico como en un medio Warcup's, con muchos hongos endófitos. Richardson (1992) encontró que la orquídea terrestre *P. hyperborea* germinaba tanto con *Rhizoctonia cerealis* o *Ceratorhiza goodyerae-repentis* y sugirió, basado en evidencias de (Smreciu 1989) y Masuhara y Katsuya (1989) que las orquídeas del género *Platanthera*, puede que no sean tan específicas a los hongos endófitos. Muchos tipos de hongos han demostrado tener una relación específica asociados a los géneros de las orquídeas de Australia Occidental (Ramsay et al. 1986; 1987). Por ejemplo, en cultivos estériles en agar dextrosa de papa, todas las especies *Caladenia* examinadas, utilizaban un hongo mucoso, cremoso, de crecimiento lento, mientras que la *Pterostylis*, requería un hongo de crecimiento rápido, veloso, espacios endófitos blancos, para germinación de semillas *in vitro* y posterior crecimiento y desarrollo.

La especificidad de muchos hongos estudiados, se ha basado en tests de germinación bajo condiciones estériles, presumiéndose que algunos hongos se van a asociar con plantas adultas (eg. Warcup 1980; Ramsay et al, 1986). Sin embargo, estos estudios concluyen de la importancia de la asociación micorrítica en la germinación, pero no son necesariamente tan importantes en la sobrevivencia de la planta. Semillas de algunas orquídeas no van a germinar con micorrizas de plantas adultas (Masuhara et al. 1993; Zelmer et al. 1997). Se ha descrito que la especificidad del hongo hospedante, es generalmente menor al tiempo de germinación, que durante el desarrollo de la siembra in vitro (Muir 1989). Esto decrece nuevamente en cuanto la planta alcanza la fase fototrópica, cuando muchos hongos distantes pueden encontrarse como endófitos. (Warcup 1981; Alexander y Hadley 1983). Sin embargo, esta asociación de la germinación de las semillas no perdura para toda la vida, pero también hay muchos ejemplos donde hongos aislados de plantas adultas, promueven una generación exitosa (Arditti (1992) por ejemplo). El establecimiento de plantitas sanas con hojas y no solamente la ruptura de la cutícula, debe considerarse como criterio para evaluar la compatibilidad del hongo hospedero (Peterson et al. 1998).

Por ejemplo, Warcup (1971; 1973) probó combinaciones factoriales en los hongos de germinación para examinar el grado de especificidad de algunas orquídeas terrestres aisladas. Encontró que la *Diuris spp.* contenía solamente *Tulasnella calospora (Rhizoctonia repens)* mientras que la *Caladenia spp.* estaba asociada con *Sebacina vermifera*. Había también un alto grado de especificidad fungosa entre la *Diuris* y *Pterostylis*. Ramsay et. Al. (1987) usando grupos de hifas de anastomosis para categorizar asociaciones fúngicas con el género *Pterostylis* y demostrar que la distribución de los tipos estaban enlazados al tipo de hábitat específico. Por ejemplo, el grupo de anastomosis (AG) 8 sólo ha sido reportado en hábitat calurosos y áridos y el (AG3 en sitios semiáridos expuestos a hábitats rocosos) el AG4 solamente está asociado con *Pterostylis*, que crece sólo en plantaciones de pinos introducidas. Contrariamente los grupos de hongos vicarios, como el AG2, fueron aislados del grupo *Pterostylis* en una variada gama de hábitats. Especies afines al *Pterostylis* han sido encontradas usando diferentes AG's.

Las orquídeas pueden vivir en simbiosis con diferentes tipos de asociaciones micorríticas, pero la importancia relativa de estas co-asociaciones todavía se desconoce. Esta doble asociación puede minimizar la competencia para una fuente mixta de recursos, si diferentes tipos de hongos acceden a diferentes tipos de recursos del suelo. En general, la diversidad de la asociación fúngica de las orquídeas con una orquídea en particular parece ser mucho menor que para otros tipos de hongos micorríticos. La mayor inferencia del alto grado de especificidad entre el hongo y el hospedero y la baja diversidad fúngica en las orquídeas, se debe a la restricción de las orquídeas a ciertos hábitats donde ocurre especificidad fúngica.

Distribución de sustratos.

La distribución especial de los hongos en las orquídeas es desconocida en gran medida. El sustrato orgánico, que es el último recurso en la nutrición fúngica, está distribuido desuniformemente en el suelo y las poblaciones de otros hongos micorríticos ocurren en discretos bolsones de suelo (eg. Brundrett y Abbott 1995). Por eso es razonable presumir que la inoculación de los hongos con las orquídeas es algo desigual. La competencia entre orquídeas hermanas para alcanzar micelios, sucede en cultivos in vitro (Alexander y Hadley 1983; Rasmussen et al. 1989; Tsutsui y Tomita 1989). Algunas especies de orquídeas tienden a crecer asociadas mientras otras lo hacen más diseminadas; sin embargo, esto depende en gran medida de una tendencia diferencial a producir competencia intraespecífica, entre las poblaciones que pueden influenciar también los patrones de distanciamiento...

Al comprender la distribución de los hongos micorríticos en el suelo u otros sustratos, es importante para retornar orquídeas al campo y comprender su distribución. La mala distribución de las orquídeas tal vez esté influenciada por la presencia o ausencia de hongos micorríticos específicos, que son esenciales para su sobrevivencia. Una técnica de siembra enterrada en el suelo,

preconizada por Rasmussen y Whigham (1993) permite la distribución efectiva de orquídeas endófitas para asentarlas *in situ* en su hábitat natural.

Los primeros trabajos hechos por Curtis (1939) y Harvais y Hadley (1967), sugieren que la asociación fúngica de las orquídeas puede estar más diseminada en el suelo que en los hospederos. Se han aislado en lugares donde no existían orquídeas (Warcup y Talbot 1967). *Ceratobasidium cornigerum* y *Tulasnella calospora* parecen tener una distribución universal, lo que ocurre también con otras especies. Perkins et al. (1995) observó que diferentes distribuciones de hongos micorrícicos ocurrían en las raíces de *Microtis parviflora*, a través de tres sitios indicando que otros factores, así como también la especificidad de los hospederos eran importantes en determinar cual hongo era micorrítico con *M parviflora* en cualquier sitio particular. Factores ambientales pueden variar considerablemente entre cada sitio. Igualmente la densidad de cada hongo en el suelo puede variar temporalmente así como su espaciamento. (Perkins y McGee 1995). Los estudios *in situ* de las micorrizas de las orquídeas se describen más adelante en el capítulo 4.

Dependencia micorrítica y nutrición.

Knudson's (1992) fue el primero en demostrar con sus experimentos que las semillas no tienen un requerimiento absoluto por las micorrizas, al poder captar nutrientes directamente si se encuentran a su alcance. Sin embargo, existen numerosas demostraciones de los beneficios que proveen a las orquídeas las micorrizas, estableciéndose que la mayoría de las orquídeas terrestres tienen un requerimiento obligado con ellas en hábitat naturales. (Arditti 1992; Rasmussen 1995; Peterson et al. 1998). Otras evidencias han sido detectadas al observar la asimilación de compuestos fosforados, utilizando isótopos radioactivos (Smith 1966; 1997; Alexander et al. 1984; Alexander and Hadley 1985).

Mayores evidencias de la efectividad de las micorrizas en las orquídeas, se comprueba por la existencia de muchas especies que sobreviven en suelos extremadamente pobres, con escaso acceso a minerales o con pH extremos, muy altos o muy bajos, con pérdidas de horizontes y contenido de humos (eg. Sheviak 1974).

La situación de las orquídeas epífitas es menos clara, ya que sus protocormos llegan a ser fotosintéticos en un estado temprano y las plantas adultas tienen una colonización fúngica limitada y esporádica, lo que puede indicar una dependencia micorrítica decreciente (Rasmussen 1995). Un estudio reciente en la germinación de semillas epífitas ha demostrado que los hongos micorrícicos pueden llegar con la absorción de agua (Yoder et al. 2000).

Las micorrizas de las orquídeas difieren de las típicas asociaciones ECM o VAM, ya que los hongos de las orquídeas pueden proveer una fuente de energía, así como también nutrientes minerales a sus plantas hospederas (Rasmussen 1995). Estos compuestos carbonados, presumiblemente derivan del quiebre de sustancias orgánicas en los sustratos circundantes. La transferencia ^{14}C de los hongos de las orquídeas hacia la planta hospedera, ha sido demostrado (Alexander y Hadley 1985), pero la última fuente de este carbono no ha sido determinada. El carbono radioactivo ha sido rastreado de los hongos a la semilla, pero no de la semilla a los hongos. La planta tal vez supla vitaminas o aminoácidos esenciales a los hongos en ciertos casos (Leake 1994). Sin embargo, no hay ninguna evidencia real que los hongos reciban beneficios sustanciales de las asociaciones con las orquídeas y a menudo crecen sin ninguna presencia de orquídeas.

Las asociaciones micorríticas donde los hongos parecen no recibir ningún beneficio de la planta se llaman epiparásitas, micro-heterotróficas, asociaciones engañosas, o asociaciones explotativas (Leake 1994; Taylor y Bruns 1999; Brundrett 2001). Este es el reverso en la mayoría de las relaciones entre plantas superiores y hongos. En este enunciado estas asociaciones se catalogan como asociaciones explotativas de las micorrizas, reflejando la naturaleza de esta relación desde

el punto de vista de los hongos. Entre las Orchidaceae se encuentran especies con diferentes grados de dependencia con las micorrizas, abarcando desde las autotróficas plenas, presumiblemente con asociaciones micorríticas mutualistas, hasta las heterotróficas totales, con asociaciones engañosas. Sin embargo, la naturaleza de esas asociaciones micorríticas en muchas de estas plantas, no han sido investigadas y su dependencia nutricional del hongo ha sido presumido, al faltar otras explicaciones.

Poco se sabe al respecto de otros roles ecológicos de los hongos asociados a las orquídeas verdes, y alguno de estos hongos tienen un impacto adverso sobre otras plantas. Por ejemplo, las orquídeas epífitas a veces parecen tener determinados efectos sobre los árboles (Ruinen 1953; Johansson 1977), pero esto puede ser el resultado de la correlación entre la abundancia de epífitas y la declinación del árbol, más que otros factores. Hay algunos casos en que las *Rhizoctonia* aisladas de las orquídeas han sido identificadas como patógenas en las raíces de otras plantas (Warcup 1985; Zelmer et al, 1996) sin embargo, la mayoría de las orquídeas tienen una acentuada asociación específica con *Rhizoctonia*, que no se ha sabido que sean patógenas para otras plantas (Warcup 1981; Ramsay et al. 1987; Muir 1989; Currah et al. 1997; Sen et al. 1999). Actualmente la información es insuficiente para poder afirmar con seguridad si las orquídeas autotróficas normalmente están asociadas con hongos del suelo inespecíficos u hongos micorríticos específicos. Este conocimiento es esencial para nosotros para desarrollar un conocimiento de la biología y ecología de estas hermosas y fascinantes plantas.

Germinación de semillas de orquídeas.

Esta sección focalizada en las orquídeas terrestres, así como epífitas típicas se propagan por medios asimbióticos. Tal como se ha venido discutiendo, hay una estricta evidencia del rol vital que los medios asimbióticos en las orquídeas. Esto contrasta con las orquídeas epífitas donde los hongos micorríticos tienen una menor importancia después de la germinación de la semilla.

Las diminutas semillas de las orquídeas tienen muy pocas reservas nutricionales almacenadas para su germinación (Arditti y Ghani 2000). Estas reservas limitadas y la germinación subterránea en la mayoría de las especies terrestres, hacen pensar que en general los hongos micorríticos son normalmente esenciales en la germinación de las semillas. Estudios comparativos en la efectividad de las asociaciones simbióticas y asimbióticas en la germinación, ha demostrado convincentemente que la germinación simbiótica ha sido más rápida y efectiva que la germinación asimbiótica (ver Person et al. 1998). En algunas orquídeas terrestres una germinación exitosa era sólo posible con una asociación simbiótica (Hadley 1982). Muir (1989) abarcando un gran rango de hongos aislados por su capacidad para promover la germinación de las especies europeas de orquídeas. *Ophrys*, *Dactylorhiza* y *Serapias*. Encontró que algunas especies eran compatibles con algunos hongos aislados de un mismo género. En algunos casos hongos diferentes eran responsables del crecimiento de plantas maduras más que en la germinación de semillas. Hay poca información disponible de la germinación *in situ* de la semilla de orquídea (Masuhara y Katsuya 1994; Zelmer y Currah 1997; Rasmussen y Whigham 1993; Currah et al. 1997).

Conservación de orquídeas.

La fenomenal diversidad de las orquídeas y varios procesos amenazantes han derivado en que muchas especies de orquídeas se encuentren en vías de extinción.

Cuadro 1.1. Pautas de conservación de orquídea de rango universal (IUCN 1996).

Amenaza	Causa
Destrucción de hábitat, modificación y fragmentación	Tala de bosques Agricultura y plantaciones Hábitat alterados Desarrollo urbano Minería
Recolección de hábitat natural	Explotación agrícola
	Coleccionistas amateur
	Orquídeas comestibles

La alteración o destrucción de un hábitat pone en riesgo a cada especie en diferentes grados de acuerdo a su distribución geográfica, hábitat específico y grado de contaminación. La rareza de una especie puede determinarse basándose en este criterio (Rabinowitz et al. 1986). Las especies raras de orquídeas están intrínsecamente más expuestas a la extinción que aquellas más comunes al sobrevivir catástrofes naturales (incendios, inundaciones o severas e inusuales variaciones climáticas).

Al comprender mejor la biología de las especies nos ayudará a ser más eficientes en nuestros esfuerzos conservacionistas. Muchas de las especies amenazadas en Australia Occidental requieren de una asistencia inmediata si queremos preservarlas. El trasplante de especies al campo para completar poblaciones es una alternativa válida para los dueños del suelo. (ANPC, 1997). Estudios cuidadosos de la historia de la vida de las plantas, proporciona una información invaluable para el futuro manejo poblacional de la flora amenazada en Australia Occidental.

Las orquídeas están bien estudiadas desde el punto de vista taxonómico, pero se sabe relativamente poco acerca de su biología e importantes métodos de manejo para trasplantarlas. Distinto a otras plantas, las orquídeas también son únicas en su especificidad de los agentes polinizantes. Requieren de una tecnología sofisticada para propagarlas en gran escala. Estos métodos incluyen (i) Colección de semillas y hongos simbiotes que sean efectivos en la germinación (ii) Desarrollo de métodos efectivos de propagación para las especies amenazadas (iii) Trasplante de orquídeas a sitios seguros.

Las asociaciones simbióticas se consideran esenciales en el género Orchidaceae. Sin embargo, tenemos conocimientos limitados de la ecología de las orquídeas, su asociación simbiótica y la interrelación entre ellos. La mayoría de los conocimientos actuales de los hongos de las orquídeas y su interrelación con la planta hospedera, se basan en estudios *in vitro* usando hongos aislados de plantas maduras. Sin embargo, en los últimos años investigaciones han demostrado la habilidad de revelar algunos misterios de las micorrizas de las orquídeas bajo condiciones K.

Todavía existe una gran cantidad de investigación que será necesario llevar a cabo en el mundo para revelar los secretos restantes de la biología de las orquídeas y la biología de los hongos asociados.

Técnicas presentadas en este manual, serán utilizadas para empezar este curso.

CAPÍTULO 2. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS

(Traducido por Enrique Matthei Jensen).

Hay un gran número de sustratos rutinarios usados en la propagación de orquídeas por sustratos de protocolos asimbióticos. Una lista exhaustiva es presentada por Rasmussen (1995) y Hicks (2000). Los sustratos comunes para tratar con la germinación simbiótica de las orquídeas terrestres en Australia se detallan a continuación. Estos son los principales sustratos usados en este trabajo.

Asimbiótico.

Anotaciones en la formulación de sustrato. Hay algunas fórmulas de sustratos que se pueden conseguir en el comercio. Todos son (o deberían ser) el producto de una experimentación para obtener rendimientos óptimos. Algunas fórmulas son conocidas y otras están patentadas y no publicadas. Este es un sustrato madre se usa para la germinación de semillas, y un sustrato de trasplante que se usa para hacer crecer los protocormos hasta un tamaño donde puedan ser trasplantadas exitosamente.

Un sustrato utilizado preferentemente es el P-6668 vendido por la Sigma-Aldrich Chemical Company, también se vende como P668 (Phyto Tech Labs). Es barato, confiable, de fácil alcance y su fórmula está publicada. Una desventaja primaria es que es muy fuerte para muchas especies y debe ser empleado diluido. Es muy flexible y puede ser utilizado combinándolo con plátano. Una fórmula comercial es el P-1056 (Sigma-Aldrich) es P.668 más 30 grs. de una mezcla de polvo de plátano al 50 % con malto dextrina. Es fácil de comprar el P-6668/P y agregarle 50 grs. de alimento para bebés de pulpa de plátano para hacer un medio conveniente de trasplante. Si se usa plátanos crudos, las frutas deben ser lo más madura posible. Debe estar congelada para obtener un puré antes de deshacerlo.

De la misma manera el P6668/P668 puede ser usado para reemplazar el sustrato madre agregando pulpa de plátano y otros "aditivos complejos" puede ser usado de la misma manera. Este sustrato puede demandar la adición de plátanos, piña, leche de coco, todos los cuales contienen altos niveles de azúcar reducida entre otras cosas. Esto contrasta con el sustrato madre que contiene sólo sacarosa, un disacárido (que probablemente se desdobra convirtiéndose en glucosa y fructosa durante el proceso de autoclave en una solución ácida mediana. La fructosa se encuentra virtualmente pura en la miel.

Para algunas especies terrestres que toleran el frío, aditivos especiales como sabia de abedul, cubos de papas y otros componentes complejos han sido mostrados para beneficiar la germinación o desarrollo de plantas de semillas. Es importante mantener bajo estricta observación el desarrollo de cultivo. Si los protocormos de la placa madre se tornan verdes o de otro color deben ser trasladados lo más rápido posible a un medio fresco de trasplante antes mueran. Además si los trasplantes de protocormos o plantitas de semillas no están prosperando bien en un medio determinado, no tarde en removerlos a un nuevo medio para ver si mejora su crecimiento.

Esta información ha sido proporcionada por la Orchid Seedbank Project, Chandler, Arizona, USA y puede ser reproducida sin problemas sin alterar su fórmula.

CAPÍTULO 3. TÉCNICAS GENÉTICAS PARA LA CONSERVACION DE ORQUÍDEAS.

(Traducido por Enrique Matthei Jensen).

Actualmente, existe un desconcertante número de técnicas disponibles para el análisis de variación de las poblaciones a nivel individual. Estas notas entregan una breve introducción para algunas de éstas. Un listado de referencias con información más detallada se adjunta. La atención preferencial se da al PCR multi-locus DNA finger print (huella digital) AFLP que es una técnica preferencial usada en el Kings Park para resultados prácticos en conservación, restauración y cultivo de plantas nativas. Algunos de los marcadores empleados incluyen Allozymes, RFLP, RAPDs, DAF, AFLP, SCAHs, SAMPL, microsatélites (SSRs), Minisatélites como también secuenciadores de DNA.

Este arsenal de marcadores puede ser reducido a algunas categorías principales:

Marcadores codominantes – los dos alelos en un organismo diploides es visualizado por un sistema de marcador genético tal como se detectan los genotipos homo y heterocigotos. Los ejemplos incluyen allozymes RFLPs y microsatélites. A nivel de fenotipos, el gen producido por ambos alelos es detectado, produciendo dos bandas en el gen en un locus (sitio) dado.

Marcadores dominantes. Sólo un alelo en un organismo diploide es visualizado por un sistema genético de marcadores, tan sólo dos genotipos son detectados, cualquiera de los dos ya sea, presencia de banda o su ausencia. A nivel de fenotipos el gen producto de un solo alelo (ya sea en forma homocigoto u heterocigoto). Los ejemplos incluyen RAPDs and AFLP.

De esto se puede hacer una distinción entre las técnicas basadas entre el PCR y no PCR. Las técnicas no-PCR incluyen a los allozymes y los RFLP. Las PCR incluyen RAPD, AFLP y microsatélites.

PCR (reacción de polímeros en cadena)

Utiliza la mezcla de la enzima polimerasa del DNA con una reacción compleja haciendo millones de copia de DNA de una sola copia, permitiendo la visualización del gel electroforético. Comprende 4 pasos:

1. **Desnaturalizar.** La mezcla de reacción se calienta hasta 94° C para separar las dobles estrías de DNA transplantándolas a moléculas de estrías simples.
2. **Recogimiento.** Temperaturas menores de 40-70° C que permiten a las moléculas cortas de DNA llamadas "primers" o primarias (8 a 20 pares bases de largo) para reconocer "sus estrías complementarias".
3. **Extensión.** Al aumentar la temperatura hasta 72 ° C para permitir el acoplamiento de estrías simples de DNA comenzando en el primer complejo templado. La polimerasa del DNA es el catalizador para esta extensión.
4. **Repite los pasos 1-3 de 20 a 50 ciclos** para amplificar las regiones del DNA flanqueadas exponencialmente por los primers.

El uso de estabilizadores de temperatura en la polimerasa del DNA que sobrevive la larga exposición de altas temperaturas requeridas por el PCR, y el desarrollo de termociclos capaz de ciclar las temperaturas rápidamente y con precisión, han facilitado la automatización de este proceso y revolucionando el análisis de variación genética a nivel de poblaciones.

Las principales técnicas genéticas para conservación incluyen:

Allozymes. Son formas alternadas de enzimas codificadas por diferentes alelos en el mismo locus (sitio). Estas allozymes se preparan homogeneizando tejidos para producir una solución proteica por la electroforesis, a través de un gel (almidón o acetato de celulosa). Productos enzimáticos específicos son visualizados por el uso de una tinción facilitando la reacción enzimática. Por ejemplo, el alcohol de dehidrogenasa es transformado en aldehído, que se combina con un tinte para visualizar las bandas. Los alelos de diferentes tamaños tienen diferente movilidad.

RFLP son (restricción, fragmentada, largo, polimorfismo) El polimorfismo en sitios específicos en la secuencia del DNA revelado por cortes del DNA con enzimas restringidas, electroforesis, haciendo pasar este producto por una membrana que es después probada con DNA radioactiva, permitiendo visualizar bandas de distintos tamaños.

RAPDs (Ampliación aleatoria, polimorfismo DNA). El polimorfismo obtenido por ampliación de fragmentos del DNA por PCR usando "arbitrariamente" primers. Los primers son típicamente diez bases de largo y sirven para ampliar hacia adelante o hacia atrás. Los fragmentos de DNA, por electroforesis en un gel de agarosa, es visualizado con el uso de bromuro de etidio y de una fuente de luz ultravioleta.

Microsatélite. (Repetidores de secuencias simples SSRs). Repetición en tandem de arreglos de nucleótidos muy cortos (1-6 largo de base) eg. (CA) 17 o (AAG) 12. Los primers específicos amplían estos sitios por PCR, con visualización por electroforesis en gel de agarosa o gel de acrilanida, usando un secuenciador fluorescente automático.

AFLP (Polimorfismo ampliado fragmentado largo) Una poderosa técnica de huella digital basada en el nuevo PCR multilocus de DNA con gran capacidad de reproducción y gran aplicación. El número de pasos a seguir incluyen – restricción del DNA con restricción de enzimas tal como EcoRI y la MSN.; ligación de los adaptadores al final de estos fragmentos; una preselección PCR, usando un primer EcoRI y un primer MseI, cada uno con una base de extensión detrás del sitio del adaptador. Una ampliación selectiva de PCR, usando EcoRI y MseI primers con 2.3 o 4 base de extensión detrás del sitio del adaptador - el EcoRI es un primer fluorescente que permite la electroforesis y la visualización en un secuenciador automático de DNA. Demarcación de huellas digitales usando un software específico como el GeneScan y el Genotyper. Fragmentos individuales son clasificados con precisión por la inclusión de un estándar interno de una amplitud de onda diferente (color) para más detalles consulte más adelante.

Variaciones genéticas generadas por todas estas técnicas son visualizadas por alguna forma de electroforesis. La electroforesis es la migración de partículas a través de un medio gel bajo la influencia de la corriente eléctrica. Proteínas o fragmentos de DNA de diferentes tamaños migran a través de gel a diferentes lugares. La visualización de estos productos es a través del uso de colorantes como el bromuro de etidium, o por el uso de tinciones fluorescentes de DNA al usar un secuenciador automático.

Recopilación y análisis de datos.

Como se ha mencionado, los marcadores codominantes como los allozymes y los microsatélites nos permiten distinguir los heterocigotos y los homocigotos en un locus aislado (sitio). Los heterocigotos producen dos bandas por la electroforesis por un gel, uno por cada alelo. Los homocigotos producirán una banda única si ambos alelos son idénticos. Frecuentemente estas bandas homocigotos van a doblar la intensidad de la banda de los heterocigotos. Por consiguiente con una población en un sitio único, estamos en condiciones de determinar el número de alelos, la frecuencia de cada alelo, la heterocigosidad observada, la heterocigosidad esperada, basada en el equilibrio de Hardy-Weinberg y como las poblaciones se diferencian en su frecuencia de alelos.

En sitios múltiples, podemos calcular el porcentaje de sitios polimórficos y el porcentaje de alelos por sitio. Podemos calcular igualmente la proporción de la variación total con jerarquías sobre o entre las poblaciones. Esta estructura de la variación genética puede ser usada bajo ciertas presunciones para inferir en los niveles históricos de la corriente de genes. Esto incluye la variación en el uso de microsátélites para la caracterización de las poblaciones, análisis de paternidad y relaciones individuales.

Para marcadores dominantes como el RAPDs y AFLP, los heterocigotos no se pueden distinguir corrientemente de un heterocigoto por consiguiente estos genes se ordenan típicamente de acuerdo a la presencia o ausencia de fragmentos en un tamaño particular. La estadística de poblaciones que deriva de estos datos incluye el porcentaje de marcadores que son polimórficos por población. Estimaciones de la heterocigosidad esperada puede hacerse bajo ciertas presunciones. Sin embargo, la desventaja de dominancia es sobrellevada especialmente con la AFLP, por la generación por un número bastante elevado de marcadores por individuo. Como consecuencia solamente las huellas digitales DNA pueden generar distinciones genéticas individuales. Por consiguiente, los marcadores AFLP a menudo permiten una asignación sin ambigüedades de la paternidad en poblaciones naturales. La presencia /ausencia de la matriz de datos puede ser convertido en una de estimación de la distancia genética entre individuos usando medidores de distancia como la distancia euclidiana, la que puede ser analizada a través de un análisis cerrado, o mejor aún por una técnica de ordenamiento como una escala multidimensional. Este "mapa genético" resume la distancia entre todos los individuos analizados. Por ejemplo nosotros estamos usando este tipo de análisis para delinear la proveniencia genética de especies amenazadas para ser restaurada. La presencia/ausencia de la matriz de datos también puede ser usada para las particiones de análisis de variación por ejemplo usando AMOVA (análisis de variación molecular), que es análoga a la convencional ANOVA, y que se encuentra en el programa Arlequín, o en Genalex (ver los programas computacionales a continuación).

NOTAS TECNICAS

1.- EXTRACCION DE DNA

Tal vez el paso más crítico para el análisis molecular y particularmente AFLP es la extracción limpia de la molécula pesada DNA. He aquí algunas técnicas extractivas del DNA que usamos en el laboratorio del Kings Park.

1.a) DNAZOL®

El DNAzol es el procedimiento de mayor uso debido a su rapidez, efectividad y bajo costo. A trabajado bien para nosotros en un amplio rango de taxa. Es una nueva técnica, basada en una solución lysisn detergente de guanidina que permite la precipitación selectiva del DNA de un lisado de células.

- DNAZOL obtenido del Invitrogen (formalmente tecnologías vivas).
- Muela tejido de plantas (100mg) en nitrógeno líquido usando un mortero y atacador (micro atacador y Eppendorf)
- Agregue 300 ul DNAZOL y mezcle bien .

- Agregue 1-2 Enjuague e incube por 1.5 horas a 25 °C.
- Agregue 300 ul de cloroformo y mezcle vigorosamente. Bata o centrifugue a 13.500 revoluciones por minuto durante 10 minutos, traspasando el contenido a un tubo nuevo.
- Agregue 225 ul de etanol al 100% frío. Mezcle por inversión y déjelo reposar por 5 minutos.
- Centrifugue a 10.000 rpm por 4 minutos .
- Elimina el sobrenadante . Lave el pellet con 300 ul de DNAzol (1 volumen de DNAzol y 0.75 volumen de etanol al 100 %). Deje reposar por 5 minutos.
- Centrifugue a 10.000 rpm por 4 minutos.
- Vierta el sobrenadante y vuelva a lavar los pellets con etanol 70 % (2 veces).
- Elimine el sobrenadante y seque los pellets Disuelva en 70 ul TE (o en agua).

1.b) PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN CTBA (Vea la referencia Doyle al final)

- Muela el material de hojas en nitrógeno líquido hasta obtener polvo.
- Agregue 500 ul extracto buffer CTAB. Incube a 65 °C por 15-20 minutos.
- Centrifugue a 11.500 rpm durante por 10 minutos. Deje decantar el sobrenadante y agregue 200ul de acetato de potasio 5M (pH 4,8). Mezcle suavemente y deje reposar en el congelador por 10 minutos.
- Deshiele y centrifugue a 11.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- Elimine sobrenadante cuidando el volumen y después agregue cantidades iguales de cloroformo a la muestra .Mezcle bien y deje en el batidor por 10 a 60 minutos.
- Centrifugue a 8.000 rpm por 10 minutos, transfiriendo la parte superior a un nuevo tubo. Repita el paso 5 si esta turbio.
- Agregue 330 ul de isopropanol y mezcle con cuidado para que precipite el DNA . Haga reposar en congelador por 5 a 30 minutos.
- Centrifugue a 3.000 rpm por 15 minutos y recoja el DNA (cuidado: los pellets no estarán sólidos).
- Para separar el DNA de los polisacáridos, disuelva el pellet en estado viscoso en 100 ul DI agua y después agregue 400 ul de NaCl 2,5M.
- Precipite el DNA agregando 1 ml de etanol 95% frío.
- Centrifugue a 6.000 rpm por 10 minutos, descartando el sobrenadante.
- Lave los pellets con 1 ml de de etanol 70% (para remover sales), deje que decante el líquido.
- Seque y suspenda nuevamente el DNA en 100 ul 0,1 TE.

- RNase con 1-2 ul de enzima a 37 °C por 60 minutos.

1.c) Jobes *et al.* (1995-ver referencias) procedimiento de extracción.

Una alternativa excelente para un proceso CTAB para remover eficientemente los polifenoles, polisacáridos y RNA. Se basa en el uso del PVP para ligar compuestos polifenólicos a una alta concentración molecular de cloruro de sodio para inhibir la coparticipación de polizacaridos y NDA , y un método mejorado para remover RNA por precipitación selectiva de cloruro de litio. Sin embargo, toma mucho tiempo para que el procedimiento DNazol o QIAGEN DNeasy, y requiere el uso de algunos reactivos repugnantes (fenol, cloroformo , cloruro de litio).

1.d) QIAGEN DNeasy.

Hemos usado el Qiagen Dneasy Kit (cat #69104) con resultados generales muy buenos. Tiene la característica de ser muy rápido y no necesita cloroformo o fenol. Sin embargo, esta opción es más cara alrededor de 5 dólares por muestra. Al compararlas la extracción DNazol cuesta alrededor de 1,5 dólares por muestra.

2. PROTOCOLO AFLP.

Utiliza como reactivo central disponible del Invitrogen (anteriormente Life Technologies) cat # 10482-016.

Ver también: PE Applied Biosystems. 1996. AFLP^(TM) Plant Mapping Protocol. Part Number 402083, Revision B. PE Applied Biosystems, Foster City, California.

2.1 DIGESTIÓN RESTRICTIVA DEL GENOMA DNA.

- Agregue lo siguiente a un tubo eppendorf de 1,5 ml creando una mezcla master.
 - o 5X reacción Buffer 2.5 ul
 - o EcoRI/MseI 1 ul.
- Mezcla Master alícuota, agregue después a 200 –500 ng de muestra DNA (hasta un volumen máximo de 9 ul – complete la diferencia con agua) dando un total de 12,5 ul.
- Mezcle con cuidado y brevemente revuelva. Incube a 37 °C por 2 horas.
- Incube la muestra hasta 70 °C por 15 minutos. Coloque los tubos en hielo.

2.2 Ligason de adaptadores.

- Agregue a la muestra descrita arriba
- Solución de ligason de adaptadores 12 ul.
- T4 DNA ligason 0.5 ul.

- Mezcle con cuidado y revuelva brevemente . Incube a 20 grados por 2 horas o/nite.
- Ejecute la dilución 1:10 de la mezcla de ligación como sigue :
- Tome 5 ul de mezcla de reacción y traspaseselas a un nuevo tubo . Agregue 45 ul 0.1 TE buffer mezcle bien .
- Etiquete tubos.

2.3 REACCIÓN PRE-SELECTIVA PCR .

- Agregue lo siguiente a 1.5ml eppendorf como mezcla maestra

Pre-amp primer Mix I (del invitrogen cat # 10792-018	10ul
10 x PCR buffer (no MgCl)	1,25 ul
1.5 Mm MgCl	0,8 ul
Taq (0.3 Unidades)	0,06 ul.

- Agregue 12.1 ul de mezcla maestra en cada PCR well.
- Agregue 1.25 de DNA diluida del paso 2 .
- Agregue PCR : 20 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 60 segundos, 72 °C durante 60 segundos.
- Logre una dilución de 1:50 tomando 3 ul del producto preseleccionado PCR y agregue un nuevo tubo conteniendo 147 ul de 0.1 TE.
- Etiquete los tubos (3C).

2.4 REACCIÓN SELECTIVA PCR.

- Agregue lo siguiente a 1.5 ml eppendorf como muestra matriz pre-reacción.

10 x PCR Buffer (no MgCl)	1ul
1.5mM MgCl	0.6 ul
Tac (o.25 Units)	0.05ul
Agua	3.10ul

- Tome una alícuota de 4.75 ul en cada PCR well.

Primex mix.

m-primer	2.25ul
e-primer (Labeled)	0.25 ul

- Agregue 2.5 ul del primer mix concentración (final 15 ng m-primer y 7.5 ng e-primer) a cada PCR conteniendo la mezcla master. Note que incluimos esta sigla dNTPS en la m-primer para obtener una concentración final de 0.2 mM para cada una.

+2.5 ul de su "3C" templada de DNA.

PCR SELECTIVO.

Un *touchdown* PCR comenzando con un ciclo 94 °C durante 30 segundos, 70 °C durante 2 minutos y de 72 °C por 12 minutos. En ciclo subsecuentes la temperatura se reduce en pasos de a 1°C hasta 61 °C, seguido por 23 ciclos a 61 °C .Un paso único de 60 °C por 30 minutos, sigue antes de mantener a 4 °C.

2.5 Electroforesis en un ABI Prism 377 Automated Sequencer

Formamide Master Mix.

	36 lanes	48 lanes.
Formamide	30 ul	40 ul.
ROX 500	8 ul	12ul
DYE	14 ul	20ul

- Agregue 1.3 ul en cada tubo , y después agregue 2.5 ul de cada producto PCR seleccionado.
- Mezcle y centrifugue, 90 grados de un baño María por 2 minutos después hielo. Cargue 2 ul (36 lanes) o 1.5 ul (48 lanes) a gel. Remueva la combinación de papel después de comenzar a girar.
- La electroforesis se produce usando 5 % de gel de acrilamida usando un prisma ABI 377 secuenciador automático.

A Few Useful References

Reviews of molecular techniques

Chase, M. W. and M. F. Fay. 1997. Molecular tools for conservation genetics: an update on recent methods. Pages 155-167 in D. H. Touchell and K. W. Dixon, editors. Conservation into the 21st century. Kings Park and Botanic Gardens, West Perth.

Fay M and Krauss SL (in press) Orchid Conservation Genetics in the Molecular Age. In: Dixon KW, Kell SP, Cribb FJ and Barrett RL (eds) Orchid Conservation. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Jones CJ et al. (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3:381-390.

Karp A et al (1997) Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin #2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Parker PG et al. (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.

Qamaruz-Zaman, F., M. F. Fay, J. S. Parker and M. W. Chase. 1998. Molecular techniques employed in the assessment of genetic diversity: a review focusing on orchid conservation. *Lindleyana* 13: 259-283.

Rafalski JA and Tingey SV (1993) Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9:275-280.

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton.

DNA extraction

Chase MA and H. G. Hills. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215-220.

Doyle J (1991) CTAB Total DNA isolation. In: Hewitt GM et al (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI series vol H57. Springer-Verlag, Berlin.

Jobs DV, Hurley DL and Thien LB (1995) Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA. *Taxon* 44:379-386.

PCR

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Nature (London)* 239: 487-497.

Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA (eds)(1994) *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhauser, Boston.

RAPDs

Lynch, M. and B. G. Milligan. 1994. Analysis of population structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.

Perez T, Albornoz J and Dominguez A (1998) An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology* 7:1347-1357.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6231-6235.

AFLP

Mueller, U.G. and L. L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 389-394.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Rijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

SSRs or microsatellites

Beaumont, M. A. and M. W. Bruford. 1999. Microsatellites in conservation genetics. Pages 165-182 in D. B. Goldstein and C. Schlötterer, editors. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford.

Goldstein, D. B. and C. Schlötterer, editors. 1999a. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford.

Jarne PJ and Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* 11:424-429

Morgante, M., A. Pfeiffer, I. Jurman, G. Paglia and A. M. Olivieri. 1998. Isolation of microsatellite markers in plants. Pages 288-296 in A. Karp, P. G. Isaac and D. S. Ingram, editors. *Molecular tools for screening biodiversity. Plants and Animals*. Chapman & Hall, London.

Queller DC, Strassmann JE and Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. *TREE* 8:285-290.

Some computer programs for genetic data analysis

ARLEQUIN <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>
GDA <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>
POPGENE <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>
TFPGA <http://herb.bio.nau.edu/~miller>
ANALYSE <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/Mac/Analyse/index.html>
GENALEX rod.peakall@anu.edu.au

a web link to many programs can be found at:
<http://www.biology.lsu.edu/general/software.html>

Selected orchid conservation genetics references

Ackerman, J. D. 1998. Evolutionary potential in orchids: patterns and strategies for conservation. *Selbyana* 19: 8-14.

_____ and S. Ward. 1999. Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? *Systematic Botany* 24: 282-291.

Alexandersson, R. and J. Agren. 2000. Genetic structure in the nonrewarding, bumblebee-pollinated orchid *Calypso bulbosa*. *Heredity* 85: 401-409.

Arditti, J. and A. K. A. Ghani. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145: 367-421.

Arft, A. M. and T. A. Ranker. 1998. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis*. *American Journal of Botany* 85: 110-122.

Benner, M. S., M. D. Braunstein and M. U. Weisberg. 1995. Detection of DNA polymorphisms within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 13: 147-155.

- Borba, E. L., J. M. Felix, V. N. Solferini and J. Semir. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.
- Bowles, M. L. and C. J. Whelan, eds. 1994. Restoration of endangered species. Cambridge University Press, Cambridge.
- Carronero, W., J. D. Ackerman, and L. T. Raymond. 1998. Genetic diversity for *Lepanthes* (Orchidaceae) species with widespread and restricted geographical distribution within the island of Puerto Rico. *American Journal of Botany* 84 (Supplement): 68 [Abstract].
- Chase, M. A., H. T. Mlodozienec, L. E. Wallace, and T. W. Weldy. 1997. An isozyme evaluation of the taxonomic status of *Cypripedium kentuckiense*. *American Journal of Botany* 84 (Supplement): 180 [Abstract].
- _____, _____, _____ and _____. 1998. Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky Lady's slipper: *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 1779-1786.
- _____, J. V. Freudenstein and K. M. Cameron (in press). DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In Dixon, K. and R. Barrett (eds.). *Orchid Biology and Conservation*. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- _____ & J. D. Palmer. 1989. Chloroplast DNA systematics of lilioid monocots: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 76: 1720-1730.
- Chen, X., L. S. Hoon, S. Man Wong, Y. Hwa Lee, J. Kuo, T. Wing Yam and J. J. Lin. 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis in vandaceous orchids. *Plant Science* 141: 183-189.
- Coates, D. J., S. D. Hopper and S. L. Farrer, editors. 2000. A special issue: genetics and conservation of Australian flora. *Australian Journal of Botany* 48: 287-416.
- Dawson, I. K., A. J. Simons, R. Waugh and W. Powell. 1995. Diversity and genetic differentiation among sub-populations of *Gliciridia sepium* revealed by PCR-based assays. *Heredity* 74: 10-18.
- Ellstrand, N. C. and D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.

Falk, D. A. and K. E. Holsinger, editors. 1991. Genetics and Conservation of Rare Plants. Oxford University Press, Oxford.

Fay, M. F. and R. S. Cowan. Plastid microsatellites in *Cypripedium calceolus*. Royal Botanic Gardens, Kew.

_____ and _____. 2001. Submitted. Plastid microsatellites in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae): genetic fingerprints from herbarium specimens. Lindleyana.

_____ and A. V. Cox. 1997. Genetic fingerprinting of *Cypripedium calceolus* in England: a preliminary report. Royal Botanic Gardens, Kew.

_____, F. Qamaruz-Zaman, H. Thornton and R. S. Cowan. In press. Molecular techniques for orchid conservation genetic studies. In J. Clark, G. Tingley, J. Biro and M. Elliott, editors. Proceedings of the 16th World Orchid Conference. Harbour Publishing, Madeira Park, British Columbia.

Fenster, C. B. and M. R. Dudash. 1994. Genetic considerations for plant population restoration and conservation. Pages 34-63 in C. J. Bowles and M. L. Whelan, editors. Restoration of endangered species. Cambridge University Press, Cambridge.

Foley, M. J. Y. 2000. *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó subsp. *ochroleuca* (Wüstnei ex Boll) P. F. Hunt & Summerh. (Orchidaceae): a comparison of British and European plants. *Watsonia* 23: 299-303.

Frankel, O.H., A.H.D. Brown and J.J. Burdon. 1995. The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge.

Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 3305-327.
Gillman, M. P. and M. E. Dodd. 1998. The variability of orchid population size. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 65-74.

Goldman, D. H. 2000. Systematics of *Calopogon* and the tribe Arethuseae (Orchidaceae). PhD thesis. University of Texas, Austin.

_____, M. W. Chase, and M. F. Fay. 1998. Phylogeny and circumscription in *Calopogon* (Orchidaceae) as inferred from ITS sequence and AFLP data. *American Journal of Botany* 85 (Supplement): 133 [Abstract].

Gustafsson, S. 2000. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology* 9: 1863-1872.

Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, D. A. Murawski and M. D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. Pages

75-86 in D. A. Falk and K. E. Holsinger, editors. Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, Oxford.

Hedrén, M. 1996a. Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): evidence from allozyme markers. *Plant Systematics and Evolution* 201: 31-55.

_____. 1996b. Electrophoretic evidence for allotetraploid origin of *Dactylorhiza purpurella* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* 16: 127-134.

_____. 1996c. The allotetraploid nature of *Dactylorhiza praetermissa* (Druce) Soó (Orchidaceae) confirmed. *Watsonia* 21: 113-118.

_____. 2001. Conservation priorities in *Dactylorhiza*, a taxonomically complex genus. *Lindleyana* 16: 17-25.

_____, M. F. Fay and M. W. Chase. 1998. AFLPs elucidate relationships in the *Dactylorhiza* polyploid complex. *American Journal of Botany* 85 (Supplement): 135 [Abstract].

_____, _____ and _____. In press. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*.

Hogbin P. M., R. Peakall, and M. A. Sydes. 2000. Achieving practical outcomes from genetic studies of rare Australian plants. *Australian Journal of Botany* 48: 375-382.

Knapp, E. E. and A. R. Dyer. 1998. When do genetic considerations require special approaches to ecological restoration? Pages 345-363 in P. L. Fiedler and P. Kareiva (eds.), *Conservation biology for the coming decade*. Chapman and Hall, New York, New York, USA.

Krauss, S. L. 1999. Complete exclusion of non-sires in an analysis of paternity in a natural plant population using AFLP. *Molecular Ecology* 8:217-226.

_____. 2000a. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* 9:1241-1245.

_____. 2000b. Patterns of mating in *Personia mollis* (Proteaceae) revealed by an analysis of paternity using AFLP: implications for conservation. *Australian Journal of Botany* 48: 349-356

_____, B. Dixon and K. W. Dixon. In press. Rapid genetic decline in a translocated population of the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Conservation Biology*

Lesica, P. and F. W. Allendorf. 1999. Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match? *Restoration Ecology* 7: 42-50.

Linder, H. P. 1995. Setting conservation priorities: the importance of endemism and phylogeny in the Southern African orchid genus *Herschelia*. *Conservation Biology* 9: 585-595.

Linhart, Y. B. and M. C. Grant. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 237-277.

McLenachan, P. A., K. Stockler, R. C. Winkworth, K. McBreen, S. Zauner, and P. J. Lockhart. 2000. Markers derived from amplified fragment length polymorphism gels for plant ecology and evolution studies. *Molecular Ecology* 9: 1899-1903.

Min, A. A. and S.T. Tan. 1996. Genetic polymorphisms and relationships among Asian slipper orchids of the genus *Paphiopedilum*. *Journal of Bioscience*. 7: 177-187

Neiland, M. R. M. and C. C. Wilcock. 1998. Fruit set, nectar reward and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657-1671.

Nielsen, L. R. 2000. Natural hybridization between *Vanilla claviculata* (W. Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb.f. (Orchidaceae): genetic, morphological and pollination experimental data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 285-302.

_____ and Siegismund, H. R. 1999. Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). *Heredity* 83: 560-567.

Parra-Tabla, V., C. F. Vargas, S. Magana-Rueda and J. Navarro. 2000. Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindley (Orchidaceae) in two contrasting habitat patches: forest vs agricultural field. *Biological Conservation* 94: 335-340.

Perkins, A. J. and P. A. McGee. 1995. Distribution of the orchid mycorrhizal fungus *Rhizoctonia solani* AG 6 in relation to its host *Pterostylis acuminata* in the field. *Australian Journal of Botany* 43: 565 - 575.

Qamaruz-Zaman, F. 2000. Conservation genetics of rare and endangered British orchids. PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge.

_____, _____, _____ and _____. 1998b. The use of AFLP fingerprinting in conservation genetics: a case study of *Orchis simia* (Orchidaceae). *Lindleyana* 13: 125-133.

Rieseberg, L.H. 1991. Hybridization in rare plants: insights from case studies in *Cercocarpus* and *Helianthus*. Pages 171-181 in D. A. Falk and K. E. Holsinger, editors. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press: Oxford.

Schaal, B. A., W. J. Leverich and S. H. Rogstad. 1991. A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. Pages 123-134 in D. A. Falk and K. E. Holsinger, editors. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, Oxford.

Sharma, I. K., M. A. Clements and D. L. Jones. 2000. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 651-663.

Soliva, M., B. Gautschi, C. Salzmann, I. Tenzer and A. Widmer. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test of cross-species amplification. *Molecular Ecology* 9: 2178-2179.

Sosa, V. and T. Platas. 1998. Extinction and persistence of rare orchids in Veracruz, Mexico. *Conservation Biology* 12: 451-455

Ståhlberg, D. 1999. Polyploid evolution in the European orchid genus *Nigritella*: evidence from DNA fingerprinting. MSc thesis. University of Lund, Lund, Sweden.

Stephenson, T. and T. A. Stephenson. 1927. The British forms of *Orchis incarnata*. *Journal of Botany* 61: 273-278.

Sun, M. 1996. Genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*: the effects of population size, mating system, and evolutionary origin. *Conservation Biology* 10: 785-795.

_____. 1997. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. *American Journal of Botany* 84: 224-232.

Szalanski, A. L., G. Steinauer, R. Bischof and J. Petersen. 2001. Origin and conservation genetics of the threatened Ute ladies'-tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 88: 177-180.

Taylor, D. L. and T. D. Bruns. 1999. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology* 8: 1719-1732.

Travis, S. E., J. Maschinski and P. Keim. 1996. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology* 5: 735-745.

Tremblay, R. L. and J. D. Ackerman. 2001. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 47-62

_____ and Salguero-Fara, J. A. 2001. The unkindest cut: the fate of *Lepanthes woodburyana*, a small neotropical orchid. *Lindleyana* 16: 38-42.

Wallace, L. E. and M. A. Case. 1997. Associations of northern vs. southern yellow lady's slippers (*Cypripedium parviflorum* vars. *parviflorum*, *pubescens*, and *makasin*): inferences from isozyme and morphological analyses. *American Journal of Botany* 84 (Supplement): 241 [Abstract].

Wong, K. C. and M. Sun. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 86:1406-1413.

CAPÍTULO 4. TÉCNICA DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEA

(Traducido por Ximena Calderón Baltierra, Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Universidad de Talca).

SEMILLAS

Las semillas son el material que generalmente se prefiere propagar para maximizar la diversidad genética de plantas que se producen. Como la principal forma de dispersión de semillas de orquídeas es por el viento, cada cápsula tiene miles de semillas. Las semillas terrestres tienen fama de ser difíciles de germinar. En cierto grado esto es cierto, pero ellas no forman grupos homogéneos con respecto a los requerimientos para germinar y para el desarrollo de las plántulas, y, aunque se han resuelto algunos problemas hay todavía mucho por descubrir.

Cuando se propaga a partir de semilla hay que considerar factores como la calidad de la semilla. Esto puede parecer muy obvio, pero se ha gastado mucho dinero y esfuerzos en proyectos donde se han usado complicadas técnicas sin éxito, debido a la pobre calidad de las semillas.

POLINIZACIÓN

Las poblaciones pequeñas pueden tener problemas para atraer polinizadores y puede haber mecanismos de incompatibilidad que pueden prevenir la producción de semillas. Si se colecta de poblaciones polinizadas en forma natural, se puede usar una pauta de la proporción colectada (colectando varias plantas, tomando no más del 10%, no colectar cuando no hay muchos individuos siguiendo las pautas que se usan normalmente).

Si la producción de semillas es baja, entonces es mejor la polinización manual, mantener una colección de plantas *ex situ* donde no halla polinizadores o no tengan acceso a ellas. También la polinización cruzada puede ser ventajosa y se aconsejan para estudios de conservación genética. En muchos casos es aconsejable probar la eficacia del polen mediante la técnica de la gota pendiente descrita por Light y MacConnail (1996).

COLECTA

Los científicos frecuentemente cuentan con Botánicos de campo, conservadores, etc., para colectar cápsulas. Es importante dar instrucciones claras. Esto puede incluir pautas de cuando colectar las cápsulas, tiempo promedio para que maduren las cápsulas, tipo de contenedor, empacamiento. Se debe enfatizar en el no uso de bolsas plásticas o contenedores que retengan la humedad, por lo que será difícil remover las semillas por cuestiones de estática. Las semillas no se deben poner en el refrigerador. Una vez recibidas hay que registrar: donador, procedencia, fecha de cosecha, condiciones de la semilla) y en lo posible poner un ejemplar en el herbario.

COLECTA DE SEMILLAS DE ORQUIDEA PARA LA PROPAGACION

1. Como pauta, la cantidad de semillas que se colecte no debe ser mayor que el 10% de las semillas disponibles en un día de colecta. Donde hay pocos individuos no se debe colectar.
2. El momento adecuado para colectar emillas es cuando la cápsula está comenzando a ponerse café, antes que la cápsula se parta. En este estado las semillas están completamente desarrolladas, pero se corre el riesgo de contaminación por esporas de hongos y bacterias.
3. Por lo general las cápsulas maduran a destiempo en la misma inflorescencia, por lo que se recomienda colectar las cápsulas individuales y dejar que las inmaduras terminen su proceso en forma natural.
4. Colectar preferentemente en viales de vidrio poniendo pocas cápsulas por frasco. Tapar con algodón y envolver en papel.
5. Es muy difícil recuperar las semillas que se han colectado en envases plásticos. No las deje en el refrigerador. Debe identificarse las cápsulas con la siguiente información: especie, localidad, fecha de polinización, fecha de colecta, colector.

HACER LÁMINAS (PARA PORTAOBJETOS) DE SEMILLAS GERMINADAS

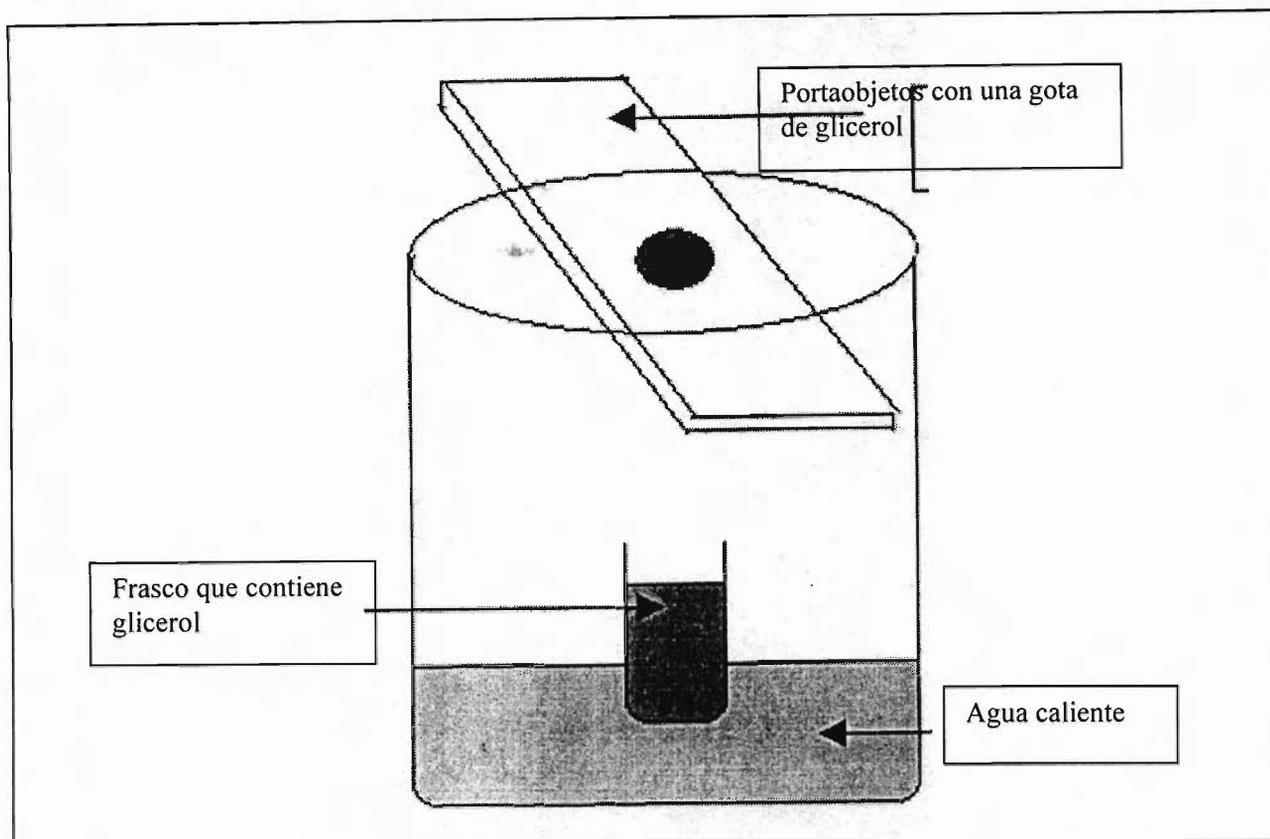
Es adecuado preparar muestras para microscopio de las semillas que se germinen. Si la recepción de las semillas es desconocida, el color, forma y tamaño pueden ayudar a distinguir los géneros.

Muchas las semillas pueden parecer normal pero no tener embrión. El hacer una preparación para observar en portaobjetos es útil para registrar esto y puede indicar que la semilla no ha sido sembrada mal. Indicaciones (figura 4.1):

- Llene un vaso precipitado con agua caliente
- Ponga un vial que contiene glicerol en el agua, deje hasta que hierva.
- Sobreponga el portaobjeto en la boca del vaso precipitado y agregue una gota de glicerol en el centro del portaobjeto.
- Deje caer una pequeña cantidad de semillas de orquídea de semillas y agite con aguja.
- Ponga un cubreobjeto circular y luego selle con pintura de uñas incolora.
- Observe al microscopio.

Se puede agregar los colorantes Alcian blue o Azul de Coomasico al glicerol pero no es esencial. La tinción se usó originalmente para teñir polen. Los embriones de semilla generalmente se observan sin teñir.

Figura 4.1. Preparación para observar en portaobjetos.



¿SEMILLAS MADURAS O INMADURAS?

La ventaja de coleccionar semillas maduras es que se puede almacenar y germinar más tarde, pero la inmadura no. La semilla madura ideal es aquella que se obtiene de cápsulas a punto de abrir. En este estado las semillas están totalmente maduras y se evita correr el riesgo de contaminación con hongos y bacterias que es tan frecuente con este material.

Técnicas de germinación de semillas inmaduras

Las cápsulas verdes generalmente son difíciles de hacer germinar. La desventaja de usar semillas de cápsulas inmaduras es el riesgo que lleven virus. Si las cápsulas se coleccionan muy temprano ocurrirá la maduración en unas pocas semanas.

Técnicas de germinación para semillas maduras

Se pueden dividir en dos grupos: semillas en contacto y no en contacto con el esterilizante.

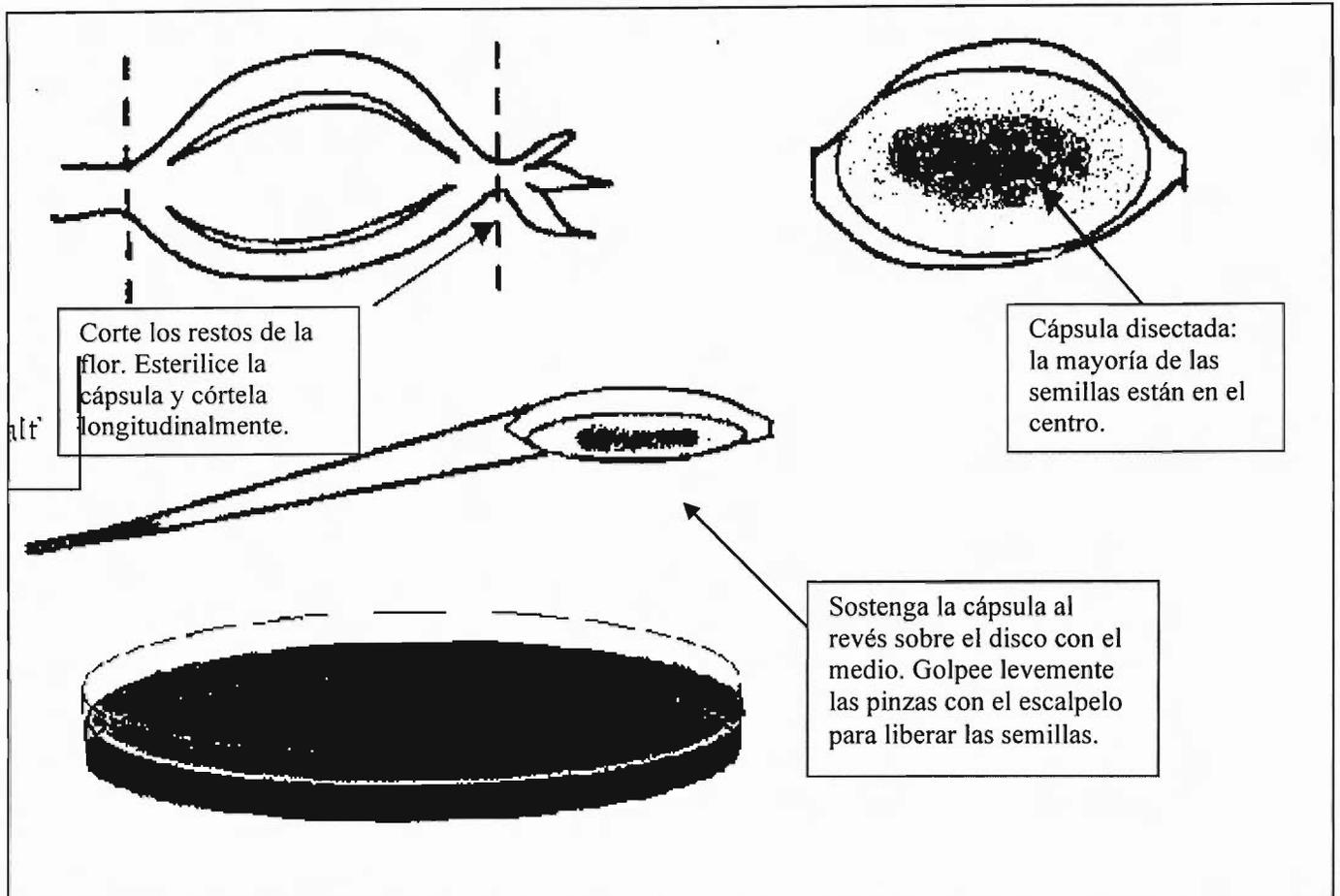
Las semillas en contacto directo con la solución de lavado deben ser expuestas a bajas concentraciones del mismo y por tiempos cortos. La tensión superficial las hace flotar por lo que se

recomienda usar agentes surfactantes, infiltración al vacío y agitadores. La transferencia debe hacerse en campana de flujo laminar para mantener la asepsia.

GERMINACION A PARTIR DE CAPSULAS VERDES

- Corte la cápsula con bisturí estéril. Cambie de bisturí entre una y otra cápsula para evitar la infección viral. Las cápsulas colectadas se pueden almacenar pero es preferible usarlas de inmediato (figura 4.2).
- Cuidadosamente elimine cualquier resto de partes secas de la flor que queden adheridos.
- Cepille las cápsulas con cepillo de dientes suave con detergente.
- Empape las cápsulas en cloro 1% por 10 minutos.
- En una campana de flujo póngalas en placas Petri.
- Empape unos segundos en alcohol 100%
- Flamee y deje que se enfríe. Repita.
- Corte longitudinalmente la cápsula para cortar en dos mitades.
- Sacuda las semillas sobre el medio de cultivo hasta que todas las semillas se hallan sacado.
- Repita la operación con las otras semillas.

Figura 4.2. Germinación de semillas con cápsula verde.



GERMINACION DE SEMILLAS INMADURAS

Una de las diferencias entre la esterilización de semillas de epifitas y de terrestres es que con las primeras es más fácil y sencilla la esterilización superficial. Las terrestres pueden requerir más tiempo y métodos más complejos de esterilización superficial.

NaOCl y CaOCl son los agentes más usados para esterilizar semillas de orquídeas. Se preparan soluciones Standard.

Una alternativa para romper la test es utilizar previamente H₂SO₄ 0,5-2% por 5-15 minutos antes del cloro, pero este tiempo y concentración se debe ajustar para cada especie.

METODO DEL PAQUETE

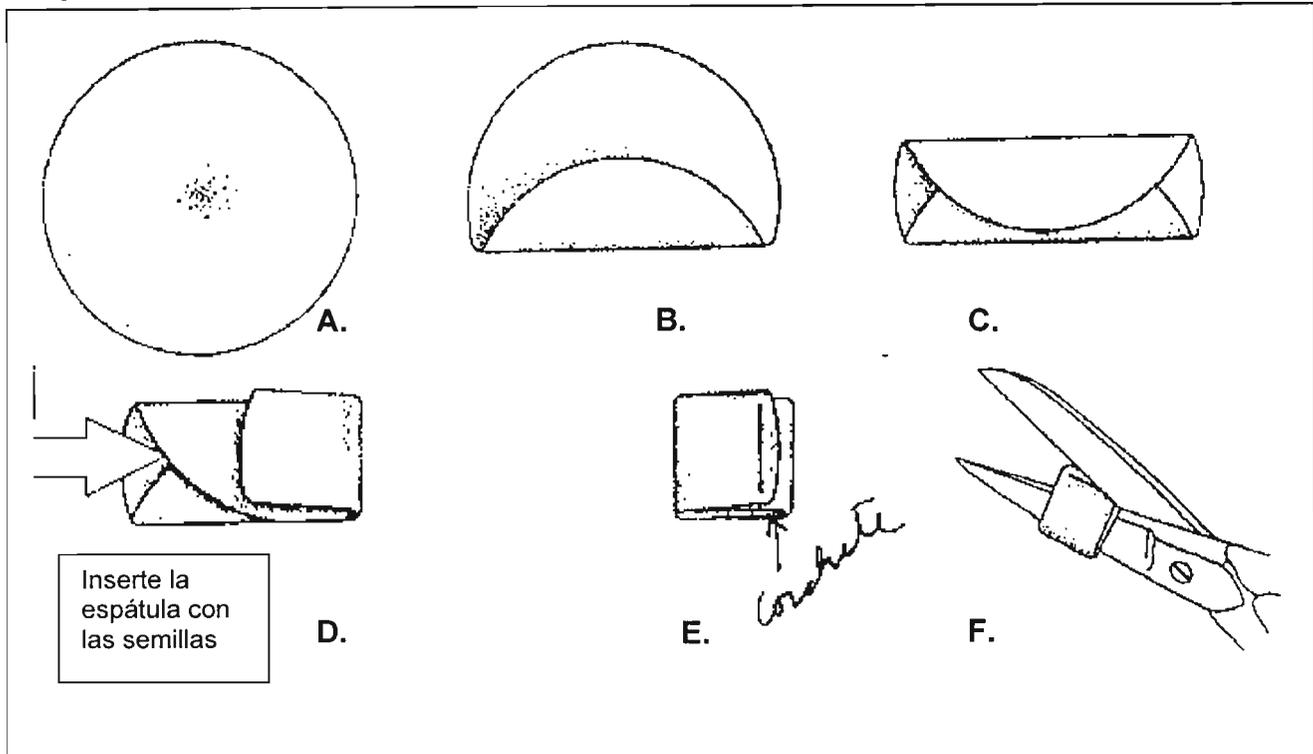
La mayor ventaja de utilizar un método de contacto indirecto como el uso de paquetes de papel filtro (Mitchell, 1989) es su fácil manipulación. También es una técnica útil cuando se cuenta con pequeñas cantidades de semilla disponible que no pueden ser desperdiciadas.

Se deben utilizar concentraciones más altas de esterilizante junto con un surfactante para que el esterilizante penetre el papel filtro. No es apropiado para inmersiones prolongadas debido a que el

papel filtro de puede desintegrar. Las semillas no están en contacto directo con el agente esterilizante y es adecuado cuando no se dispone de muchas semillas. Es importante utilizar un grado de papel filtro que soporte el empapado (por ej., Whatman 54, Hardened) (figura 4.2).

- Ponga una pequeña cantidad de semillas en el centro del papel filtro (A) (45 mm x 45 mm o un círculo de 42,5 mm de diámetro).
- Pliegue el papel filtro para formar un paquete pequeño con el papel (B y C).
- Prepare una espátula para insertar las semillas (D). Abra levemente el paquete e inserte las semillas.
- Cierre con una grapa o corchete (E). Las semillas deben estar ubicadas al extremo opuesto del corchete.
- No inserte una cantidad muy grande de semillas en un paquete porque el esterilizante puede que no sea capaz de penetrar. Es mejor hacer varios paquetes.
- Sumerja los paquetes en agua destilada con pinzas, estrujando para eliminar el aire.
- Transfiera los paquetes al vaso precipitado, y cierre la tapa de la solución esterilizante, apretando los paquetes para eliminar el aire restante que puede hacer flotar los paquetes. No ponga más de 5 paquetes por beacker, es preferible usar varios recipientes.
- Ponga el vaso precipitado en un agitador magnético (el corchete actúa como barra de agitación) y deje 10-15 minutos de acuerdo al tratamiento. Alternativamente, utilice una botella pequeña que contenga 1 o 2 paquetes y agite suavemente con la mano con la solución de esterilización.
- Traslade el vaso precipitado a un área esterilizada/ flujo, retire los paquetes del esterilizante ayudándose con pinzas y sumérgalas en agua destilada esterilizada (en tubo separados o en botellas con tapa rosca). Agite por 5 min.
- Repita el enjuague por 2 veces más.
- Saque los paquetes del agua y exprima para quitar el exceso de agua.
- Corte los paquetes en el extremo del corchete y abra con pinzas (F).
- Sosteniendo el papel filtro con las semillas hacia abajo, pose levemente el papel contra el medio – las semillas deberían quedar adheridas a la superficie. Si las semillas estuvieran pegadas al papel filtro, frotar suavemente el filtro con las pinzas ayudará a que se desprendan. Con práctica, las semillas pueden ser sembradas en forma muy uniforme.

Figura 4.2. Método de siembra del paquete.



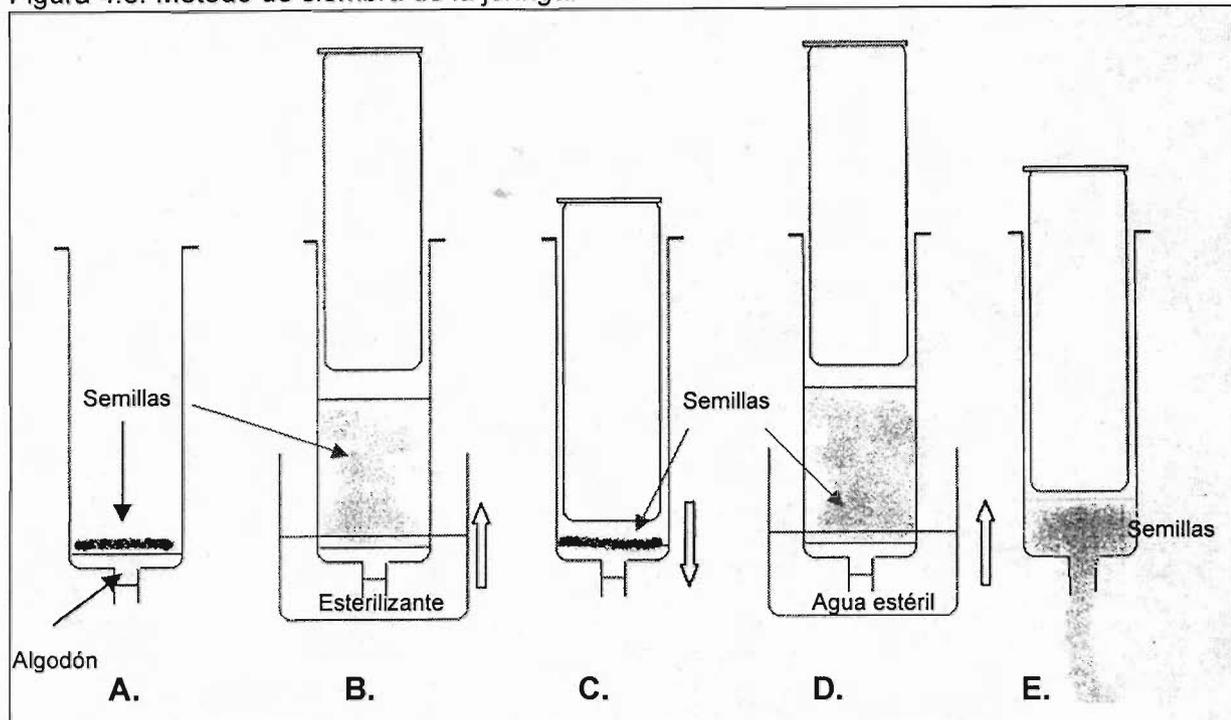
METODO DE LA JERINGA

En este método, todas las etapas de esterilización y enjuague ocurren en la misma jeringa, es posible llevar a cabo el procedimiento en un espacio abierto, requiriendo sólo de un ambiente limpio (cabina o trabajar sobre vapor) para la etapa final de siembra. Se puede hacer sobre el mesón si éste está bien limpio (figura 4.3).

- Utilice una jeringa de vidrio de 10 o 20 ml y un vaso precipitado pequeño para soporte.
- Ponga una pequeña cantidad de algodón en la base de la jeringa que actúe como tapón (A). (requiere estar suficientemente compactada para actuar como filtro durante las etapas de esterilización y enjuague, pero a la vez suelto para permitir la descarga de semillas en la etapa de siembra) cubrir con papel filtro.
- Agregue con una espátula las semillas (A).
- Ponga el émbolo y agregue una solución de NaOCl 1% ó 2% (B).
- Golpee levemente la jeringa para eliminar las burbujas de aire y dispersar las semillas, invierta la jeringa y quite presión suficiente para eliminar el aire.
- Agite por 10 minutos llevando la jeringa posición invertida y luego volver.
- Fuerce la salida del esterilizante empujando el émbolo hasta la base.
- Para enjuagar las semillas succione agua estéril, agite levemente y empuje fuera el agua. Lave con agua estéril varias veces.
- Repita el proceso por 2 a 3 veces.

- Saque el tapón de algodón (golpeando la jeringa o empujando con la punta de una aguja esterilizada), llene con 1-2 ml de agua estéril.
- Disperse las semillas en la solución y luego ponga las semillas en el medio. El exceso de agua puede ser extraída succionando nuevamente con la jeringa.
- En forma alternativa, las semillas pueden ser sembradas por medio de eliminar el algodón con pinzas y golpeando sobre la superficie del medio, también golpeando el extremo del émbolo.

Figura 4.3. Método de siembra de la jeringa.



METODO DE ESTERILIZACION DIRECTA EN UN TUBO

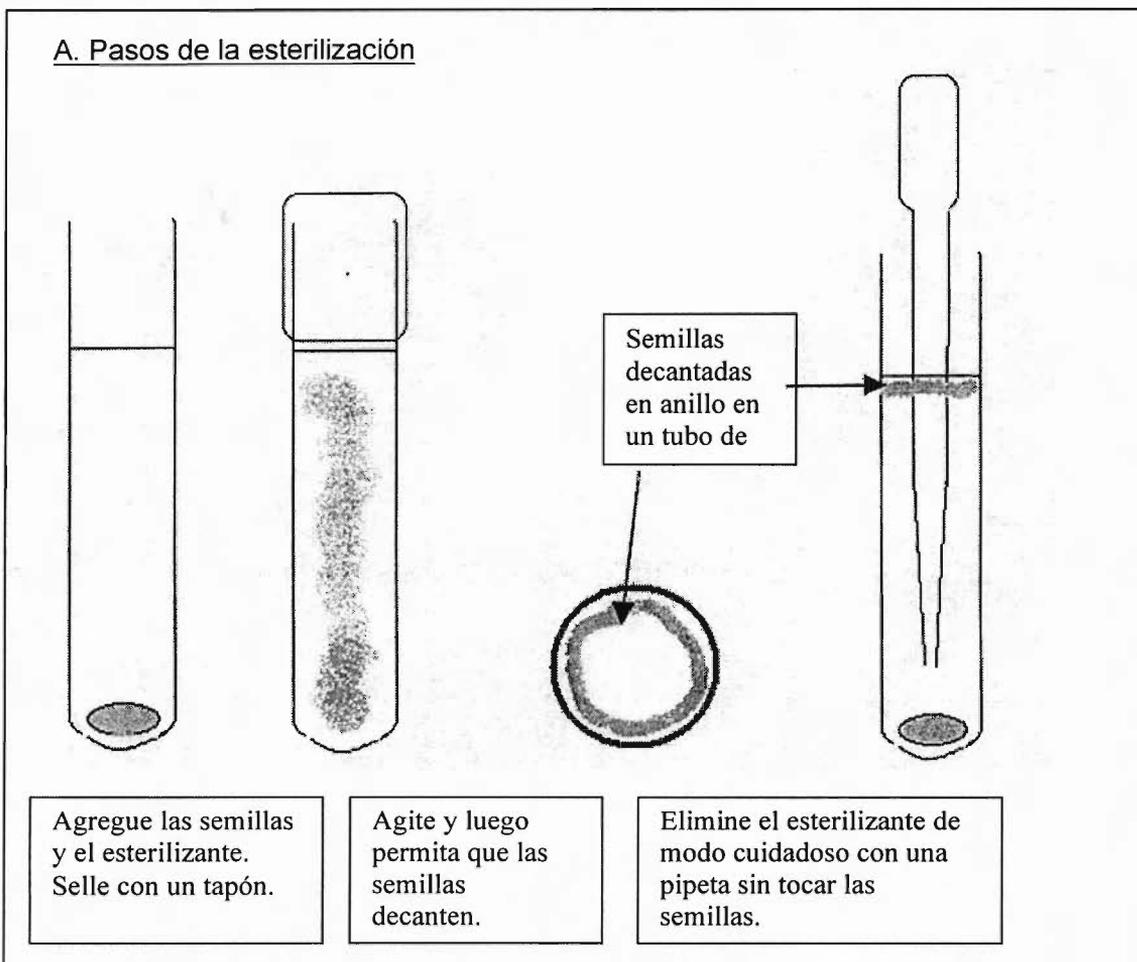
Este método se puede usar en combinación con el test de Trifeniltetrazolium de viabilidad para obtener una comparación directa de la viabilidad y tasa de germinación (siempre que las semillas hayan sido esterilizadas por el mismo tratamiento).

- Ponga una pequeña cantidad de semillas en un tubo de ensayo
- Agregue el agente esterilizante con un agente humectante (para ayudar al contacto de las semillas y al decante).
- Cierre bien.
- Agite el tubo por 5-15 min. De modo que las semillas logren un buen contacto con el esterilizante.
- Para esterilizaciones más prolongadas, especialmente para el caso de las semillas de orquídeas terrestres, un equipamiento con un rotador de sangre puede permitir una agitación intensa y constante.
- 1-2 minutos previos a término de la esterilización, detenga la agitación para que las semillas sedimenten.

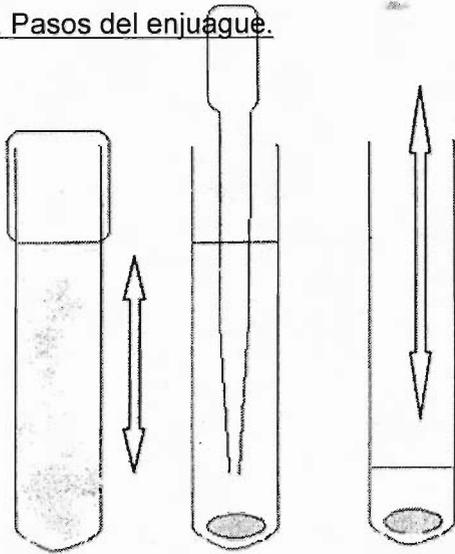
o

- Las semillas sedimentarán en la base del tubo o formarán un anillo en el extremo superior del tubo.
- Retire la solución esterilizante sobre las semillas con una pipeta (las pipetas de plástico desechables son útiles).
- Retirar toda la solución no es tan crítico debido a que con los sucesivos enjuagues se irá diluyendo.
- Utilizando otra pipeta estéril, agregue agua destilada estéril, selle y agite.
- Permita que la semilla sedimente y elimine el agua con una pipeta. Repita el enjuague.
- En el enjuague final, retenga 1 ml de agua, agite con poco para suspender las semillas y luego rápidamente eche el contenido en un disco de Petri o frasco (o use una pipeta para succionar y luego dispersar).
- Disperse las semillas en un disco con una espátula (el exceso de agua puede ser eliminado con una pipeta).

Figura 4.5. Método de esterilización directa en tubo.

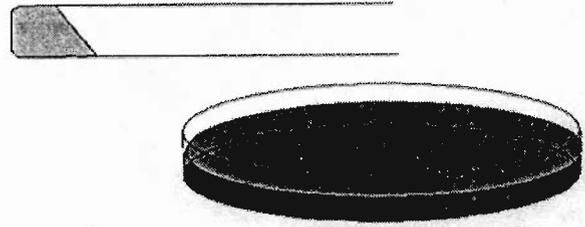


B. Pasos del enjuague.



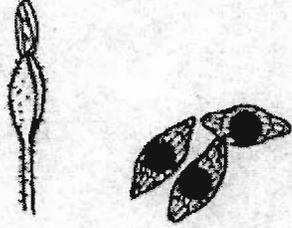
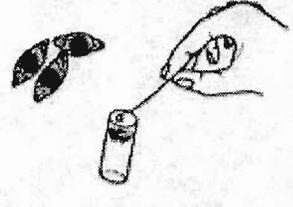
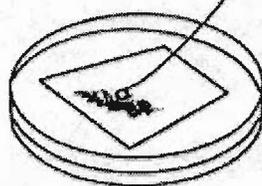
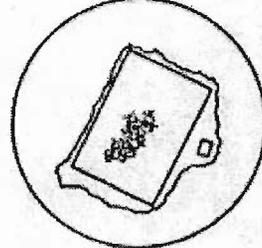
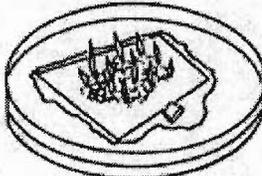
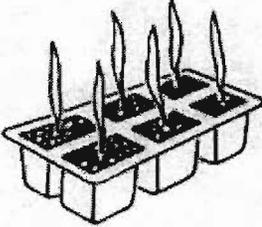
Agregue agua esterilizada y agite.

Deje que las semillas decanten, y luego extraiga el agua con una pipeta. Repita los pasos de enjuague.



En 1 ml del último enjuague agite y suspenda nuevamente las semillas. Luego vierta sobre un disco.

Figura 4.5. Panorama de la propagación simbiótica de las orquídeas terrestres.

Fase	Procedimiento	Diagrama
Recolección de semillas	La recolección de semillas desde plantas del campo es un paso importante para la producción de plántulas en el laboratorio.	
Esterilización de semillas	Es necesario eliminar cualquier bacteria u hongo de la semilla en forma previa a ponerla en un medio de germinación. Esto se hace por medio del lavado de la semilla en una solución de cloro suave.	
Siembra de semillas	Una vez que la semilla está estéril se enjuaga en agua estéril para remover los restos de cloro y de reparte uniformemente sobre el papel filtro y se disponen en discos de germinación.	
Inoculación con hongos	Antes que la semilla germine, ésta necesitará ser inoculada con el hongo ayudador correcto, aislado desde plantas de la misma especie que la semilla. El hongo crece a través del disco de germinación infectando las semillas estimulando la germinación de la semilla.	
Germinación de la semilla	Después de un período de hasta 8 semanas, la semilla germinada habrá desarrollado hojas y necesitará ser trasladada a otras condiciones de crecimiento.	
Crecimiento	La traslocación de las plantas de semillas al suelo es una de las áreas de mayor concentración de los recursos de <i>Western Power Rescue Orchid Program</i> . Los resultados iniciales son promisorios.	

LITERATURE CITED

Hicks, A.J. 2000. Asymbiotic technique of Orchid Seed Germination. The Orchid Seedbank Project, Chandler. USA

Lakon G 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germination capacity of the seed *Plant Physiol* 24:389-394

Lauzer D, St-Arnauld M, Barabe D 1994 Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) *Lindleyana* 9(3) 197-204

Lucke,E. 1975. Sowing of orchid seed – made easy. American Orchid Society Bulletin 44:109-118

Malmgren, S. 1992 . Large scale asymbiotic propagation of *Cypripedium calceolus* - plant physiology from a surgeon's point of view . Botanic Gardens Micropropagation News 1(5):59-64

Malmgren, S. 1996 Orchid Propagation: theory and Practice. Proceedings of the North American Native Terrestrial Orchid Conference

Mitchell,R.B. 1989 Growing hardy orchids from seed at Kew. The Plantsman 11:152-69

Singh F 1981 Differential staining of orchid seeds for viability testing. *Am Orchid Soc Bull* 50:416-418

Thompson, P.A 1996 Orchids from seed . Royal Botanic Gardens, Kew

Van Waes J.M. and P.C. Debergh. 1986. Adaption of the tetrazolium method for testing the seed viability , and scanning electron microscopy study of some Western European Orchids. *Physiol Plant*.66:435-442.

CAPÍTULO 5. AISLAMIENTO DE HONGOS DE ORQUÍDEAS

(Traducido por Ximena Calderón Baltierra, Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Universidad de Talca).

En las orquídeas terrestres solo las partes subterráneas están infectadas con el hongo apropiado. Típicamente los collares del tallo o raíces contienen pelotones de hongos. Después de coleccionar el material en el campo, la tierra se remueve por repetidos lavados con agua de la llave. Hay dos métodos para obtener los pelotones estériles para iniciar cultivos estériles de los hongos.

A. Esterilización superficial

Los tejidos se esterilizan superficialmente con cloro 0,5% por 5-10 min. Los colares de raíz se lavan dos veces en agua estéril. Se remueve la epidermis bajo el microscopio y los pelotones se extraen de las células corticales, se cortan y ponen en medio de aislamiento de hongos (FIM)

B. Lavado de los pelotones

Este método no usa agentes químicos para esterilizar. Los contaminantes se lavan con agua agitando vigorosamente. Los pelotones se extraen bajo el microscopio cortando la epidermis y dejando el tejido cortical libre. Con una pipeta pasteur con punta muy fina se succiona los pelotones y se depositan gotas sobre placa Petri para generar una dilución. Los pelotones individuales se plaquean sobre medio FIM. Este método es muy usado en el Kings Park.

C. Purificación del aislado

Las placas con medio FIM se almacenan en oscuridad a temperatura ambiente. Se requiere monitorear los pelotones periódicamente hasta observar las hifas creciendo desde los pelotones. Las hifas de crecimiento rápido están listas a los 2-3 días. Para hongos que crecen lento son 7-10 días.

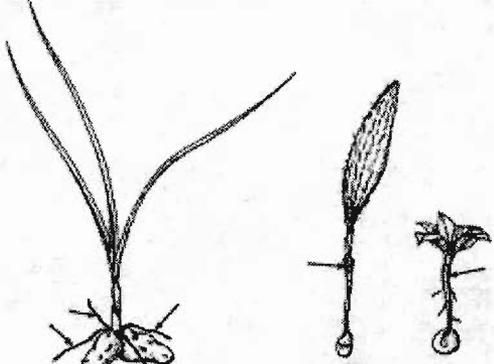
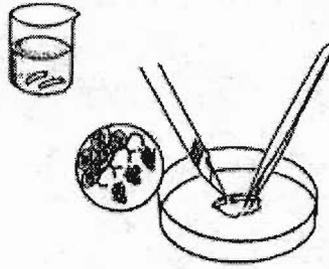
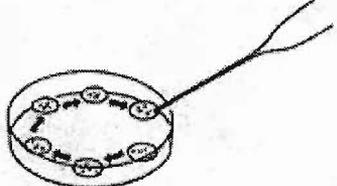
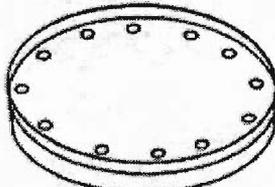
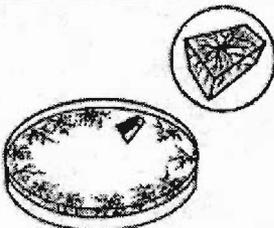
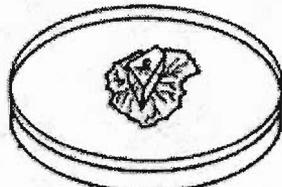
La contaminación con bacterias se puede evitar con antibióticos tales como estreptomycin sulfato.

D. Almacenamiento del cultivo

Para periodos cortos las placas se pueden almacenar en FIM, PDA u otros. Sin embargo subcultivos repetidos del aislado pueden reducir su capacidad para germinar semillas.

Los hongos se pueden almacenar a largo plazo en nitrógeno líquido.

Figura 5.1. Panorama del aislamiento de hongos.

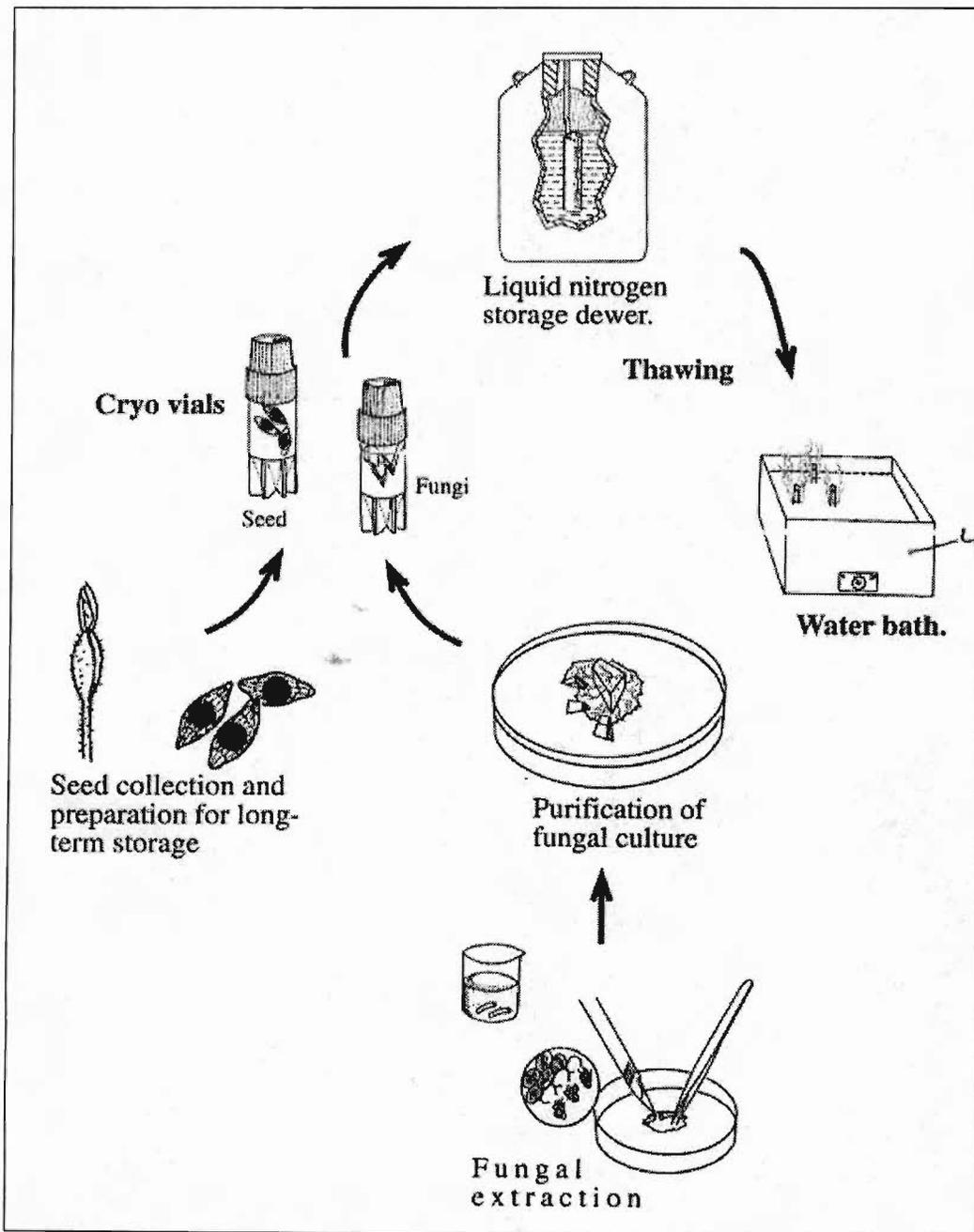
Fase	Procedimiento	Diagrama
Recolección de plantas	La recolección del material de plantas que contiene los hongos es diferente dependiendo del hábito de las especies objetivo. El tejido infectado es típicamente parecido dentro de la misma especie.	
Lavando el material	Para remover los contaminantes de la superficie se enjuaga el material bajo agua de la llave para remover el suelo. EL enjuague con agua esterilizada o utilizando un agente esterilizante reducirá aún más los contaminantes. Los pelotones se extraen en una cámara de flujo laminar.	
Enjuagando los pelotones	Después que los pelotones han sido disectados desde las células son enjuagados en agua estéril aproximadamente 6 veces. Los pelotones pueden ser transferidos por el agua de enjuague utilizando una pipeta fina.	
Plantando los pelotones	Los pelotones individuales pueden ser transferidos luego a FIM y ser incubados a 18° a 22° C.	
Subcultivando los aislados	Luego de 2 a 10 días es posible observar hifas creciendo desde los pelotones. Al subcultivar en esta etapa se obtienen aislados puros.	
	Los hongos aislados se pueden mantener en PDA, agar avena o FIM. Se debe monitorear regularmente para evitar infestación con arañita del polvo (<i>dust mite</i>).	

CAPÍTULO 6. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEA Y HONGOS

(Traducido por Ximena Calderón Baltierra, Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Universidad de Talca).

Se presenta un método utilizado corrientemente en el Kings Park para criopreservar orquídeas terrestres y hongos asociados. Es recomendable que para las pruebas de nuevos *taxa* se realice previamente una prueba de almacenamiento de lotes de semillas enteras en nitrógeno líquido (figura 6.1).

Figura 6.1. Esquema general de la criopreservación.



Debido al escaso contenido de agua de ambos el método de criopreservación es muy simple. Consiste en sumergir directamente las semillas y los hongos en nitrógeno líquido sin recurrir al uso de agentes crioprotectores. Para reanudar el crecimiento después de un almacenamiento indefinido se pasan las muestras por un baño maría de 4° C y luego se ponen en sus respectivos medios de cultivo.

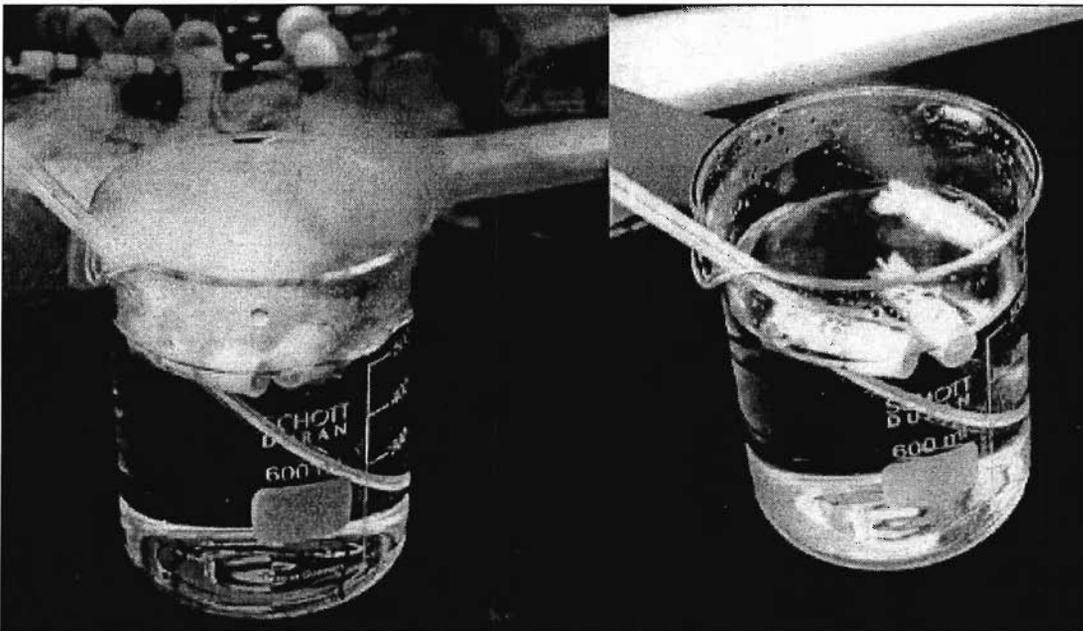
Criopreservación de hongos micorrizas.

1. Seleccione los cultivos que están en crecimiento en medio de ¼ PDA (Potato Dextrose Agar).
2. Prepare y esterilice recipiente de almacenaje.
3. Ubique varios bloques (cinco) de 3 mm³ de inóculo en cada recipiente de criopreservación.
4. Asegure las tapas fuertemente.
5. Sumerja en nitrógeno líquido.
6. Complete los registros e incorpore los datos a las bases de datos

Para sacar del nitrógeno líquido:

1. Saque los recipientes desde el almacenaje y rápidamente descongélelos en un baño de agua a 40° C por 2-3 minutos (figura 5.2).
2. Saque bloques de agar y traspáseles a medio de aislación de hongos.
3. Monitoree los cultivos para signos de crecimiento o contaminación

Figura 5.2. Descongelamiento de dos recipientes que contiene hongo micorrizas en baño de agua a 40° C.



Criopreservación de semillas de orquídeas.

1. Recolecte las semillas y elimine cualquier resto de cápsula o de planta.
2. Seque la semilla en sílica gel por 24 horas.
3. Ponga las semillas en un recipiente de criopreservación de 2 ml.
4. Ponga etiqueta a cada recipiente con un código apropiado.
5. Sumerja en nitrógeno líquido.

Para sacar del nitrógeno líquido:

1. Descongele rápido las semillas en baño de agua a 40° C.
2. Siembre las semillas con métodos disponibles.

CAPÍTULO 7. TECNICAS DE MICROSCOPIA.

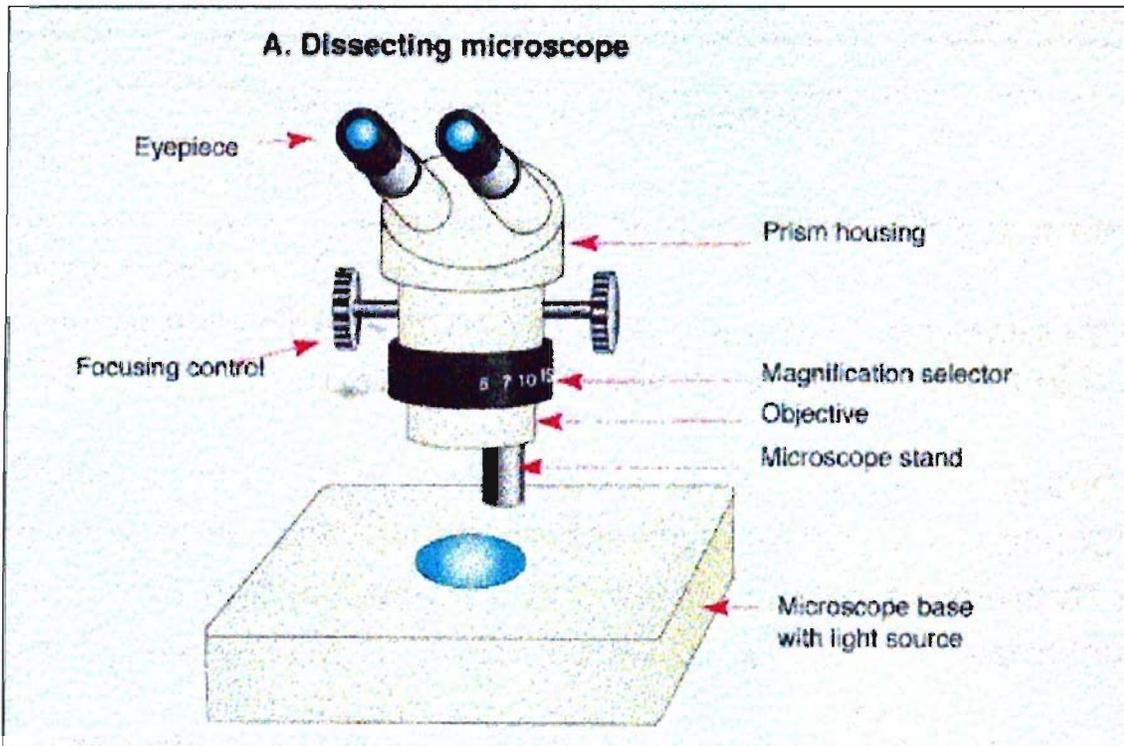
(Traducido por Ximena Alvarez Gerding, Biotecnología Agropecuaria S.A.)

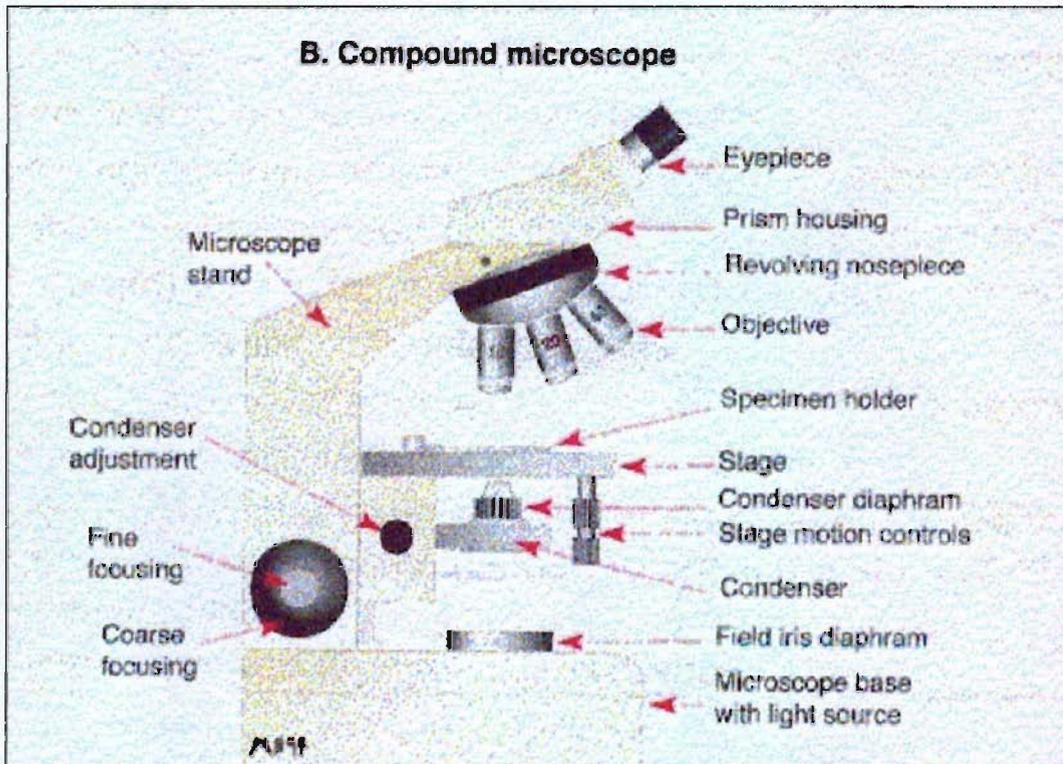
7.1. Uso y cuidado del microscopio.

Este capítulo contiene información sobre métodos comúnmente utilizado para tomar muestras a las raíces y para examinar las asociaciones micorríticas. Una breve introducción en el uso del microscopio es explicada a continuación.

1. Los microscopios deben permanecer en áreas separadas de los lugares donde se preparan las muestras para minimizar la exposición a polvo y líquidos. Es recomendable contar con plataformas plásticas transparentes para proteger la base del microscopio de las muestras líquidas. Todas las partes del microscopio deben quedar protegidas del polvo y ser limpiadas cuidadosamente cuando se ensucian.
2. Se debe tener especial cuidado al examinar preparaciones líquidas para evitar el contacto con los objetivos (lentes). Se debe utilizar aceite de inmersión con sumo cuidado para evitar el daño a los objetivos. Los lentes objetivos se pueden dañar fácilmente por medio de abrasión.
3. El condensador del microscopio se debe ser ajustado cuidadosamente para que el tipo de iluminación sea uniforme y suficiente mente brillante (iluminación Kohler). Eleve el condensador hasta que la imagen del iris del diafragma este en foco, centre la imagen y abra el iris más allá del campo visual del objetivo.

Figura 7.1. Microscopio: A. Microscopio de disección; B. Microscopio compuesto.





7.2. Limpieza y tinción de las micorrizas de las raíces.

Las asociaciones micorríticas no son visibles cuando se observan las raíces frescas debido a que las estructuras internas son oscurecidas por los pigmentos naturales y las células las contienen su interior. El proceso de limpieza utiliza una solución KOH caliente para remover el contenido de las células y los pigmentos de la pared celular. Las estructuras fúngicas se revelan por medio del uso de tinturas que se unen a las hifas de los hongos como el Trypan blue o el Chlorazol Black E en lactoglycerol (Philips and Hayman, 1970; Brundett et al., 1984).

Medidas de precaución.

1. Para limpiar las raíces se utiliza una solución al 10% w/v KOH. Se debe tener especial cuidado de evitar el contacto con la piel ya que es un compuesto químico cáustico. Se debe utilizar guantes, anteojos, etc.
2. Las tinciones Chlorazol black E y Trypan blue son sospechosas de ser carcinogénicas, tal como lo son otros pigmentos biológicos (Coombes and Haveland Smith, 1982). Utilizar guantes para proteger las manos cuando se utilicen estas soluciones y tener precaución de evitar respirar polvo o que ingrese a los ojos cuando se esté manipulando la tinción en polvo.
3. Los preservantes basados en formalina son dañinos para la salud. La preservación de las muestras de plantas con un 50% de etanol funciona tan bien y es mucho más segura.
4. Remitirse a la información de las tablas de seguridad de los químicos que utilice.

Equipamiento y reactivos requeridos.

- Etanol al 50% (v/v) para preservar raíces.
- KOH al 10% (w/v hidróxido de potasio) disuelto en agua. Esta solución genera una reacción exotérmica- utilice envases resistentes.
- Chlorazol black E (CBE) al 0.03% w/v en lactoglicerol (1:1:1 = ácido láctico: glicerol: agua). Disolver el CBE en agua antes de agregar volúmenes iguales del ácido láctico y glicerol.
- Trypan blue al 0,05% w/v en lactoglicerol (1:1:1 = ácido láctico: glicerol: agua).
- Solución de glicerol al 50% en agua (v/v) para desteñir y almacenar las raíces teñidas.
- Ácido láctico para consumo humano y glicerol son adecuados y pueden comprarse a granel.
- Se puede utilizar autoclave (121° C), baño de agua u horno (60-90° C) para calentar las muestras de raíces para la limpieza y la tinción.
- Material de vidrio resistente la autoclave y tubos para alojar las muestras.
- Malla fina de nylon (+100µm mesh) para evitar la pérdida de raíces al cambiar de una solución a otra.
- Pinzas finas y agujas de disección para transferir las raíces.
- Jarros de plástico con tapas herméticas para almacenar las muestras teñidas en glicerol 50%.
- Platos de plásticos transparentes con inscripciones de parrillas de líneas par medir la colonización.
- pantalla fina (100mm) con malla de nylon para transferir las raíces desde las soluciones.
- Pinzas finas y sondas para manipular las raíces.
- Diapositivas para microscopio, trozos largos de cubreobjetos y *PVLG moutant* (ver más adelante).
- Envases de plástico con tapas de cierre hermético para almacenar muestras.
- Microscopio de disección con transmisión de luz, se recomienda un panel transparente de plástico sobre la base del microscopio para proveer de una plataforma estable y para proteger del derrame de líquidos.
- Microscopio compuesto con un lente reticulado.

A. Material de procesamiento.

Los procesos de limpieza y tinción requieren de muestras de raíces que han sido lavadas y se encuentran libres de suelo.

1. Las muestras de raíces de 1-2 g o más pequeñas se sumergen en una solución de KOH al 10%, teniendo la precaución de evitar el contacto con el material corrosivo. Es imperativo que los volúmenes de KOH o la solución de tinción sean suficientes para la cantidad de material de raíces a ser procesado y que las raíces no estén todas agrupadas y apretadas juntas. Es mejor cortar las raíces en segmentos de 2-4 cm de largo antes de limpiarlas o subdividir los grandes volúmenes de raíces.
2. El uso del autoclave utilizando ciclos líquidos de 15-20 min a 121° C es eficiente para limpiar/despejar la mayoría de la raíces. Las muestras que contengan raíces viejas, raíces con altos compuestos fenólicos o raíces colectadas del campo normalmente requieren de períodos más prolongados (25-60 min). Las muestras debe estar en contenedores resistentes al autoclave y estar rellenos a menos de 1/3 de su capacidad, de otro modo pueden derramar en el autoclave. Contenedores amplios se trabaja mejor que en tubos altos y angostos.

3. Las raíces también pueden ser limpiadas al calentar KOH en un baño maría a 60-90° C. Puede que se requieran períodos más largos (desde 5 horas hasta varios días).
4. Las muestras limpias son dispuestas en tubos fino y enjuagadas con agua antes de ser transferidas a la solución de tinción.
5. Las muestras limpias son teñidas con CBE y Trypan blue en un solución de lactoglicerol (Brundett et al., 1984; Bevege, 1968; Philips and Hayman, 1970).
6. Las muestras son teñidas por medio del calentamiento por varias horas a 90° C o al dejarlas en la solución por varios días. La solución de tinción puede ser reutilizadas varias veces si es filtrada a través de una cheesecloth plegada o una malla de nylon de 50 μ m mesh después de cada uso (para remover los fragmentos de raíces). Cuando la solución se torna muy translúcida es que está demasiado débil para seguir utilizándola.
7. Un tratamiento de blanqueado (bleaching) con peróxido de hidrógeno alcalino (0.5% NH₄OH y 0.5% H₂O₂ v/v en agua) remueve efectivamente el exceso de pigmento (Bevege, 1968; Kormanik and McGraw, 1982).
8. Las muestras deben ser desteñidas con glicerol al 50% (para CBE) o lactoglicerol (para Trypan blue) por varios días previo a la observación, para permitir que el exceso de tintura drene desde las raíces.
9. Las raíces teñidas con CBE pueden ser almacenadas en glicerol al 50%, pero la tinción del Trypan blue es menos permanente, a no ser que las muestras sean guardadas en lactiglicerol o en la solución de tinción.
10. Los portaobjetos semi-permanentes de las raíces teñidas puede hacerse **con PVLG moutant (ver más adelante)**.
11. El microscopio de Interferencia –contraste aumenta sustancialmente el contraste entre las estructuras fúngicas teñidas al tomar fotografías.
12. Los procesos de tinción que miden la actividad de la succinato deshidrogenasa puede ser utilizada para confirmar las hifas de los hongos micorríticos las cuales son enumeradas son metabólicamente activos (Schaffer et al., 1993; Tisserant et al., 1993).
13. Las modificaciones al estándar de limpieza y procedimientos han sido propuestos por razones de seguridad. Grace and Stribey (1991) sugieren sugieren que el metil blue o anilina azul, pueden ser utilizados como reemplazos menos tóxicos por CBE o Trypan blue. Como sea, no existe suficiente evidencia para confirmar que esos pigmentos son no-tóxicos, por lo que deben ser manipulados cuidadosamente. Una concentración menor de KOH (2.5%) puede ser utilizada para disminuir el riesgo de daños (Koske & Gemma, 1989).
14. Se puede utilizar el pigmento **ácido fucsínico** en combinación con un microscopio de fluorescencia para teñir las estructuras fungosas de las raíces (Meryweather & Fitter, 1991).

PVLG mountant (Koske & Tessier, 1983)	
Polivinil alcohol	8.33 g
Agua destilada	50 ml
Ácido láctico	50 ml
Glicerina	5 ml

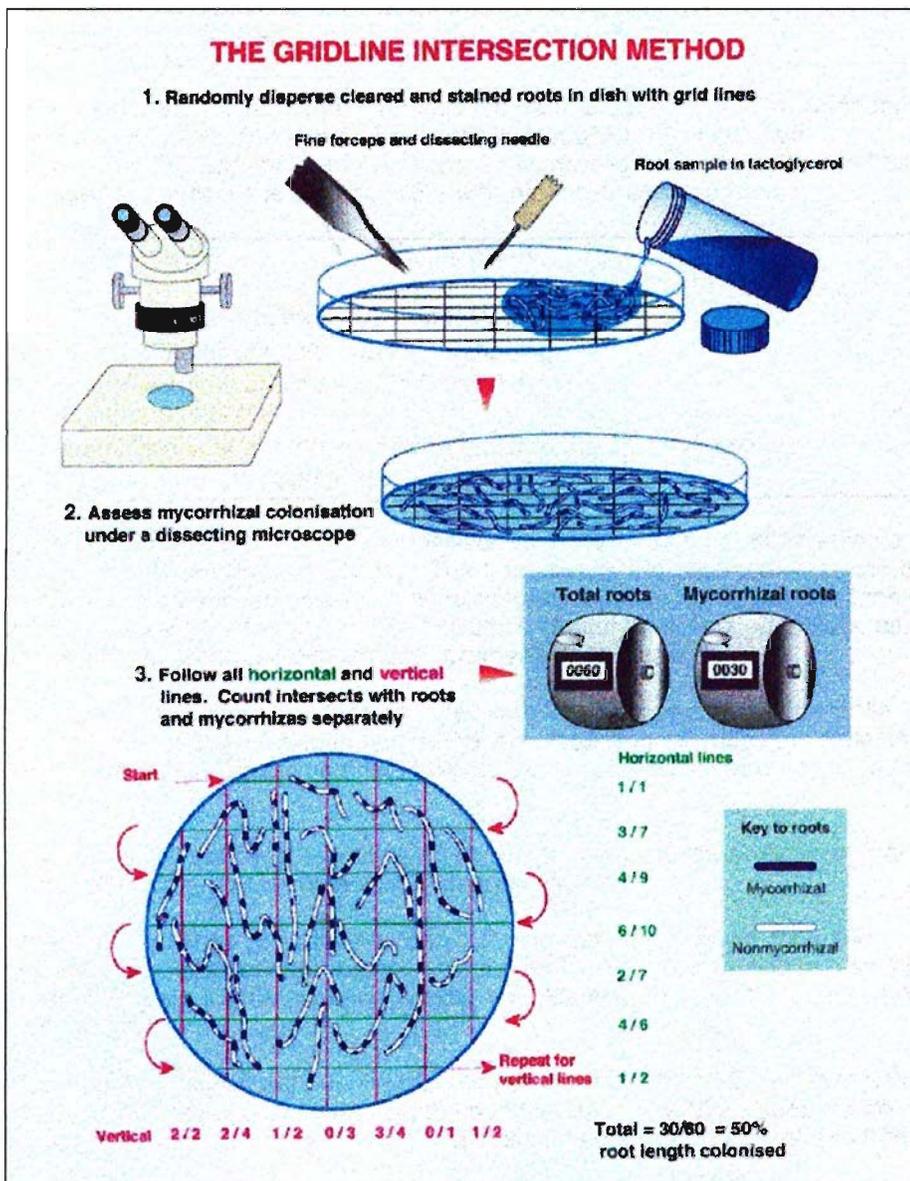
- 24-32 centropose viscosidad del polivinil alcohol es disuelta en agua por medio del calentamiento (90° C) durante toda la noche

B. Evaluando la colonización por el hongo micorrítico.

El método más frecuente para medir la colonización de las raíces y los hongos es el método de la intersección de líneas de la parrilla (Newman, 1966; Giovannetti & Mosse, 1980).

1. Las muestras dispersas aleatoriamente en una placa de Petri de 9 cm de diámetro con parrilla de líneas (ver figura 7.2). la muestra dispersa es escaneada a través de las líneas de las parrilla utilizando un microscopio de disección para cuantificar los segmentos de material vegetal que se designan como colonizado o no-micorrizado.
2. Los segmentos asignados como micorrizados son seleccionados al azar también deberían ser montados en porta objetos y ser observados en el microscopio compuesto.

Figura 7.2. El método de intersección de parrilla (*gridline intersection method*).



7.3. Seccionando el material vegetal fresco.

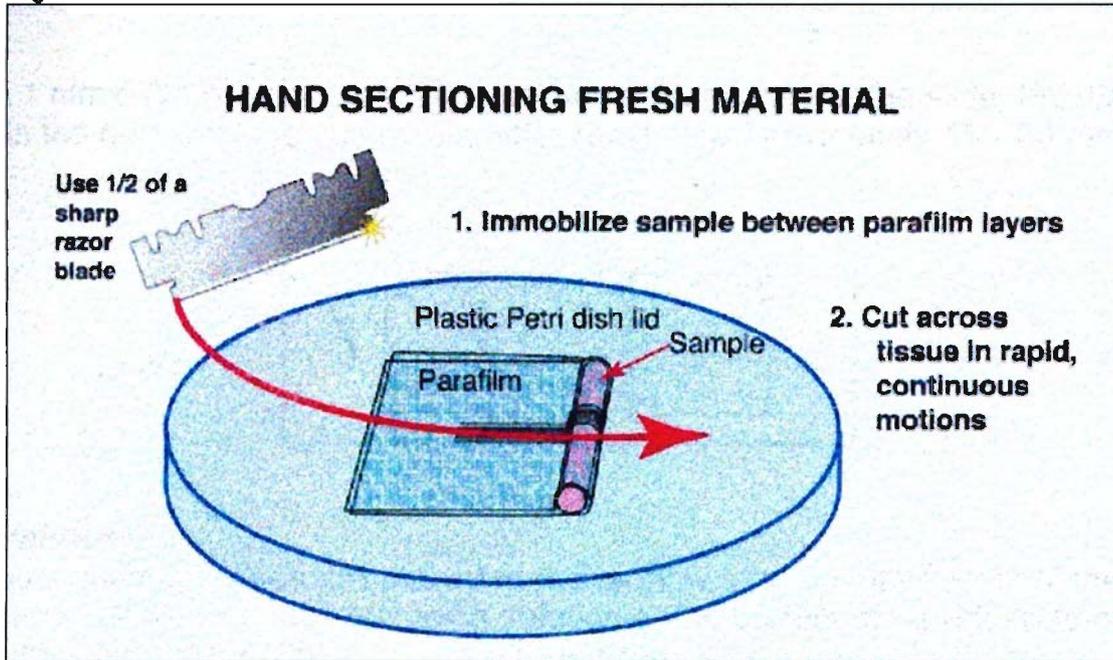
Las observaciones del material vegetal fresco revelan la pigmentación natural, o refringencia se las secciones de raíces a se obtienen aún más detalles por medio de la inducción-UV de autofluorescencia de los segmentos semi-finos. Este procedimiento funciona mejor con raíces frescas (túrgidas), pero también es posible obtener buenos resultados con raíces preservadas en alcohol.

Equipamiento.

- Hojas de afeitar de dos filos.
- Material para sostener el material vegetal durante los cortes:
 - Pedazos cuadrados de Parafilm TM y tapas de discos Petri.
 - Trozos de plumavit o corteza.
- Agujas de disección, pinzas pequeñas o cepillo para pintar para manipular las secciones.
- Tinciones, secciones, portaobjetos, cubreobjetos, etc.

1. Las secciones cruzadas que quedan inmovilizadas por el *Parafilm* pueden ser realizadas utilizando una hoja de afeitar afilada (Frohlichm 1984). Los mejores resultados se han obtenido cuando se utiliza una hoja se sumerge repetidamente en un grupo de raíces para producir una serie de segmentos (ver más adelante). Muchos segmentos de grosor variable se generarán en corto tiempo, como es imposible regular el grosor de las secciones.
2. Estas secciones delgadas y uniformes son seleccionadas por medio de una pinza fina o pipeta mientras se observan las secciones flotando en agua bajo un microscopio de disección. Las secciones seleccionadas pueden ser dispuestas en recipientes o ser transferidas entre soluciones mediante una pipeta.
3. Se pueden obtener resultados similares por medio del uso de trozos de plumavit (styrofoam), corteza u otro material similar que inmovilice las raíces durante el proceso de corte.
4. Las secciones cortadas a mano pueden ser limpiadas en la misma manera que las raíces enteras (ver detalle anterior), pero requiere una exposición al KOH caliente más corta. Se disponen las secciones en un recipiente de vidrio pequeño utilizando una pipeta de boca ancha y se lavan con KOH al 10% durante 4-12 horas al 60-90° C.
5. Las secciones son teñidas con Trypan blue o CBE por medio del calentamiento a 60° C durante 2-3 horas, o dejándolas en la tinción por un día. Luego las secciones son enjuagadas con agua después de los pasos de lavado de la tinción, utilizando una pipeta para transferir las soluciones.
6. Las secciones teñidas pueden se montadas en portaobjetos en 50% de glicerina o en un agua semi-permanente basada en un medio como PVLAGE (sección 7.2).

Figura 7.3. Corte del material fresco.



7.4. Tinción histoquímica.

Sólo unos pocos de los muchos métodos son presentados aquí. Mayores antecedentes están disponibles en las referencias de microtécnicas botánicas estándar e histológicas como los de O'Brien & McCully (1981) y Brundett et al. (1994).

A. Tinción vital.

Las secciones cortadas a mano pueden ser dispuestas en un recipiente que contenga una malla mesh en su base (Brundett et al., 1988), el cual puede ser utilizado para los siguientes procedimientos de tinción.

La tinción vital *fluorescein diacetate* puede ser utilizada para indicar la presencia de hifas y esporas vivas bajo la luz ultravioleta con un microscopio de fluorescencia (Schubert et al., 1987; Hamel et al., 1990). El material es dispuesto en una solución de agua al 50 ug/ml (w/v) o buffer (hecho por medio de la disolución de 5 mg de FDA en 1 ml de acetona).

B. Tinción nuclear.

Tinción de fluorescencia del núcleo y septos.

Soluciones de tinción

Prepare una solución stock por medio de la adición de 10 mg de Hoescht Dye a 25 ml de agua destilada y caliente baño maría a 37° C hasta disolver. Almacene a 4° C.

Las soluciones buffer al pH correcto (7,8) se prepara con 0,1M de KH₂PO₄ y 0,1M de NaOH y al pH 10,5 con 0,025M de H₃BO₃ y 0,1M de NaOH.

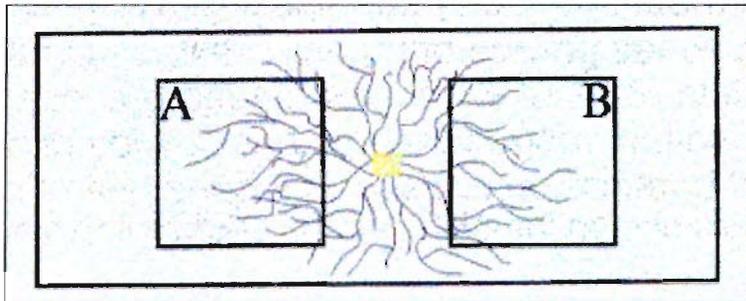
Los tintes se prepara agregando 0,6 ml de la solución stock de tinción a 50 ml de las soluciones buffer.

Preparación del portaobjeto

Sumergir los portaobjetos de vidrio en PDA (Potato Dextrosa Agar) y dispóngalos en una barra e vidrio en un disco Petri de 90 mm que contenga papel filtro esterilizado humedecido con agua destilada estéril.

Ubique cubo 1 mm de agar que contenga micelio en el centro del portaobjeto. Incube los discos de Petri en oscuridad hasta que el diámetro de la colonia alcance los 15-20 mm aproximadamente.

Figura 7.4. Portaobjetos con colonias de micorrizas.



Tinción en el portaobjetos.

Después de la incubación, los portaobjetos se disponen en la corriente de una cámara de flujo laminar hasta que la superficie del agar se seque. A cada lado de la colonia se le agrega una gota de la solución de tinción al pH correcto y se cubre con cubreobjetos sobre las gotitas.

Los portaobjetos se observan bajo un microscopio de fluorescencia, donde se puede observar los núcleos y las septas teñidas.

Otro método de tinción.

La tinción nuclear florescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 5 mg/ml p/v en agua o buffer) tiñe efectivamente el núcleo del hongo micorrítico (Cooke et al, 1987; Balestrini et al., 1992).

C. Tinción de viabilidad de semillas.

La tintura química más comúnmente utilizada para determinar la viabilidad de las semillas de orquídeas es el *triphenyltetrazolium chloride* (TTC) o *fluorescein diacetate*. Estos tests son particularmente útiles si se está permanentemente almacenando y sembrando semillas a través de los años. Por ejemplo, el porcentaje de embriones teñidos (utilizando el test TTC) en semillas de *Liparis* almacenadas por 5 años baja de 70% a 30%, con la consecuente disminución en la tasa germinación. Otra ventaja radica en su uso en semillas que no han germinado para determinar si el problema es de la semilla, o, si su viabilidad es alta, se deben considerar nuevas técnicas de germinación.

El procedimiento de tinción mediante TTC, desarrollado por Lakon (1949) es uno de los experimentos bioquímicos más ampliamente utilizados para evaluar la viabilidad de las semillas. Comparado con los ensayos de germinación directos, esta prueba tiene la ventaja de ser rápida y de ser apropiada para condiciones de control. Este ha sido utilizado exitosamente en orquídeas epifíticas tropicales (Singh, 1981) y Van Waes Debergh (1986) adaptó este ensayo a varias

orquídeas terrestres de Europa occidental. Ensayos realizados por Lauzer et al. (1994) en *Cypripedium* indican que la germinación de las semillas maduras fue significativamente inferior que el porcentaje de embriones teñidos con TTC. De cualquier modo, en nuestra experiencia, la tinción con TTC puede arrojar una estimación gruesa de la germinación y es una guía útil, especialmente en las semillas almacenadas por largo tiempo, y para saber si la semilla está mal sembrada.

Las cubiertas de las semillas de climas templados requieren un pre-tratamiento con una solución de CaOCl (ver más adelante en esterilizantes) para ser teñidas con el TTC. Es necesaria una inmersión en agua esterilizada por 24 horas después del pre-tratamiento con hipoclorito para remover el hipoclorito que puede entorpecer la reducción del TTC en embriones viables.

Preparación de la solución de CaOCl

Para una solución al 5% peso por volumen.

En una cámara de vapor, vistiendo una máscara de protección, guantes y protección para los ojos, pese 5 g de hipoclorito de calcio en polvo en un vaso precipitado pequeña de plástico. Aún en el cámara de vapor, agregue un poco de 100 ml de agua al polvo y mezcle todo utilizando un mortero (el CaOCl es difícil de disolver).

Revuelva en el resto del agua y con 1 ml de **Tween-80** (1% v/v). Revolver enérgicamente durante 10 minutos, luego filtrar. Utilizar la solución filtrada inmediatamente.

Preparación de la solución de TTC.

En 100 ml de agua destilada, disolver 1 g de *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride* (TTC). Ajuste el pH a 7 con NaOH 0,1M. Almacene en oscuridad a 20 + 2° C (o en frasco de vidrio color caramelo envuelto en foie a temperatura ambiente). El TTC es tóxico.

Test de viabilidad.

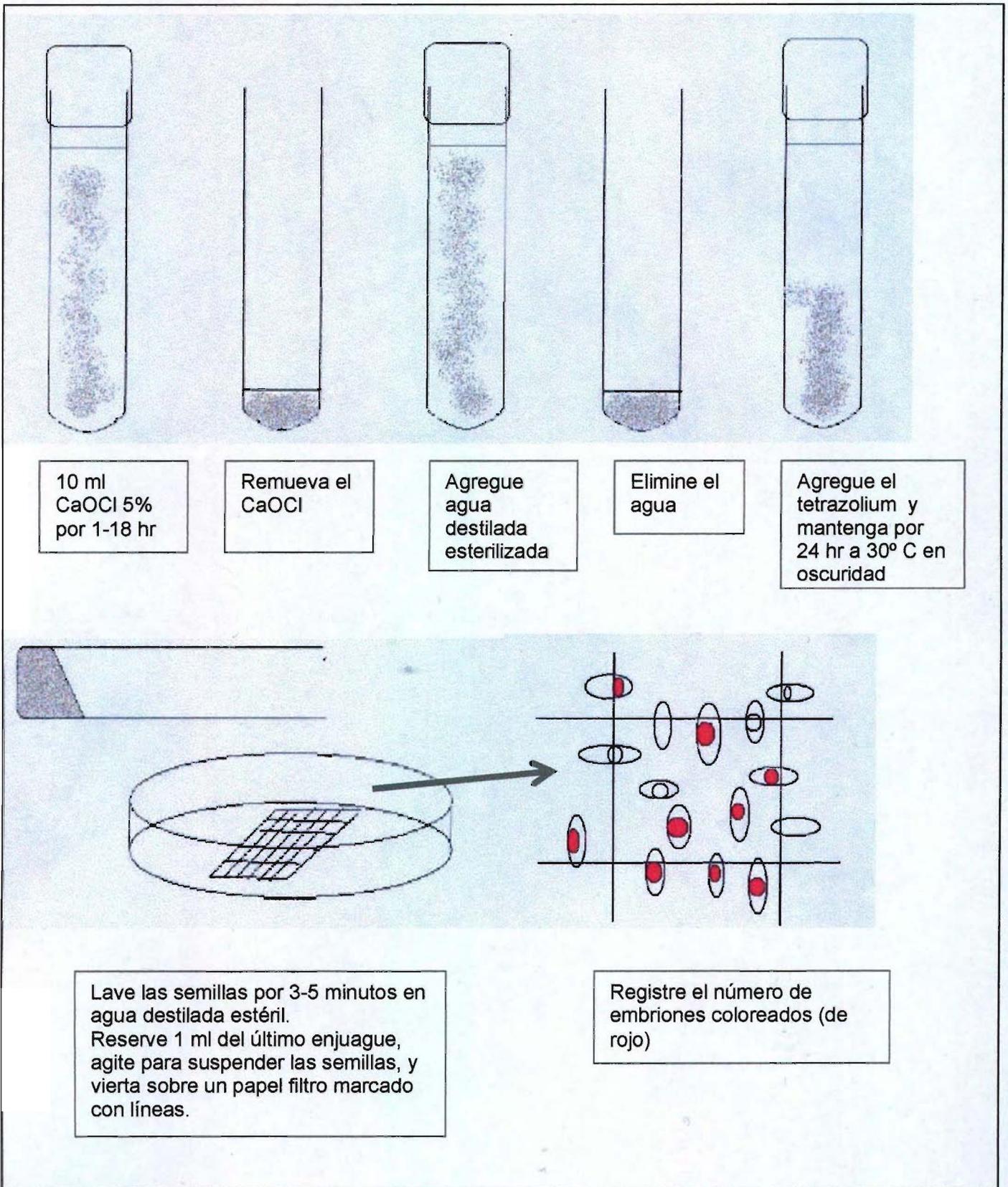
1. Pre-tratar las semillas con CaOCl al 5% p/v + 1% de Tween 80 (v/v). La duración de esta inmersión debe ser determinada para cada especie (figura 7.5).
2. Empapar en agua esterilizada durante 24 horas.
3. Aplicar el test de TTC.
 - En un tubo de ensayo de pyrex con tapa rosca, ponga una pequeña cantidad de semilla en 10 ml de una solución de CaOCl. Batir suavemente por un período apropiado (12-18 horas en *Cypripedium*, 45-60 minutos en *Spiranthes*, 3-8 horas para la mayoría de los géneros).
 - Probablemente las semillas se depositarán en la base a medida que el aire de la testa sea reemplazada por líquido.
 - Con una pipeta extraiga la solución de blanqueado (cloro) y reemplácela por agua esterilizada. Cambie el agua al menos dos veces y luego deje las semillas en agua por un mínimo de 24 horas.
 - Con una pipeta extraiga el agua y reemplácela por 10 ml de solución de TTC al 1%. Disponga los tubos en oscuridad a 30° C por 24 horas (en Kew se utiliza un baño de agua cubierto, pero se puede utilizar una incubadora).

- Con una pipeta extraiga la solución de TTC y lave las semillas 3 veces durante 5 minutos cada una con agua destilada esterilizada.
- Opcionalmente, se puede aplicar una solución de verde de malaquita al 0,001% durante 5 minutos, especialmente útil donde la testa está muy blanqueada.
- Mediante una pipeta extraiga la mayor parte del agua luego vacíe las semillas en un círculo de papel filtro dividido en 4 partes iguales.
- Enjuague el resto de las semillas con una pequeña cantidad de agua y disperse las semillas en forma pareja sobre la superficie.
- Utilizando un microscopio, registre lo siguiente:

<ul style="list-style-type: none"> • número total de semillas
<ul style="list-style-type: none"> • número total de semillas que tienen embrión
<ul style="list-style-type: none"> • número de embriones teñidos de rojo

- Calcule el % de viabilidad: $[\text{N}^\circ \text{ embriones teñidos rojos} / \text{N}^\circ \text{ total semillas}] * 100$.
- Determinar la media y la desviación estándar de 4 repeticiones.
- Marcar el papel filtro con líneas como grilla y el uso de un contador ayudará facilitando el registro.

Figura 7.5. Test de viabilidad de tetrazolium.



7.5 Microscopia avanzada.

a. SEM

Preparación del material para el punto crítico de deshidratación y SEM.

1. Fijación y filtración al vacío.

- a) Corte el tejido en fresco (cubo no > 2 cm) en gluteraldehído al 2,5-5% en un buffer de pH 7.0 de fosfato 0,05M.
- b) Traslade los especímenes dentro de frascos que contengan el fijador y tarjeta de identificación (escrita con lápiz).
- c) Filtre al vacío por 3-5 minutos y déjelas en fijador por 24 horas o más si es necesario.

2. Deshidratación

- a) Reemplace el fijador en el frasco por un buffer por 30 minutos. Enseguida reemplace el buffer con un buffer fresco por otros 30 minutos.
- b) Reemplace el buffer con acetona al 50% por 24 horas o más.
- c) Reemplace el acetona 50% con acetona al 75% por 24 horas o más.
- d) Reemplace el acetona 75% con acetona al 90% por 24 horas o más.
- e) Reemplace el acetona 90% con acetona al 95% por 24 horas o más.
- f) Reemplace el acetona 95% con acetona al 100% por 24 horas o más.
- g) Reemplace el acetona 100% con acetona fresca al 100% por 24 horas o más.

Se puede dejar el espécimen en este estado para almacenaje hasta que se esté listo para realizar la tinción de punto crítico, pero se debe tener cuidado de que el acetona no se seque.

3. Secado de punto crítico y examen SEM.

- a) Los especímenes debe sufrir un secado de punto crítico previo a ser montada con cinta de carbón y cubiertas con coberturas Au + C.
- b) Los especímenes cubiertos de observan con el Microscopio Philips 505 Scanning Microscope.

b. Programa de procesamiento/imbibición para GMA

Preparación del material para imbibición en GMA.

Procedimiento	Protocolo	Duración
Fixative ^{1, a}	Agregar pequeñas trozos de material al fixative	1 hora a 1 semana
Lavado buffer ²	2 veces	15 min
Methoxyethanol	2 veces	12 hr
Etanol	2 veces	12 hr
Propan-1-ol	2 veces	12 hr
Butan-1-ol	2 veces	12 hr
GMA ^a	1 vez	24 hr
GMA ^a	Transferir a bandeja de aluminio	24 hr
Calentar a 60° C para curar	Transferir a macetas en horno, remover aire, agregar Argon	24 hr

Nota:

1. Fijador: 2,5% glutaraldehyde (pH 6-7) en 0,025M buffer fosfato.
2. Buffer fosfato: 0.05M NaHPO₄·2H₂O (MW 156.01)/0,05M NaHPO₄ (MW 141.96)
3. Filtración al vacío.

La solución de glutaraldehido (fixative) se torna ácida con períodos prolongados sin remoción. Si el pH baja más allá de 3 y el líquido se colorea (color miel) se debe descartar.

Para aumentar el nivel de pH del 25% del glutaraldehido stock, combinar con pequeñas cantidades de carbón activado y filtrar. Pueden ser necesarias varias aplicaciones de carbón.

Notas de resina GMA

- GMA purificado (resina)
- Caboxax 2000/PEG200 (*plasticiser*)
- Benzoyl peroxido (catalizador)

Mezcle los ingredientes todos juntos después de seguir las notas (i) y (ii).

Revuelva 1-2 hr a temperatura ambiente, no calentar. Polimerice a 60° C bajo condiciones anaeróbicas.

Notas:

- (i) El GMA debe estar lo más cercano posible al pH 7. Desde la botella viene a pH 3. Para ajustar el pH, mezcle con carbón activado (4 g por 100 ml) y revuelva durante 1-2 hr. Filtre a través de un filtro Whatman N°.1. Mientras más ácido esté el GMA, más resina tomará cualquier catión de tincura (i.e., *Toluidine blue*).

- (ii) *Benzoyl peroxide* es una sustancia explosiva cuando está seca, por lo tanto, es almacenada en frío con un 25% de agua. Pese la cantidad requerida más un 25% adicional para compensar el peso del agua. ¡NO LO SEQUE!

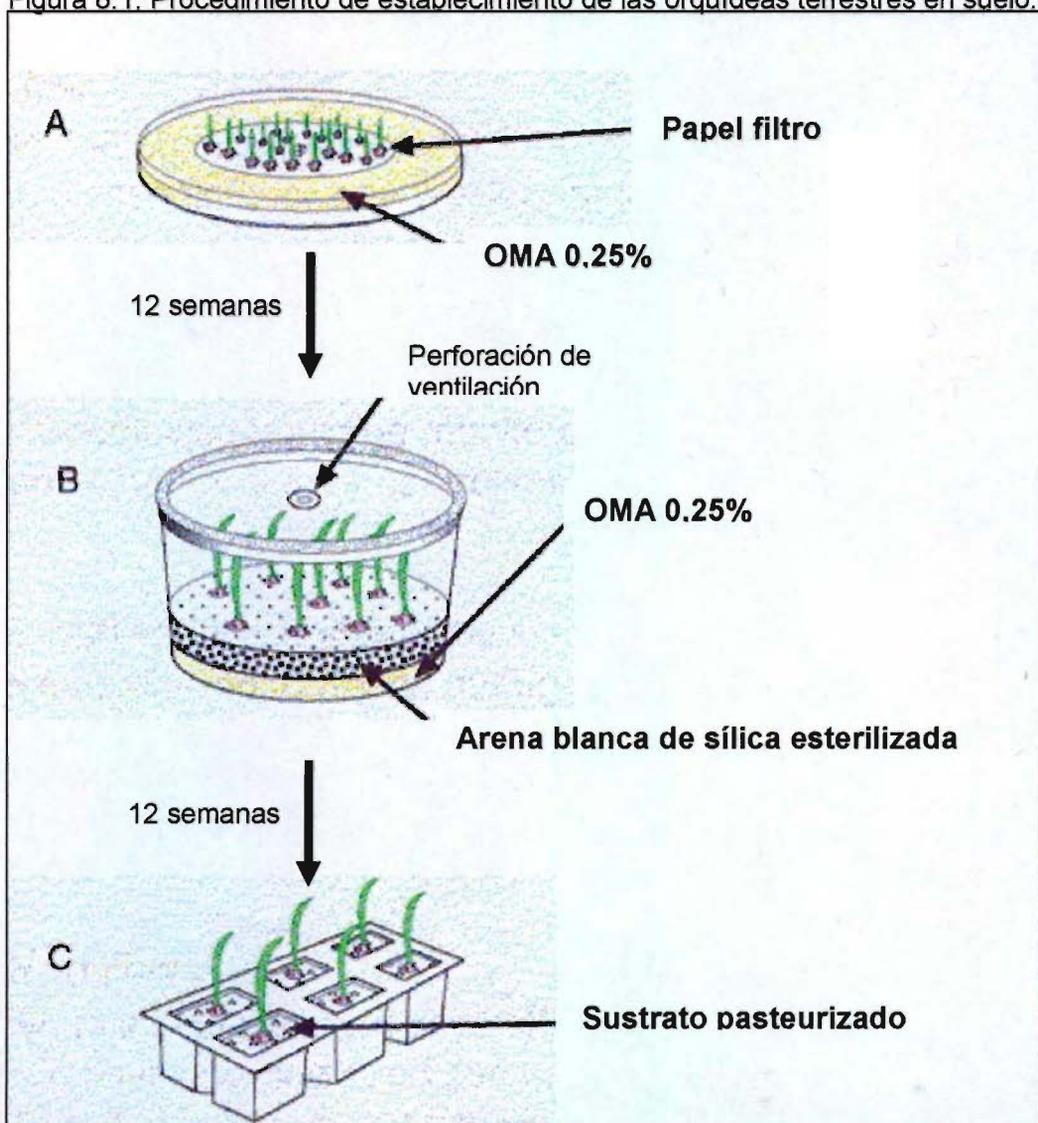
CAPÍTULO 8. PROPAGACIÓN.

(Traducido por Ximena Alvarez Gerding, Biotecnología Agropecuaria S.A.)

Germinación de semillas

Los protocolos de germinación simbiótica utilizando hongos aislados desde *taxa* hospederos que son conocidos por su efectividad en los ensayos, son utilizados para producir protocormos apropiados para la transferencia a suelo/terreno (figura 8.1). Los platos de germinación deben ser iniciados tres meses antes de la llegada de la época de crecimiento de modo que las plántulas estén listas para su transferencia al invernadero durante los meses fríos del año y para coordinar el crecimiento de la plántula con las fases de crecimiento natural.

Figura 8.1. Procedimiento de establecimiento de las orquídeas terrestres en suelo.



A: Germinación simbiótica con el hongo aislado apropiado. B: Capas de arena/agar. C: plántulas simbióticas transferida a sustrato esterilizado en invernadero.

Contenedores de crecimiento

Para transferir los germinantes desde los platos de germinación simbiótica, se utilizan contenedores desechables de policarbonato (60 mm de alto x 100 mm de diámetro). Los protocormos, con un hoja, en los estados 3 y 4 (Ramsay et al., 1986) son transferidos a medios con capas de arena/agar, como se aprecia en la figura 8.1b. A cada contenedor se le agregan aproximadamente 60 ml de agar avena (Oat Meal Agar-OMA) al 0,25% (Clements and Ellyard, 1979) y se les aprieta la tapa previo a ser autoclavados por 20 min a 121° C. Una vez que el OMA se ha solidificado, una capa de 10 mm doblemente esterilizada (20 min a 121° C; dejar descansar por 24 hr, y luego 20 min a 121° C otra vez). Sobre el OMA se pone una capa de arena blanca de sílica bajo condiciones estériles.

Se debe permitir que la humedad del OMA se traspase a la arena antes del trasplante. La ventilación de los recipientes se permite a través de un disco con miliporos sobre una perforación de 6 mm en la tapa. Los contenedores con las plántulas son incubados a 22° C en régimen de fotoperíodo de 16 / 8 luz / oscuridad.

Inoculación de los contenedores.

Plántulas simbióticas son las que proveen del inóculo del hongo a los contenedores.

Traslocación al suelo.

Luego de incubar las plántulas por 3 meses, los contenedores con las plántulas pueden ser trasladados a un invernadero por una semana antes de remover la tapa. Para un endurecimiento, las plántulas se mantienen por 5 días más (sin tapa) antes de ser transferidas al suelo. Las plántulas se plantan en bandejas de plástico para almácigos con contenedores de 35 x 30 x 50 mm (figura 8.1c) y se cubren con una cúpula plástica transparente (Yates^R cubierta húmeda) con una ventilación variable provista por 6 perforación de 2 cm de diámetro. Las cubiertas se pueden remover pasados 10 días manteniendo las ventilaciones cerradas por los 3 primeros días. Las plántulas deben ser monitoreadas para las plagas comunes de invernadero como larvas de mosca (ver capítulo 9.3 para medidas de control).

La mezcla de suelo así como los almácigos deben ser sincronizados con las condiciones naturales imperantes afuera del invernadero y permitir que se seque durante la estación seca. El desarrollo de tubérculos puede lograrse en esta etapa. El riego se comienza con la primera lluvia de la temporada. La sobrevivencia de los tubérculos se confirma con la emergencia de la primera hoja.

Siembra de semilla in situ.

La semilla se siembra en sitios inoculados después de la llegada de la estación y la aparición de las condiciones frías. Para apoyar la siembra de la semilla, ésta puede ser minuciosamente mezclada con 80 g de arena de sílica blanca y dispersarla en forma pareja en la superficie del suelo. El *mulch* se mantiene húmedo por medio del riego con agua de lluvia. Estos métodos también pueden ser aplicados en el invernadero o en sitios de arbustos silvestres. Aunque las plántulas desarrollaron y produjeron tubérculos, la mayoría de las plántulas fallaron en su capacidad de sobrevivir a las condiciones del verano seco. La investigación en relación al riego artificial puede mejorar las tasas de establecimiento de las plántulas.

Establecimiento de las plántulas.

Las semillas que germinaron son transferidas a contenedores de crecimiento en el laboratorio antes de ser trasladadas al invernadero como se describió anteriormente (figura 8.1). Las plántulas simbióticas en contenedores son trasladadas 24 semanas después de la siembra y el endurecimiento bajo condiciones de sombra afuera del invernadero por una semana antes de transferirlos en sitios al campo. La plantación debe ser después de llegada la temporada (de lluvias). Si es necesario, las plántulas se riegan con agua de lluvia.

Trasplante a través de transferencia de tubérculos.

Los tubérculos juveniles dormantes de orquídeas terrestres producidos siguiendo la metodología descrita con anterioridad, pueden ser plantados en terreno una vez que la estación fría haya comenzado. Se colocan tres cubos de 3 mm de medio de cultivo OMA que ha sido colonizado por el hongo apropiado, ubicándolos en pequeños orificios (1-2 cm de profundidad) adyacentes a los tubérculos traslocados para que actúen como fuente de inóculo. La perturbación del terreno es mínima ya que en cada sitio, los tubérculos son introducidos utilizando una herramienta pequeña cilíndrica del tamaño aproximado del tubérculo.

CAPÍTULO 9. CRECIMIENTO DE ORQUÍDEAS.

(Traducido por Ximena Alvarez Gerding, Biotecnología Agropecuaria S.A.)

9.1. El invernadero.

Los experimentos en orquídeas realizados en invernaderos permiten estudiar bajo condiciones más controladas que las que se puede tener en un vivero en el campo, la fisiología vegetal, nutrición mineral, asociaciones micorrícicas, y la respuesta de las plantas a factores del medio ambiente. A continuación se lista el equipamiento básico para los experimentos en un invernadero (cuadro 9.1).

Cuadro 9.1. Requisitos para experimentos en invernadero.

<p>Condiciones de crecimiento</p> <ul style="list-style-type: none">• Niveles de luz y ventilación deben ser adecuados• Equipos de calor o enfriamiento pueden ser necesarios• Rejas altas para prevenir contaminación• El agua debe drenar fácil y rápidamente• Es esencial un ambiente de trabajo limpio y sin polvo
<p>Equipamiento</p> <ul style="list-style-type: none">• Macetas limpias y estériles• Mezcla de sustrato apropiada• Sistema para pasteurizar o fumigar la mezclas de sustratos para remover los organismos dañinos• Fertilizantes apropiados• Agua pura, no contaminada• Medidas de control de plagas si es necesario

Sustratos de crecimiento.

Se requieren muestras de suelo de sitios específicos o mezclas adecuadas para macetas. Los microorganismos indeseables deben ser removidos por medio de pasteurización con vapor (2 min a 70° C en días consecutivos), o por otros métodos discutidos más adelante.

Riego de plantas.

Las plantas grandes pueden requerir de riego todos los días para limitar las diferencias de suministro de agua entre tratamientos.

Nutrientes.

Es esencial que los fertilizantes sean aplicados en forma precisa y uniforme a las plantas. Se encuentran disponibles en el mercado mezclas específicas para orquídeas.

Condiciones ambientales.

Se debe monitorear el ambiente par asegurar que la luz y la temperatura sean favorables para el crecimiento de las plantas. Estas condiciones deben ser informadas al momento de publicar los resultados. Al estandarizar las condiciones de crecimiento se aumenta la precisión de los experimentos.

Evaluando de plantas y la cosecha de los experimentos.

La duración óptima de un experimento va a depender de la tasa de crecimiento de las plantas y de los niveles de nutrición del suelo. La medición de la altura puede ser utilizado para evaluar la tendencia de crecimiento y así determinar cuando terminar el experimento. Una vez que el experimento haya terminado, las plantas pueden ser cosechadas por medio del corte de la canopia, la cual es pesada en una balanza para determinar la materia fresca, y después es secada para determinar la materia seca y por medio del lavado de las raíces para que queden libres de restos de suelo.

9.2. El vivero

En los viveros de producción de orquídeas es posible encontrar una gran variedad de prácticas de cultivo. Aquí se describen los requerimientos de las orquídeas terrestres de Western Australia, sin embargo, los principios y temas básicos también son aplicables a las orquídeas epifíticas. Los temas claves para el manejo de las plantas en los viveros incluyen higiene del vivero, la elección y preparación de las mezclas de sustratos para las macetas y el uso de fertilizantes. La composición, pH, humedad y temperatura del medio de enraizamiento, prácticas de fumigación y pasteurización, y el uso de biocidas y fungicidas pueden ser manejadas para proveer de las condiciones que sean óptimas para la producción de plantas.

A. Componentes de las mezclas de sustratos para macetas.

Ningún ingrediente por sí sólo puede proveer de todas las características requeridas para el crecimiento efectivo de las plántulas, por lo que los viveros generalmente combinan varios sustratos que se describen más adelante, para confeccionar una mezcla de sustrato. Estos ingredientes pueden ser mezclados con suelo o arena, pero usualmente son combinados para confeccionar sustratos "sin suelo".

Turba

La turba el componente mayoritario de muchos mezclas de sustrato proveyendo de una plataforma orgánica para el crecimiento de las raíces. Existen muchas variaciones de formulaciones de turba utilizadas por los administradores de viveros a estas incluyen tipo locales, fibra de coco, etc. Sin embargo, la turba tradicional derivada del *sphagnum moss* posee las mejores características físicas y químicas con bajos contenido de nutrientes y pH. Para su uso en contenedores, normalmente se utiliza un 50% de turba con otros componentes como vermiculita y perlita.

Arena o agregados

Estos se utilizan principalmente para ayudar al drenaje y agregar peso a la mezcla y para reducir el encogimiento en las mezclas secas durante la dormancia.

Vermiculita y perlita

Estos componentes relativamente baratos y fácilmente disponibles son agentes de volumen que retienen humedad al tiempo que aseguran un buen drenaje de la mezcla. También ayudan a evitar que el medio de crecimiento se compacte. Ambos son livianos y de pH neutro. La perlita caree de capacidad buffer y es nutricionalmente inerte, mientras que la vermiculita posee una mayor capacidad buffer y puede proveer de Mg y K para el crecimiento de las plántulas (Goh & Haynes, 1977). Estos componentes rara vez se utilizan para nuestras orquídeas terrestres. El crecimiento de algas puede ser un problema con estos ingredientes.

Corteza compostada

Los mejores componentes son la corteza de *Allocasuarina*, ramillas y acículas de pino. La corteza de pino rara vez se usa.

Productos de madera compostados

Las astillas y aserrín de madera fina son utilizadas como un sustituto natural de la turba si ésta se encuentra limitada o prohibitivamente cara. Algunos tipos de madera pueden ser tóxicos para el crecimiento de las raíces, por lo que es esencial realizar test preliminares de estos productos en forma previa a su utilización. Es preferible utilizar productos de la madera envejecidos y leach (i.e. compostados). El ingrediente principal usado en Western Australia es aserrín de Jarrah (*Eucalyptos marginada*) el cual es barato y está fácilmente disponible.

Compost

El compost se elabora combinando material vegetal como paja, productos de madera, residuos de plantas y desechos de animales en una pila, y manteniéndolos en un estado húmedo, que permita una descomposición microbiana parcial (Hoitink, 1980; Hardy & Sivasithamparam, 1989). El producto final es un suelo que parece humus con un contenido alto de nitrógeno con una relación C:N baja, productos de la madera relativamente crudos. El compost tiene una alta capacidad de retención de agua, es liviano y se mezcla bien con arena, suelo, perlita y vermiculita (Liegal & Venator, 1987). Se ha descubierto de las mezclas para macetas basadas en corteza de eucalyptos compostada suprimen patógenos como *Phytophthora spp.* (Hoitnik, 1980; Hardy & Sivasithamparam, 1991). Los principales materiales comportados para las orquídeas terrestres son el aserrín de Jarrah, corteza/ramillas de *Allocasuarina* y acículas de pino. No se utilizan desechos animales.

Mezclas

Se ha utilizado un número de mezclas por un período prolongado de tiempo, sin embargo, estas usualmente se basan en ingredientes orgánicos provistos por ecosistemas naturales los que no son sustentables. Se han probado otros materiales orgánicos e inorgánicos (Nika). Generalmente, las mezclas deben ser abiertas, con buen drenaje y contener materia orgánica beneficiosa para el hongo. En el cuadro 9.2 se entregan algunas mezclas que han sido utilizadas de manera exitosa en orquídeas terrestres de Western Australia.

Cuadro 9.2. Mezclas de sustrato para orquídeas terrestres de Western Australia.

Mezclas	Proporciones
Mezcla 1	
Arena gruesa	4.5 partes
Loam	4.0 partes
Turba	1.5 partes
Mezcla 2	
Arena gruesa	4.0 partes
Loam rico	2.0 partes
Astillas de madera	2.0 partes
Hojas de litre comportadas	2.0 partes
Mezcla 3	
Arena gruesa	2.5 partes
Arena plana de la costa	5.0 partes
Loam	1.0 partes
Turba	1.5 partes

B. Esterilización de las mezclas.

Las mezclas que contienen en una mayor proporción turba, perlita y vermiculita usualmente no requieren esterilización (pasteurización) mientras que las mezclas con aserrín, corteza, humus crudo o suelo deben ser esterilizadas (pasteurizadas) para reducir la amenaza potencial de patógenos y otros microorganismos que podrían limitar el crecimiento del hongo micorrítico en las raíces y eliminar las semillas de malezas. Es Mejor esterilizar (pasteurizar) las mezclas de cuando están tibias y húmedas. La turba, sin embargo, puede ser tratada al vapor cuando está casi seca. El tratamiento de vapor, cuando se lleva a cabo a 70° C por 30 minutos, es preferible porque es no tóxica y esteriliza parcialmente las mezclas, eliminando los microorganismos perjudiciales y las semillas de malezas, mientras que los microbios saprófitos benéficos se mantienen vivos (Baker & Roistacher, 1957). Es importante que se mantenga la mayoría los microorganismos saprófitos. Una meta adicional en los viveros con micorrizas es erradicar las cepas de hongos menos eficientes, como la *Thelephora spp.*, la cual reduce el éxito de los programas controlados de inoculación. Existe una amplia variedad de equipamiento para realizar la pasteurización con vapor, pero éstos pueden resultar de muy alto costo para los viveros de tamaño pequeño.

Temperaturas por sobre los 70° C pueden ser desventajosas en las mezclas que contienen algún tipo de suelo ácido debido a que estos pueden liberan cantidades tóxicas de Mn causando una deficiencia de Fe en plantas en contenedores (Sonneveld, 1979).

Una alternativa más barata al uso del vapor es utilizar la pasteurización solar donde la mezcla húmeda es cubierta con una hoja de polietileno transparente y expuesta al sol directo por un período de tiempo. La temperatura por debajo de la hoja de polietileno puede superar los 60° C durante los meses de verano, pudiendo ser aún mayor en los trópicos.

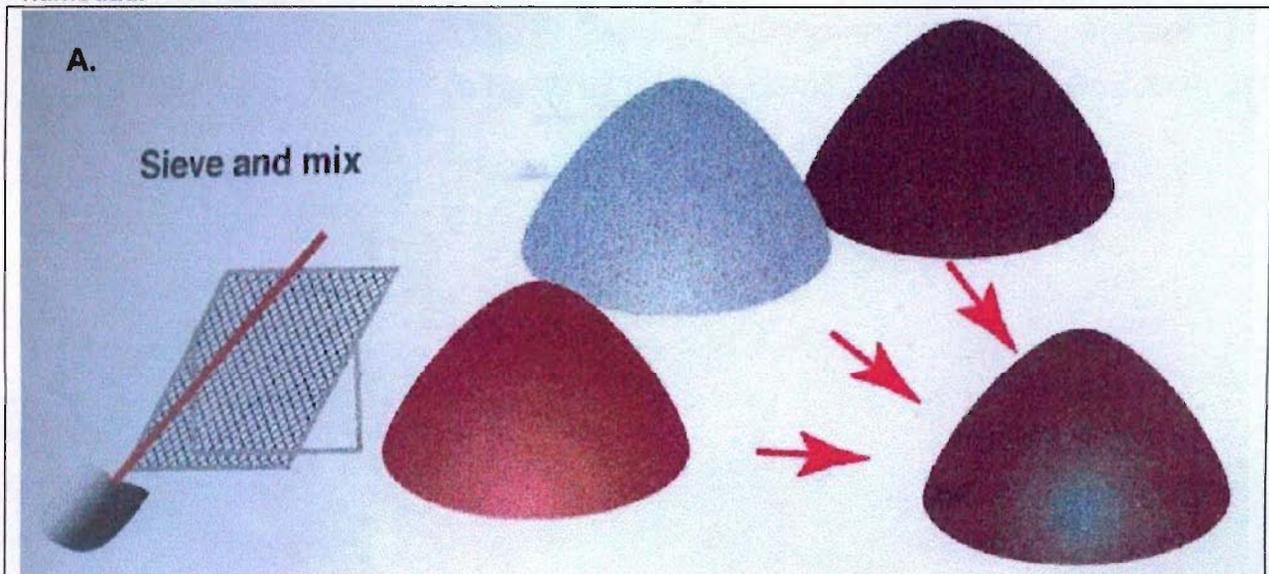
Los resultados de exposiciones repetidas o continuadas a solarización a temperaturas subletales que matarán igual a la mayoría de las plagas, semillas de malezas y patógenos, o los debilitarán de modo que no puedan sobrevivir (Stapleton et al., 1985; Porter & Merriman, 1985). Este método

es recomendable para períodos en que la temperatura del aire es alta para así obtener temperaturas que logren controlar la mayoría de las plagas de las raíces.

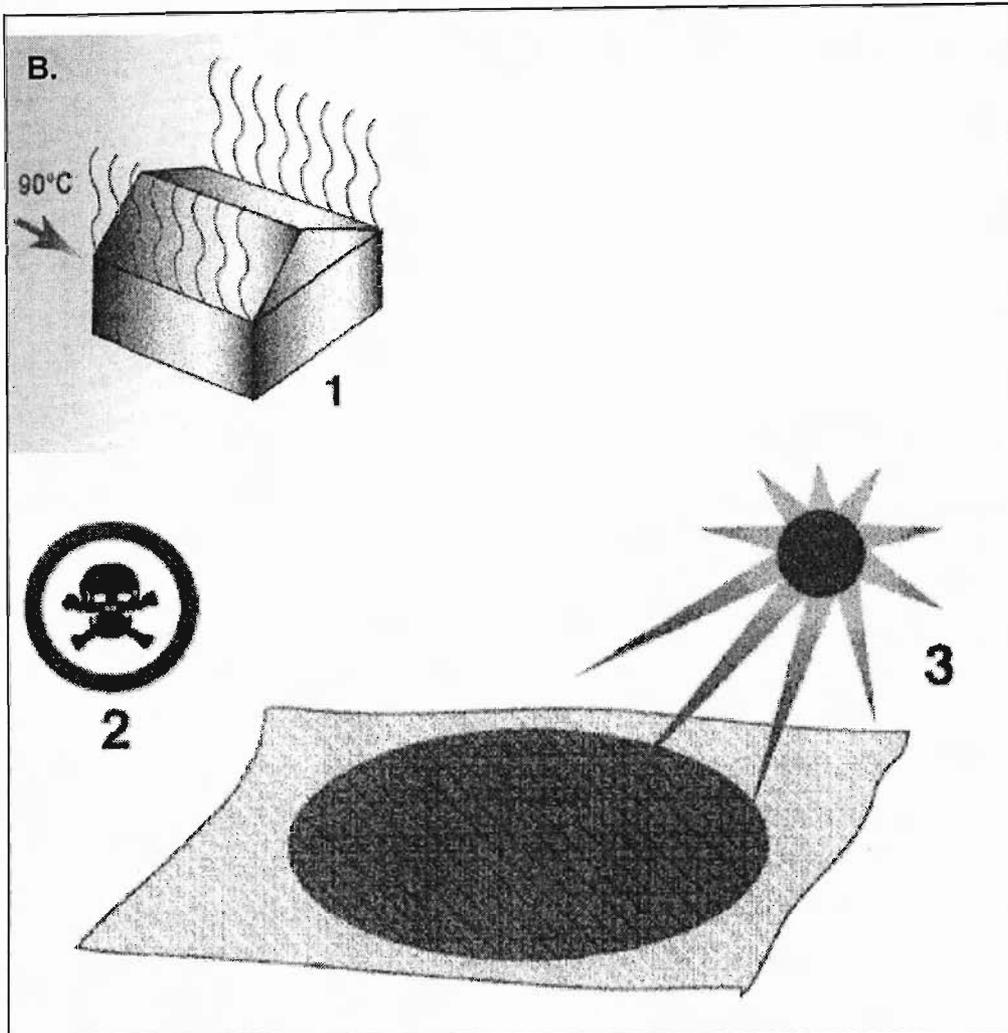
La esterilización química con fumigantes puede ser simple y efectiva, pero se deben seguir las precauciones indicadas en la lata y consejos de la agencia de control local de plagas. El bromuro de metilo es el fumigante más ampliamente utilizado, proveyendo una esterilización efectiva de los suelos. En *Western Australia* sólo operadores con licencia están autorizados para aplicar fumigantes.

Advertencia: Los esterilizantes químicos son materiales altamente riesgosos. Es esencial un cuidado extremo en la manipulación y aplicación de estos químicos y se deben seguir estrictamente las instrucciones indicadas en la etiqueta.

Figura 9.3. Mezclas para macetas. A. Combinación de ingredientes para confeccionar una mezcla de sustrato con valores apropiados de pH, nivel nutricional, drenaje y capacidad de retención de humedad.



B. Métodos de pasteurización. (1) Con vapor, (2) Fumigación química, y (3) Solarización.



9.3. Control de plagas y enfermedades.

Las plántulas de orquídeas normalmente crecen en macetas en los viveros. El manejo de las plagas y enfermedades es simplificado al hacer crecer las plantas en contenedores ubicados lejos del suelo, y que, por lo tanto, no son expuestos a plagas y patógenos del suelo y estarán bien aireados. La producción intensiva de plantas en los viveros crea la oportunidad para que plagas y enfermedades florezcan si no son monitoreadas. Estas son exacerbadas bajo condiciones de mala higiene o donde las plantas están estresadas debido al mal manejo (i.e. sobre o sub riego, mezclas de sustratos inapropiadas, etc.). Los viveros requieren de estrategias de control de plagas y enfermedades efectivas que consideren la interacción entre el agente causal, la micorriza en el contenedor y los factores ambientales (control integrado de plagas). En viveros, los productos químicos son ampliamente utilizados para el control de enfermedades fungosas (fungicidas), plagas de insectos (insecticidas) y nemátodos (nematicidas). Adicionalmente, algunos viveros utilizan herbicidas para el control de las malezas. Ningún producto químico debería ser utilizado sin un procedimiento adecuado y correcto de entrenamiento.

En el vivero de *Kings Park & Botanic Garden* es un vivero acreditado y como tal, se adhiere a las condiciones requeridas bajo el *Nursery Industry Accreditation Scheme Australia (NIASA)*.

Sin embargo, para propósitos de investigación solamente una pequeña superficie está reservada para éste propósito donde es necesario utilizar materiales, suelo especial, de ecosistemas naturales que no pueden ser pasteurizados o fumigados.

La mayor plaga de orquídeas en el vivero de Kings Park y su control se describen a continuación:

- larvas de mosca (que comen las raíces de las plántulas y protocormos) MesuroI 750 (methiocarb) o VectoBac GAS^R (*Bacillus thuringensis* subsp. *israelensis*).
- Caracoles y babosas también son controladas con MesuroI 750 o varios tipos de cebos.

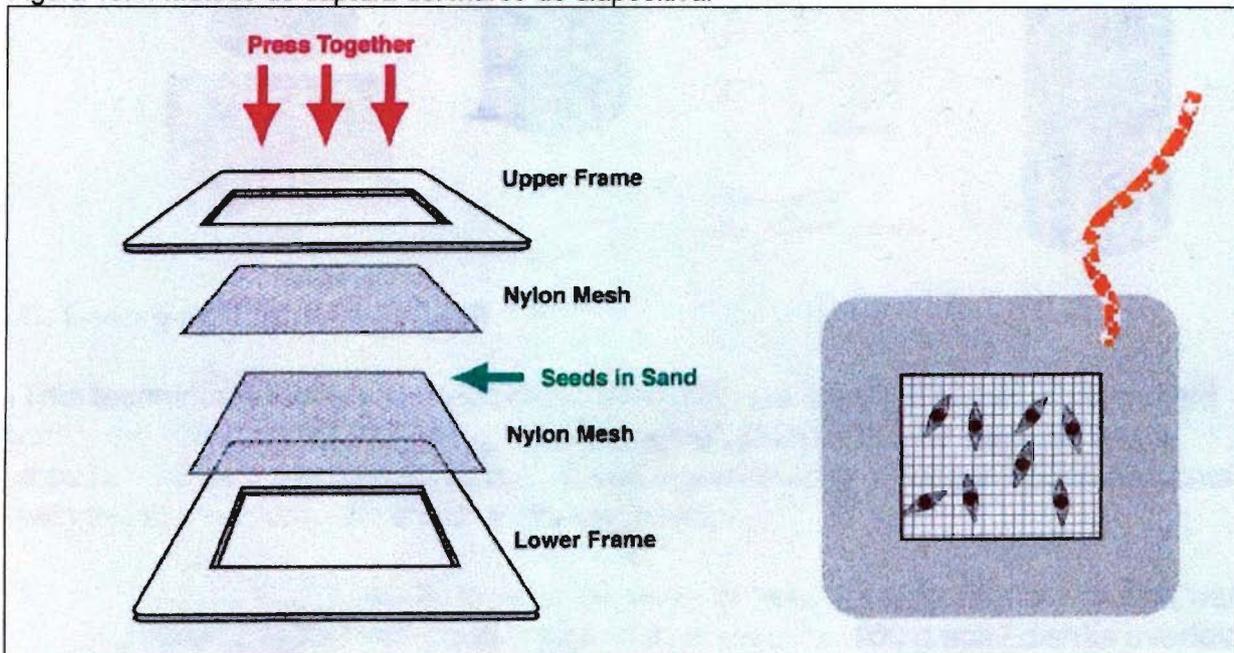
CAPÍTULO 10. CAPTURANDO HONGOS MICORRITICOS EN EL SUELO.

Un inóculo potencial es definido como la energía para el crecimiento de un organismo en la superficie del hospedero, y el consecuente número de propágulos de ese organismo y su estado nutricional (Garret, 1956). Comprender la distribución de los hongos micorrizas en el suelo y otros sustratos es importante para intentar retomar las orquídeas al campo y también para comprender la distribución de las orquídeas mismas. La distribución de las orquídeas en parches o manchones, puede estar influida por la presencia o ausencia de un hongo micorriza específico esencial para la sobrevivencia de la orquídea. La dispersión de las orquídeas puede ser una función de la distribución de las micorrizas, la distribución de las semillas y las condiciones apropiadas para la germinación de las semillas de orquídeas y del establecimiento de las plantas de orquídeas. Estudios de germinación *in situ* en los sitios en el campo han demostrado que se puede obtener una buena germinación.

A. Método de captura (cebo) del marco de diapositiva.

Una técnica de entierro de semillas desarrollada por Rasmunssen and Whigham (1993) permite una efectiva distribución de los endófitos de orquídeas en hábitats naturales *in situ*. Un estudio similar en *Western Australia*, la formación de tubérculos desde protocormos confirmó la presencia del hongo, en semillas que fueron dejadas en el suelo a través de toda la temporada de crecimiento (Batty et al., 2001). En este estudio, el mayor éxito de germinación fue encontrado en las semillas de orquídeas ubicadas próximas a plantas adultas de la misma especie.

Figura 10.1. Método de captura del marco de diapositiva.

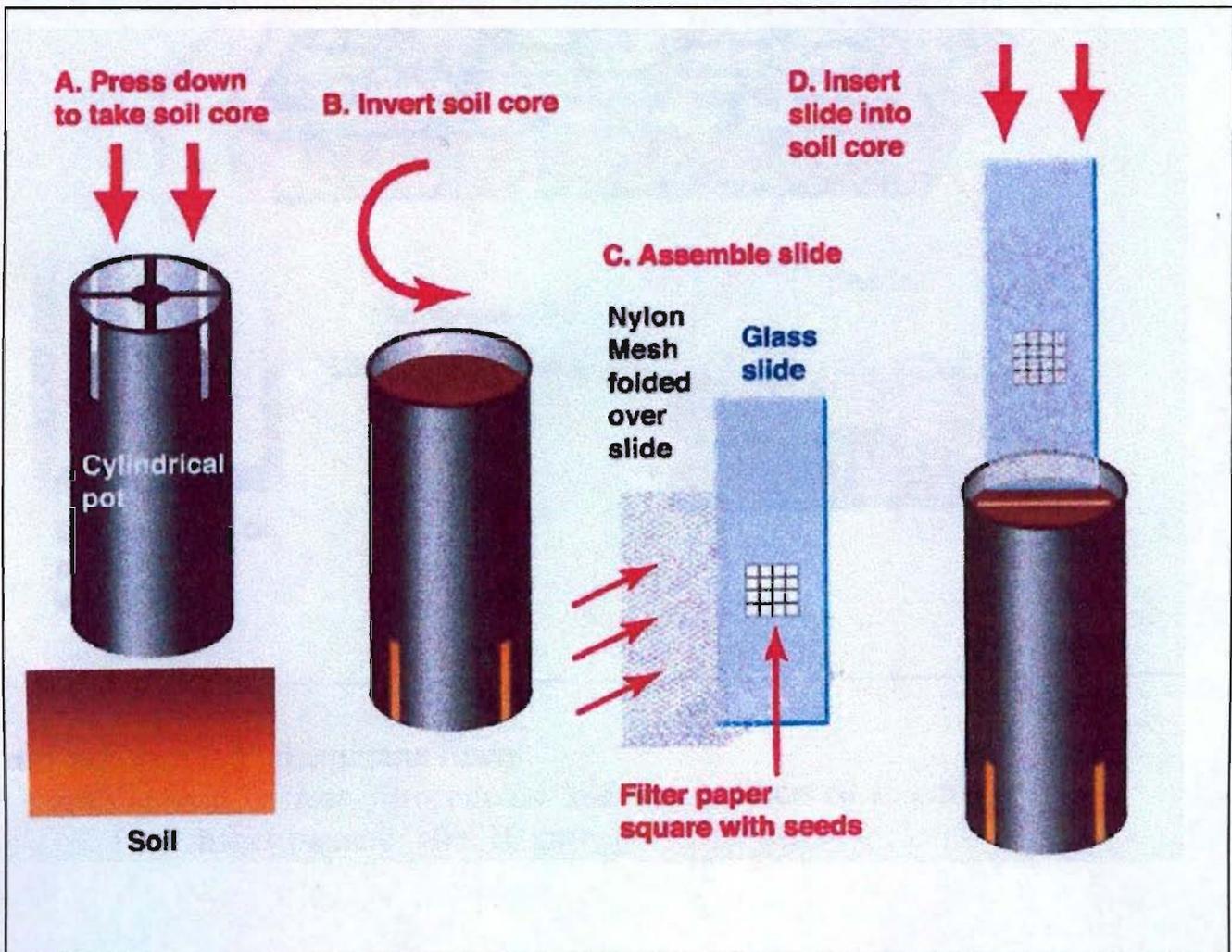


El método consiste en ubicar las semillas de orquídeas junto con arena de sílica estéril entre dos trozos de malla de nylon y dispuestas en marcos de diapositivas, como se aprecia en la figura 10.1. La cantidad de semilla a utilizar en cada captura dependerá de la cantidad de semilla disponible. Para *taxa* raros se pueden utilizar menos semillas. Para ayudar a localizar los cebos de semillas en el campo, se puede unir un cordel de nylon al marco con un pegamento u otro pegamento de secado rápido. Los marcos se pueden dejar listos con antelación y almacenados (por pocas semanas) a temperatura ambiente hasta que se requieran.

B. Cebo de cubo de suelo intacto.

Este método se encuentra actualmente en desarrollo en nuestro laboratorio y solamente se entrega una breve introducción aquí. Las semillas se adhieren a un trozo cuadrado de papel filtro de membrana húmedo (ver figura 10.2) y ubicadas en o los dos costados de un portaobjetos y es cubierta por una mala de nylon plegada. Dos o más *taxa* de orquídeas pueden ser plantas cebo en el mismo centro o núcleo por medio de ubicar las semillas en lados opuestos del portaobjetos o en cuadrados separados de papel filtro. El portaobjetos de vidrio con semillas es insertado en una grieta cortada en suelo (utilice solo una presión suave al insertar el portaobjetos de vidrio, de lo contrario puede quebrarse y cortar tu mano). Nosotros hemos utilizado esta técnica para comparar la germinación obtenida en el suelo bajo diferentes *taxa* de orquídeas.

Figura 10.2. Método de cebo de cubo de suelo intacto.



C. Germinación de semillas sobre el suelo.

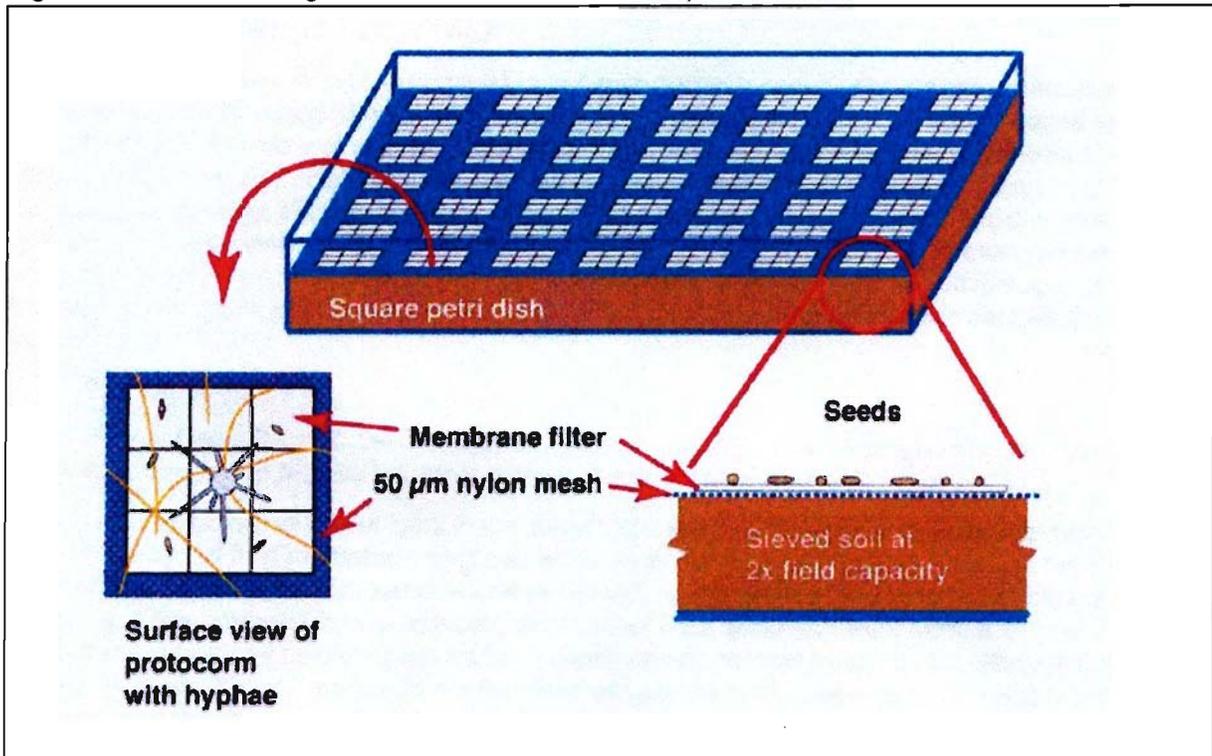
Esta técnica permite la observación no destructiva de la germinación de semillas utilizando muestras de suelo colectado en el campo o mezclas de sustratos inoculadas con hongos específicos. Esta es una modificación del método desarrollado para observar la germinación de las esporas de hongos en contacto con la solución del suelo (Brundett & Juniper, 1995).

Materiales: Germinación de semillas sobre filtro de membrana.

- cuadrados de filtro de membrana de nitrocelulosa (0.45 μ m).
- discos o placas de Petri cuadradas (10 x 10 cm)
- trozos de malla de nylon de 11 x 11 cm (50 μ m),
- suelo arenoso pasteurizado (steamed)

1. El suelo es cernido y luego se riega con aproximadamente 2 veces la capacidad de campo con agua desionizada y empacada en una placa que Petri cuadrada de 100 mm (aproximadamente 100 g de suelo / placa). Luego se cubre con una capa de malla de nylon (con poros de 50 μ m de tamaño).
2. Se cortan trozos cuadrados de 1 cm x 1 cm de filtro de membrana y se disponen sobre la malla (ver figura 10.3). Tanto la malla como el papel filtro se pueden esterilizar con etanol al 70% y enjuagarlas con agua destilada después. Normalmente no es necesario esterilizar las semillas superficialmente.
3. Las placas de Petri se sellan y son incubadas en oscuridad a una temperatura apropiada. Cada semana las placas se observan en el microscopio de disección con iluminación de fibra óptica para observar el número de semillas en los diferentes estados de germinación.
4. Las semillas en los diferentes estados de germinación pueden montarse en portaobjetos para hacer observaciones anatómicas.

Figura 10.3. Método de germinación de semillas de orquídeas en filtro de membrana cuadrículado.



ANEXO 1. REFERENCIAS DE GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS.

Appendix

Symbiotic Orchid Seed Germination References

1. Tan, T.K., *et al.*, *Infection of Spathoglottis plicata (Orchidaceae) seeds by mycorrhizal fungus*. Plant Cell Reports, 1998. **18**(1-2): p. 14-19.

Spathoglottis plicata seeds were encapsulated in 4-mm-diameter capsules of alginate-chitosan or alginate-gelatin and infected with the mycorrhizal fungus Rhizoctonia AM9. The encapsulated seeds were placed directly on Rhizoctonia culture. About 66% of the seeds encapsulated in sucrose-free chitosan-alginate established a symbiotic relationship with the mycorrhizal fungus after co-culturing for 2 weeks. The highest percentage of infection observed was about 84%. Addition of sucrose or using gelatin-alginate for encapsulation reduced the percentage of infection by about half. The growth of Rhizoctonia AM9 in sucrose-free alginate, chitosan and gelatin was found to be minimal. The advantages of germinating orchid seeds, encapsulated in sucrose-free polymers, through mycorrhizal infection is discussed.

2. Zelmer Carla, D., L. Cuthbertson, and S. Currah Randy, *Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms*. Mycoscience, 1996. **37**(4): p. 439-448.

The identity and ecological role of fungi in the mycorrhizal roots of 25 species of mature terrestrial orchids and in 17 species of field incubated orchid seedlings were examined. Isolates of symbiotic fungi from mature orchid mycorrhizas were basidiomycetes primarily in the genera Ceratorhiza, Epulorhiza and Moniliopsis; a few unidentified taxa with clamped hyphae were also recovered. More than one taxon of peloton-forming fungus was often observed in the cleared and stained mycorrhizas. Although Ceratorhiza and Epulorhiza strains were isolated from the developing protocorms, pelotons of clamped hyphae were often present in the cleared protocorms of several orchid species. These basidiomycetes are difficult to isolate and may be symbionts of ectotrophic plants. The higher proportion of endophytes bearing clamp connections in developing seeds than in the mycorrhizas is attributed to differences in the nutritional requirements of the fully mycotrophic protocorms and partially autotrophic plants. Most isolates of Ceratorhiza differed enzymatically from Epulorhiza in producing polyphenol oxidases. Dual cultures with thirteen orchid isolates and five non-orchid hosts showed that some taxa can form harmless associations with non-orchid hosts. It is suggested that most terrestrial orchid mycorrhizas are relatively non-specific and that the mycobionts can be saprophytes, parasites or mycorrhizal associates of other plants.

3. Van Der Kinderen, G., *Observations on in situ germination of Epipactis helleborine (L.) Crantz*. Lindleyana, 1995. **10**(4): p. 223-231.

Germination of Epipactis helleborine was studied under natural conditions, using a new technique of controlled soil incubation in situ. The influence of temperature, incubation depth and seed viability was examined in relation to the germination process. A long imbibition period, starting 3 months after seed dispersal, was observed. Its duration was equal regardless of the depth at which seeds were incubated. The proportion of seeds involved in the process was higher than suggested by biochemical viability testing, which proved to be unreliable. Differentiation of embryos to protocorms started almost one year after seed dispersal. A cold period preceded this stage of development and may have broken seed dormancy, but differentiation was observed only after fungal infection. After this, a marked depth-dependent difference in rate of development was observed.

4. Quay, L., A. McComb Jen, and W. Dixon Kingsley, *Methods for ex vitro germination of Australian terrestrial orchids*. Hortscience, 1995. **30**(7): p. 1445-1446.

Seeds of two Australian terrestrial orchid species (Caladenia latifolia R.Br. and Diuris magnifica D. Jones) were germinated in a potting mix of Allocasuarina fraseriana (Miq.) L. Johnson leaf mulch and perlite (1:1). The potting mix was irradiated (7 Gy for 14 hours), steam pasteurized (70C for 30 minutes) or

nontreated, and inoculated with the appropriate mycorrhizal fungus for each species, a sterile red fungus (SRF), or both. Protocorm formation and green shoots were evident at 8 and 10 weeks, respectively, after seed sowing. The highest mean number of seedlings was 84 for *C. latifolia* and 234 for *D. magnifica* per 270-ml container in pasteurized potting mix inoculated with mycorrhizal fungi and SRF. Shoots were longest after 20 weeks (28 mm for *C. latifolia* and 52 mm for *D. magnifica*, respectively) in pasteurized potting mix inoculated with mycorrhizal fungi only. Germination was absent in control treatments without mycorrhizal fungi; with SRF only; or in nonsterile potting mix with mycorrhizal fungi, SRF, or both.

5. Oddie, R.L.A., K.W. Dixon, and J.A. McComb, *Influence of substrate on asymbiotic and symbiotic in vitro germination and seedling growth of two Australian terrestrial orchids*. Lindleyana, 1994. 9(3): p. 183-189.

Agar, Gelrite, Agrosoke, ultrafine perlite and Allocasuarina leaf mulch were tested as in vitro substrates for the germination and growth of two Australian terrestrial orchids, *Elythranthera brunonis* and *Diuris longifolia*. When cultured asymbiotically, seeds of both species showed more germination and growth on medium gelled with Gelrite than on medium gelled with agar. *Elythranthera* seeds cultured on ultrafine perlite gave a similar level of growth and germination as on Gelrite but, for *Diuris* seedlings ultrafine perlite was superior to Gelrite. Agrosoke and Allocasuarina leaf mulch supported no germination in either species. Symbiotic germination of both species was more rapid than asymbiotic germination. *Elythranthera* seeds cultured symbiotically on Gelrite showed more growth than those on agar or ultrafine perlite. A higher strength of Gelrite and a lower strength of agar promoted more germination and growth of symbiotic *D. longifolia* seedlings. *E. brunonis* produced tubers after 20 weeks growth, with more tubers being produced on Gelrite than on agar or ultrafine perlite.

6. Johnson Stephen, R., *Symbiotic seed germination in relation to potential naturalization ability of Bletilla Striata (Orchidaceae)*. Lindleyana, 1994. 9(2): p. 99-101.

Orchid species may vary in their specificity for symbionts. Species with less restricted fungal relationships and wide range of possible pollinators may possess the ability to naturalize outside their native habitats. Unsterilized seeds of *Bletilla striata* were collected from garden grown plants in 1988. Unsterilized seeds were placed onto a non sterile commercially available potting soil and enclosed in plastic chambers to maintain high relative humidity. Five chambers were inoculated with leaf mold from the rhizosphere of *Cypripedium acaule* and another five were not. Seed germination was greater than 60%, mortality was less than 20% in the *C. acaule* leaf mold treatment and in the treatment lacking *C. acaule* leaf mold, seed germination was 34% with a 45% mortality of seedlings. Seedlings developed from protocorms in less than 1 month. This suggests that *Bletilla striata* is not highly specific in response to fungal symbionts and may therefore possess some naturalization ability.

7. Wang, H. and J.-T. Xu, *A cytochemical study of acid phosphatase in the mycorrhizal cells of Gastrodia elata seedling*. Acta Botanica Sinica, 1993. 35(10): p. 772-778.

A cytochemical study has been made to examine the activity of acid beta-glycerophosphatase in the mycorrhizal cells of the seedling of *Gastrodia elata* Bl. using thin sectioning technique in which sections were embedded in glycol mathacrylate (GMA). After the seedling was invaded by the hyphae of *Mycena osmundicola* Lange, two different kinds of infected cells were formed in its root cortex: the outer 1-2 cell layers namely the hyphae-containing cells (or host cells) contained many coiled hyphae pelotons; the inner comparatively large cell layer or fungus-digesting cells contained a few straight hyphae. Localization of acid phosphatase in hyphae-containing cells showed that only a few senescent hyphae retained the enzyme activity and the plant cells did not release hydrolytic enzyme. So it is considered that the hyphal lysis in hyphae-containing cell may be due to autolysis. In contrast, higher acid phosphatase activity was visualized in many vesicles and small vacuoles of the fungus-digesting cells. When a hypha entered a fungus-digesting cell through a hyphae-containing cell, a number of enzyme granules (i.e. enzyme-containing vesicles) gathered around it. Later on the enzyme granules expanded gradually and became small enzyme vacuoles of 1.6-2.0 μm in diameter. Still later the small enzyme vacuoles fused with each other to form a large vacuole in which a part of an invading hypha was enclosed and gradually digested by hydrolytic enzymes. Finally, the digesting vacuole changed into a residual body containing

some metabolic waste. The above results suggest that fungus-digesting cells can actively release hydrolytic enzymes by lysosomal vesicles to digest the invading hyphae, but such function is not present in the hyphae-containing cells, the role of which may be attributed to attracting and controlling the invading hyphae.

8. Beyrle, H.F. and S.E. Smith, *Excessive carbon prevents greening of leaves in mycorrhizal seedlings of the terrestrial orchid Orchis morio*. *Lindleyana*, 1993. **8**(2): p. 97-99.

Symbiotic germination of seeds of the terrestrial orchid *Orchis morio* L. on liquid oatmeal medium resulted in rapid development of protocorms and the formation of roots and leaves within six weeks. In daylight, the leaves developed chlorophyll and became green. With the addition of starch or sucrose (1%) plantlets developed longer roots, but light-induced chlorophyll synthesis was inhibited. Orchid mycorrhiza is discussed as a mechanism of heterotrophic carbon assimilation with the exploitation of the carbohydrate pool of the mycorrhizal fungus by the orchid as the main feature.

9. Malmgren, S., *Large-scale asymbiotic propagation by seed of Anacamptis, Ophrys, Orchis and other European orchids with entire tubers*. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 1993. **87**(4): p. 221-234.

It is now possible to propagate a large number of temperate terrestrial orchids on several different growing media with asymbiotic methods. However, several species of *Ophrys*, *Orchis*, *Anacamptis*, and similar orchids with entire tubers, as well as species of *Cypripedium*, seem to be very sensitive to inorganic nitrogen, especially nitrate, in the medium. However, a simple medium, where an amino-acid solution is the sole nitrogen source, has been used with great success. This solution, as well as the vitamin source, are standardized solutions used normally as pharmaceutical substances in hospital medical care. Most terrestrial orchids seem to be possible to propagate on a large scale on this medium, or very small variations of it (amino acids 0.4-1 g; saccharose 10-20 g/1000g). Concerning germination a combined treatment with H₂SO₄ and NaClO is described. Several species, which are otherwise problematic, germinate very well with this method, even from mature seeds. Mycorrhiza symbiosis is not necessary for survival after transfer into the soil. Survival is just a question of plant size and experienced plantlet nursing.

10. Weber, T. and J. Bach Thomas, *Partial purification and characterization of membrane-associated 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase from radish seedlings*. *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences*, 1993. **48**(5-6): p. 444-450.

We solubilized from radish membranes and purified by 154-fold 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HMGL, EC 4.1.3.4) catalyzing the conversion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-(HMG-)CoA into acetyl-CoA and acetoacetate. The apparent molecular mass under non-denaturing conditions is 70 kDa. The enzyme has a broad pH optimum around 8.0 and its activation energy as determined from the linear part of an Arrhenius plot is 137.1 kJ/mol. The K_m with respect to (S)-HMG-CoA is 40 μM. The enzyme is extremely unstable and rapidly loses activity even when kept on ice, but retains some activity over several weeks when stored at -80 degree C.

11. Masuhara, G.K.K., *Fungal Coil Formation of Rhizoctonia-Repens in Seedlings of Galeola-Septentrionalis Orchidaceae*. *Botanical Magazine Tokyo*, 1076. **104**(1076): p. 275-281.

Protopcorms or protocorms with roots of an achlorophyllous orchid *Galeola septentrionalis* were inoculated with isolates of *Rhizoctonia repens*, *R. solani*, and *Rhizoctonia* spp. The seedlings were infected with eight of twelve isolates of *R. repens*. Fungal coils were formed in the cells, which was suggestive of a symbiotic association. The other isolates caused soft rot or no infection to the protocorms or the protocorms with a root.

12. Uetaka, Y.K.K.O.A., *Penetration and Peloton Formation By Binucleate Rhizoctonia Ag-C On Symbiotic Germination of Spiranthes-Sinensis Seeds*. *Reports of the Tottori Mycological Institute*, 1990. **28**: p. 307-316.

Penetration time, site, and procedure, and peloton formation of binucleate Rhizoctonia AG-C during the symbiotic germination of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) were observed using a light and a scanning electron microscopes. The fungus invaded from the side opposite to the meristem of embryo with single hyphae. The embryo initiated germination just after the fungal invasion, emerged from the testa, and became a protocorm. Hyphae penetrated subepidermal and inner cortical parenchymal cells and formed pelotons, but did not penetrate meristematic cells. Pelotons in subepidermal parenchymal cells were stained strongly with safranin, and were not digested, whereas pelotons in the inner cortical parenchymal cells were stained weakly with safranin, and were finally digested. Secondary infection occurred to the cells containing digested pelotons. Emergence of hyphae from the epidermis and hairs of protocorms was observed.

13. Smreciu, E.A.C.R.S., *Symbiotic Germination of Seeds of Terrestrial Orchids of North America and Europe*. Lindleyana, 1989. 4(1): p. 6-15.

Symbiotic and asymbiotic germination of seeds of north temperature terrestrial orchids (10 North American species: *Amerorchis rotundifolia*, *Calypso bulbosa*, *Coeloglossum viride*, *Corallorhiza maculata*, *C. trifida*, *Cypripedium calceolus*, *Goodyera repens*, *Platanthera hyperborea*, *P. obtusata*, and *P. orbiculata* and 10 European species: *Dactylorhiza maculata*, *D. sambucina*, *Epipactis palustris*, *E. purpurata*, *Gymnadenia conopsea*, *G. odoratissima*, *Neottia nidus-avis*, *Nigritella nigra*, and *Orchis morio*) were tested on a synthetic medium and on a cellulose medium inoculated with one of six rhizoctonia strains isolated from orchid mycorrhizae and various pathogenic sources. Some development, ranging from embryo swelling to shoot development, was observed for 17 orchids. Embryos of *Corallorhiza maculata*, *C. trifida*, and *Epipactis purpurata* failed to develop further. *Ceratobasidium cereale* stimulated germination of 11 orchids but tended to function as a pathogen. *Rhizoctonia anaticula* and *Sistotrema* sp. stimulated germination of several orchid species. *Sistotrema* formed pelotons in protocorm cells similar to those found in mature orchid mycorrhizae. *Thanatephorus pennatus*, *Ceratobasium obscurum*, and *Rhizoctonia anaticula* were not effective in promoting seed germination or protocorm development in most of the orchids.

14. Manning, J.C.V.S.J., *The Development and Mobilization of Seed Reserves in Some African Orchids*. Australian Journal of Botany, 1987. 35(3): p. 343-353.

The development, final appearance and digestion of seed reserves in a number of genera of the Orchidaceae (tribe Orchideae) has been studied comprehensively, using ultrastructural and histochemical techniques complemented by gas chromatographic analysis of free sugars. Mature seeds of *Disa*, *Disperis* and *Huttonaea* contain substantial reserves of lipid and protein in the embryo. The protodermal cells of *Disperis* also contain protein-carbohydrate bodies. Free sugars are present but starch occurs only in immature seeds. Glyoxysomes are absent and lipolysis does not occur in seeds incubated without an external source of sucrose, and although a little starch is formed it is apparently synthesised from endogenous sucrose reserves. In the presence of exogenous sucrose, however, proteins are hydrolysed and glyoxysomes appear. Substantial quantities of starch are formed in such seeds. From these observations it is apparent that orchid seeds are unable to utilise endogenous reserves of lipid unless simple sugars are supplied to the medium but can utilise the free sugars present in the embryo. Resultant conclusions on the role of mycorrhizae in the germination of orchid seeds are discussed.

15. Tsutsui, K.T.M., *Symbiotic Germination of Spiranthes-Sinensis Associated With Some Orchid Endophytes*. Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University, 1986. 62(4): p. 440-452.

With 7 *Rhizoctonia* isolates obtained from 4 orchid species out of 10, symbiotic capability to *Spiranthes sinensis* seeds was tested on oat medium. A binucleate *Rhizoctonia* AG-C isolate obtained from *Gymnadenia camtschatica* was the most effective symbiont to this orchid and germinated seeds grew large enough to transplant within 3 months after seeding. Two binucleate *Rhizoctonia* isolates, possibly *Rhizoctonia repens*, obtained from *Spiranthes sinensis* per se were symbiotic to this orchid but far less effective. And there was a considerable difference between the two in their effectiveness. The effect of culture media on the symbiosis was considerably large but it could not change the essential nature of the symbiosis. For this orchid the medium containing mineral salts, 1% cellulose, 0.1% sucrose and 0.02-

0.05% yeast extract was better than the oat medium for symbiotic culture. The addition of mycelial powder or culture filtrate of the compatible fungus to non-symbiotic culture did not stimulate the germination or protocorm growth. Although *Spiranthes sinensis* was found to germinate non-symbiotically on a wide range of media irrespective of light conditions, the protocorm growth was very slow and it required more than 16 months from seeding to attain sufficient growth for transplanting.

16. Markovina, A.L. and P.A. McGee, *Comparison of symbiotic and asymbiotic seed germination and plantlet development in Sarcochilus (Vandae; Orchidaceae)*. *Lindleyana*. [print], 2000. 15(2): p. 68-72.

In vitro symbiotic and asymbiotic seed germination and plantlets development of *Sarcochilus* species and hybrids were compared. Of four fungi isolated from pelotons from *Sarcochilus olivaceus* Lindl. and *S. falcatus* R.Br., three germinated a similar proportion of seeds following inoculation on a commercial asymbiotic medium. The fourth isolate overgrew the seed. One fungus, tentatively identified as *Ceratohiza* sp., stimulated growth to the extent that some seedlings were large enough for ex vitro growth 13 weeks after germination. Mycorrhiza formation in the root-like organs of one-year-old asymbiotically germinated plantlets of a hybrid of *Sarcochilus* resulted in faster growth rates than of asymbiotic plantlets growing on a commercial medium. Again, one fungus stimulated growth of leaves and roots significantly more than the others. We suggest that symbiotic techniques have a role in commercial production of plants.

17. Wood Christopher, B., W. Pritchard Hugh, and P. Miller Angela, *Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature*. *Cryo Letters*, 2000. 21(2): p. 125-136.

Seeds of *Dactylorhiza fuchsii* (common spotted orchid) and *Anacamptis morio* (green-winged orchid) were encapsulated in alginate beads with hyphae of the basidiomycete fungus *Ceratobasidium cornigerum*. Pre-treatment of beads for 18 h with sucrose at an optimum concentration of 0.75 M decreased the desiccation rate in a flow of sterile air (c. 23 degreeC, 30% RH) and increased seed and fungal survival after up to 16 h drying. Pre-treated and 16-h dried beads were transferred to cryo-vials and subsequently stored at a range of low temperatures for up to 30 d. Neither embryo growth of both orchids nor fungal development was detrimentally affected by 1 d storage at -196 degreeC when the beads were pre-dried to c. 20% moisture content. Encapsulated *D. fuchsii* seed and compatible fungus had 5% and 45% viability when beads of the same moisture content were stored for 1 d at -20degreeC and -70degreeC respectively. In contrast, viability of the seed and the fungus remained unchanged during 30 days storage at -196degreeC but was progressively lost at 16degreeC over the same interval. The results indicate opportunities for the use of simultaneous cryopreservation as a conservation tool for diverse taxa.

18. McKendrick, S.L., et al., *Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of Corallorrhiza trifida and characterization of its mycorrhizal fungi*. *New Phytologist*, 2000. 145(3): p. 523-537.

The processes of symbiotic germination and seedling development were analysed in the myco-heterotrophic orchid *C. trifida*, seeds of which were buried in 'packets' either adjacent to or at varying distances from adult plants in defined communities of ectomycorrhizal tree species. Germination occurred within eight months of burial under *Betula-Alnus* and within seven months under *Salix repens*. It was always associated with penetration of the suspensor by a clamp-forming mycorrhizal fungus. Four distinct developmental stages were defined and the rates of transition through these stages were plotted. There was no evidence of a relationship between extent of germination or rate of development and the presence of naturally distributed plants of *C. trifida* at the spatial scale of 1 m. The best germination and the most rapid rate of development of *C. trifida* seedlings occurred in a *Salix repens* community located at a considerable distance from any extant *C. trifida* population. Determination of internal transcribed spacer (ITS) RFLPs and of gene sequences of the fungi involved in symbiotic germination and growth of *C. trifida*, revealed them to belong exclusively to the *Thelephora-Tomentella* complex of the *Thelephoraceae*. These fungi are known also to be ectomycorrhizal associates of trees. It is hypothesized

that the rate of growth of the *C. trifida* seedlings is determined by the ability of the fungal symbionts to transfer carbon from their ectomycorrhizal co-associates

19. Takahashi, K., I. Ogiwara, and N. Hakoda, *Seed germination of Habenaria (Pecteilis) radiata (Orchidaceae: Orchideae) in vitro*. Lindleyana, 2000. **15**(1): p. 59-63.

Characteristics of seed germination in *Habenaria (Pecteilis) radiata* in vitro were studied with respect to effects of seed age, culture media, light conditions, and mycorrhizal fungal isolates. The germination percentage of seeds maintained under 10-15 deg C, 30-50% humidity conditions for seven months was unaffected by light conditions, culture media, and fungal isolates, and the seeds had a high germination percentage 28 days after sowing. Seeds sown in October immediately after harvesting had a lower germination percentage than those sown in May of the following year, and germination percentage for these also varied with light conditions, culture media, and fungal isolate. For seeds sown in October, those cultivated on Hyponex medium had a higher germination percentage than those cultivated on oatmeal medium, and those in lighted conditions had the higher germination percentage. Additionally, the existence of a fungal isolate (isolate 9240; *Ceratobasidium* sp.) that does not promote early growth but does assist in germination was recognized

20. Umata, H., *Germination and growth of Erythrorchis ochobiensis (Orchidaceae) accelerated by monokaryons and dikaryons of Lenzites betulinus and Trametes hirsuta*. Mycoscience, 1999. **40**(4): p. 367-371.

Four sib-monokaryons and two reconstituted dikaryons of *L. betulinus* and *T. hirsuta* [*Coriolus hirsutus*], accelerated the seed germination of *E. ochobiensis*, an achlorophyllous orchid. All isolates of *L. betulinus* and 3 isolates of *C. hirsutus* induced the development of plants from germinated seeds. Although three monokaryotic isolates of *C. hirsutus* failed to induce the development of plants, the reconstituted dikaryons induced the development

21. Zettler, L.W., J.C. Burkhead, and J.A. Marshall, *Use of a mycorrhizal fungus from Epidendrum conopseum to germinate seed of Encyclia tampensis in vitro*. Lindleyana, 1999. **14**(2): p. 102-105.

In vitro symbiotic seed germination and early development of the Florida butterfly orchid, *Encyclia tampensis*, is described. Seeds of *E. tampensis*, a commercially exploited epiphytic species, were inoculated with a mycorrhizal fungus originally isolated from another epiphytic orchid, *Epidendrum conopseum*. Seeds inoculated with the fungus germinated (99.6%) within 21 days, whereas seeds incubated in the absence of the fungus failed to germinate. About 2% of the seedlings initiated leaves after 13 weeks of incubation. Evidence for the orchid-fungal symbiosis consisted of the observation of coils of fungal hyphae (pelotons) in cortical cells of leaf-bearing seedlings

22. Sarma, C.M. and K. Satinder, *Application of Rhizoctonia solani for establishment of in vitro raised Arundina graminifolia (D. Don) Hochr. seedlings under natural conditions*. Journal of the Orchid Society of India, 1998. **12**(1): p. 77-78.

The establishment of plantlets of *A. graminifolia* in terms of survival rate and growth in different growing media was studied. Plant survival and growth were best in a medium composed of charcoal, bricks, sand, leaf mould and cow dung (1:1:1:1:1). Treatment with *Rhizoctonia solani* enhanced percentage survival

23. Fan, L., S. Guo, and J. Xu, *Interaction between protocorms of Gastrodia elata (Orchidaceae) and Mycena dendrobii in symbiotic germination*. Mycosystema, 1999. **18**(2): p. 219-225.

Symbiotic germination tests between seeds of *G. elata* and *M. dendrobii* demonstrated that *M. dendrobii* stimulated seed germination. Many seeds germinated and formed protocorms which were colonized by fungal hyphae. The hyphae were commonly distributed in stipe cell, subepidermal parenchyma cells (SEP) and inner cortical parenchyma cells (ICP), and were separated from protocorm cell cytoplasm by electron-lucent materials and the protocorm cell plasma membrane. The hyphae formed pelotons in SEP,

but in ICP they were digested and lysed. Protocorm cells containing degenerated hyphae were frequently recolonized by hyphae, and hyphal digestion and the reinfection of protocorm cells occurred repeatedly throughout the protocorm growth

24. Tomita, M. and S. Konno, *A preliminary report on the symbiotic germination of nine Japanese terrestrial orchids*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1998. **67**(5): p. 696-698.

To develop an effective propagation method, a symbiotic culture (using 20 fungal strains) was attempted in 9 species of Japanese terrestrial orchids. In all orchid species tested, seeds germinated in symbiotic culture with Rhizoctonia isolates; no seeds germinated in symbiotic culture with non-Rhizoctonia isolates. Seeds of *Goodyera biflora* var. *macrantha*, *G. foliosa* var. *laevis* and *G. hachijonesis* var. *matsumurana*, when inoculated binucleate Rhizoctonia strains, germinated and exhibited virtually the same TTC [tetrazolium test] results as embryos. Those in a symbiotic culture with binucleate Rhizoctonia grew well compared with seeds on a non-symbiotic culture. The 6 other orchid species exhibited lower germination rates and reduced TTC test results. There were numerous effective fungal strains with 5 orchid species with the exception of *Cypripedium macranthos* var. *speciosum*, which developed a symbiotic relationship with only one of the fungal isolates tested. The binucleate Rhizoctonia fungal group were suitable for promoting symbiotic germination and growth of *Aorchis cyclochila*, *Dactylorhiza aristata* and *Gymnadenia conopsea*; *Amitostigma kinoshitae* and *Ponerorchis graminifolia* var. *graminifolia* responded better to *R. repens*

25. Zettler, L.W. and C.J. Hofer, *Propagation of the little club-spur orchid (Platanthera clavellata) by symbiotic seed germination and its ecological implications*. Environmental & Experimental Botany, 1998. **39**(3): p. 189-195.

Propagation of the auto-pollinated terrestrial orchid, *P. clavellata*, using symbiotic seed germination is described. Seeds from 3 populations in the southern Appalachians (Tennessee, South Carolina and Georgia, USA) were inoculated with mycorrhizal fungi (*Epulorhiza* spp.) in vitro. Seed germination and protocorm (seedling) developmental stages were evaluated up to 1 year after sowing. Seeds from Tennessee and South Carolina had significantly higher percentage germination (76.4 and 81.5%, respectively) than seeds from Georgia (16.2%). More advanced seedlings suitable for transfer to the soil were obtained from the Georgia seed lot. A single fungal isolate (*E. inquilina*) originally obtained from roots of *P. clavellata*, promoted advanced seedling development; 3 other isolates from obtained from *P. ciliaris*, *P. cristata* and *P. integrilabia* were ineffective. The ecological role of this orchid with its associated fungi is discussed with respect to the other cohabiting *Platanthera* species

26. Umata, H., *In vitro germination of Erythrorchis ochobiensis (Orchidaceae) in the presence of Lophophytum shimeji, an ectomycorrhizal fungus*. Mycoscience, 1997. **38**(3): p. 355-357.

In vitro germination of a myco-heterotrophic orchid, *E. ochobiensis*, was tested in the presence of ectomycorrhizal fungi, *L. shimeji* and *Tricholoma fulvocastaneum*. *L. shimeji* stimulated the germination after incubation for 1.5 months. Although most germinated seeds did not grow further after 3 months, several seeds developed into small protocorms but showed amorphous profiles. Fungal mycelia were observed in the germinated seeds and protocorms, but pelotons were not detected. Since the seeds did not germinate axenically, it is suggested that the fungus has the ability to stimulate germination

27. Zelmer, C.D., L. Cuthbertson, and R.S. Currah, *Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms*. Mycoscience, 1996. **37**(4): p. 439-448.

The identity and ecological role of fungi in the mycorrhizal roots of 25 species of mature terrestrial orchids and in 17 species of field incubated orchid seedlings were examined. Isolates of symbiotic fungi from mature orchid mycorrhizas were basidiomycetes primarily in the genera *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* and *Moniliopsis*; a few unidentified taxa with clamped hyphae were also recovered. More than 1 taxon of peloton-forming fungus was often observed in the cleared and stained mycorrhizas. Although *Ceratorhiza* and *Epulorhiza* strains were isolated from the developing protocorms, pelotons of clamped hyphae were often present in the cleared protocorms of several orchid species. These basidiomycetes were difficult to

isolate and may be symbionts of ectotrophic plants. The higher proportion of endophytes bearing clamp connections in developing seeds than in the mycorrhizas is attributed to differences in the nutritional requirements of the fully mycotrophic protocorms and partially autotrophic plants. Most isolates of *Ceratophiza* differed enzymatically from *Epulorhiza* in producing polyphenol oxidases. Dual cultures with 13 orchid isolates and 5 non-orchid hosts showed that some taxa can form harmless associations with non-orchid hosts. It is suggested that most terrestrial orchid mycorrhizas are relatively non-specific and that the mycobionts can be saprophytes, parasites or mycorrhizal associates of other plants

28. Umata, H., *Seed germination of Galeola altissima, an achlorophyllous orchid, with aphylophorales fungi*. Mycoscience, 1995. **36**(3): p. 369-372.

Seed germination tests on *G. altissima* were carried out with 5 aphylophorales fungi: *Erythromyces crocicreas*, *Ganoderma australe*, *Loweporus tephroporus*, *Microporus affinus* and *Phellinus* sp. All 5 species were effective for seed germination of the orchid. *E. crocicreas*, which has hitherto been regarded as the only endomycorrhizal fungus of the orchid, was confirmed to be effective for further development of the orchid

29. Rasmussen, H.N., *Germination biology and mycotrophy of terrestrial orchids. Studies of north temperate species 1986-1993*. SP Rapport Statens Planteavlsvorsok, 1995(31).

Results of in vitro and field studies and a literature survey on the germination and growth of orchids in association with mycorrhizas are discussed

30. Rasmussen, H.N., *Terrestrial orchids. From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995. **332**: p. 50.

Terrestrial orchid biology is surveyed, from seed dispersal to the established plant, including the role of mycorrhizas, using observations from field and in vitro experiments. There are chapters on seed properties, development, survival and germination, mycorrhizas and mycorrhizal fungi, underground organs, abiotic factors in growth and development, life history and phenology, and propagation. The final chapter reviews the life history, endophytes, role of mycorrhizas and propagation of 36 genera and their species. There is a list of references and appendices of media and names and synonyms. The book is intended for both physiologists and those involved in orchid horticulture

31. Kinderen, G.v.d., *Observations on in situ germination of Epipactis helleborine (L.) Crantz*. Lindleyana, 1995. **10**(4): p. 223-231.

Germination of *E. helleborine* seeds was studied under natural conditions, using a new technique of controlled soil incubation in situ. The influence of temperature, incubation depth and seed viability was examined in relation to the germination process. A long imbibition period, starting 3 months after seed dispersal, was observed. Its duration was equal regardless of the depth at which seeds were incubated. The proportion of seeds which proved to be viable in the soil incubation test was higher than suggested by biochemical viability testing, which proved to be unreliable. Differentiation of embryos to protocorms started almost one year after seed dispersal. A cold period preceded this stage of development and may have broken seed dormancy, but differentiation was observed only after mycorrhizal infection. After this, a marked depth-dependent difference in rate of development was observed

32. Uetake, Y., A. Ogoshi, and N. Ishizaka, *Cytochemical localization of malate synthase activity in the symbiotic germination of Spiranthes sinensis (Orchidaceae) seeds*. Transactions of the Mycological Society of Japan, 1993. **34**(1): p. 63-70.

Activity of malate synthase was demonstrated in microbodies (glyoxysomes) in asymbiotic seeds 4, 10, 15 and 25 d after sowing on oat powder agar, and in symbiotic seeds at 4 d after sowing and inoculation with binucleate *Rhizoctonia* AG-C on the same medium. In symbiotic culture, the reaction products in microbodies lessened in the embryo after 5 d and were absent from or present in limited amounts in the

protocorms at 10 d and in young seedlings 15 d after sowing and inoculation. Lipid bodies were degraded slowly in asymbiotic seeds, but rapidly in infected cells of symbiotic seeds. These results suggest that fungal invasion caused changes in the metabolism of lipid reserves in the orchid embryo cells

33. Zettler, L.W., F.V. Barrington, and T.M. McInnis, Jr., *Developmental morphology of *Spiranthes odorata* seedlings in symbiotic culture*. *Lindleyana*, 1995. **10**(3): p. 211-216.

Symbiotic seed germination and developmental morphology of *S. odorata* protocorms (seedlings) were investigated using 2 orchid endophytes isolated from the North American terrestrial orchids *S. odorata* and *Platanthera ciliaris*. Seeds germinated during the second week of incubation in both symbiotic and asymbiotic culture; however, seedling development in the absence of a fungus was arrested after 35 days. Fungal-infected seedlings produced leaf primordia in darkness, but further leaf (shoot) development occurred only after exposure to white light. Seedlings infected with the *P. ciliaris* endophyte continued to develop, leading to the soil-establishment of 5.6% of the originally-sown embryos, 299 days following fungal inoculation. Seedlings that initiated the formation of leaf primordia represented the most critical stage in the early development of this species, with light and fungi both playing key roles. Although this species is routinely propagated asexually through vegetative cloning, the continued implementation of symbiotic techniques for this and other temperate terrestrial orchids is advocated here, at least until the reproductive potential of native orchids is fully understood

34. Rasmussen, H.N. and D.F. Whigham, *Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids*. *American Journal of Botany*, 1993. **80**(12): p. 1374-1378.

A method is described by which seeds of terrestrial orchids are sown and retrieved in the field under almost natural conditions. For the first time it is possible to conduct a quantitative study of orchid germination in situ and observe seasonal growth and mortality of seedlings. The technique has also enabled the relation between the site where the seeds are sown, the availability of an appropriate fungus to infect the seeds, and seedling establishment in the soil to be investigated. Five local species were studied. *Corallorrhiza odontorhiza*, *Goodyera pubescens* and *Galearis spectabilis* all began to germinate in May-June, after 23-30 weeks in the soil. These species differed in their dependency on infection at germination time, but none of the seedlings developed beyond the point of rupturing the testa except when infected. Seeds of *Liparis liliifolia* and *Tipularia discolor* did not germinate within the first 12 months of the experiment. The implications and potential uses of this field sowing technique for further studies and for other kinds of minute seeds are discussed

35. Zettler, L.W. and T.M. McInnis, Jr., *Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*)*. *Plant Science*, 1994. **102**(2): p. 133-138.

Seeds of the endangered orchid *P. integrilabia* were exposed to 1 of 3 light treatments: 7 days initial darkness followed by 16 h light/day, 16 h light/day for 7 days followed by darkness, and 16 h light/day throughout. Alternatively, a continuous dark treatment in symbiotic and asymbiotic culture was provided. Seeds exposed to a photoperiod of 16 h/day or an initial 7 days of darkness followed by 16 h light/day were largely inhibited from germinating. Seeds exposed to 16 h light/day during the first 7 days after fungal inoculations followed by darkness had a significantly higher percentage germination (44%) than the other treatments, including inoculated seeds in continuous darkness (20.3%). Seedling (protocorm) development (i.e., formation of leaf primordia) was also enhanced by initial light compared with seedlings under continuous darkness. It is speculated that light exposure followed by darkness occurs naturally, starting with the shedding of seeds from capsules to their immersion in a substrate where germination occurs. The beneficial effects of light in this study argues in support of light usage to stimulate germination and seedling development of temperate terrestrial orchids

36. Wilkinson, K.G., et al., *Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria*. *Plant & Soil*, 1994. **159**(2): p. 291-295.

Seven isolates of orchid-associated bacteria (OAB) belonging to 5 species were tested for their effect on mycorrhiza-assisted germination of the terrestrial orchid *Pterostylis vittata*. Growth regulator standards were also tested to evaluate their potential roles in the germination and development of the orchid. Strains of *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas maltophilia* and *Bacillus cereus* promoted symbiotic germination, whereas certain strains of *P. putida* and an *Arthrobacter* species reduced it. Symbiotic germination was enhanced by IAA, inhibited by GA₍₃₎ and suppressed by kinetin. Each species of OAB produced IAA, although the conditions of growth affected the production of the auxin. IAA was not produced by the mycorrhizal fungus from *P. vittata* under the test conditions. Enhancement of symbiotic germination development may have resulted either from the production of IAA by the OAB and/or by the induction of endogenous growth regulators in the orchid by the metabolites of the bacterium and/or mycorrhizal fungus

37. Zettler, L.W. and T.M. McInnis, Jr., *Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae)*. *Lindleyana*, 1993. **8**(3): p. 155-162.

The symbiotic germination and subsequent development of seeds of 2 North American terrestrial orchids was studied using a combination of 3 seed storage temperatures (6, 22 or -7 deg C) and 3 orchid mycorrhizal endophytes isolated from *Platanthera ciliaris*, *P. integrilabia* and *S. cernua*. Germination percentages were not significantly enhanced by fungus inoculation. Seeds germinated in all treatments including those in asymbiotic culture (non-inoculated). Seed germination percentages of *G. pubescens* increased in direct proportion to increasing seed storage temperatures. The opposite was true for *S. cernua* seeds, which when chilled remained viable in storage for at least 9 months. Development of *G. pubescens* was arrested following the appearance of the first true leaves after incubation in vitro under a 16-h photoperiod. Three of 196 *S. cernua* seedlings in soil flowered 787 days after germination. All but 3 of the 196 seedlings were derived from chilled seeds inoculated with a *P. ciliaris* endophyte. A mortality rate of 4.1% for seedlings established in soil was recorded 704 days following germination. The inoculation of chilled *S. cernua* seeds with a *P. ciliaris* endophyte appears to be a feasible means of cultivating this species

38. Ozkoc, I. and M. Dalci, *The effect of some fungi upon germination and development of *Orchis laxiflora* Lam. (Orchidaceae) seeds on two different media*. *Doga Turk Biyoloji Dergisi*, 1993. **17**(1): p. 23-28.

Eleven mycorrhizal fungal isolates from various countries were compared in 2 oat-based media. Seed germination and seedling development in both media were best with the foreign isolates No. 624 and F 418, followed by F 397. Two Turkish isolates were found to be ineffective

39. Guo, S.X. and J.T. Xu, *Studies on the changes of cell ultrastructure in the course of seed germination of *Bletilla striata* under fungus infection conditions*. *Acta Botanica Sinica*, 1990. **32**(8): p. 594-598.

The effect of fungal [mycorrhizal] infection on ultrastructural changes occurring during germination of *B. striata* seeds observed by EM, is reported

40. Richardson, K.A., R.L. Peterson, and R.S. Currah, *Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae)*. *Canadian Journal of Botany*, 1992. **70**(2): p. 291-300.

Seeds of this North American terrestrial orchid consist of a thin testa and a simple embryo without a cotyledon. Studies showed that epidermal and parenchyma cells of the embryo contained lipid and protein as storage reserves. Many of the protein bodies had globoid crystals identified by their P, Ca⁽²⁺⁾, Mg⁽²⁺⁾, and K⁽⁺⁾ content. Germination occurred with either *Rhizoctonia cerealis* or *Ceratophiza goodyerae-repentis* as the fungal symbiont on Warcup's medium. The fungus entered through dead suspensor cells and triggered protocorm development and concomitant utilization of lipid and protein reserves. Fungal hyphae formed pelotons with protocorm cells initially, and these went through stages of vacuolation and collapse. Some hyphae stored small numbers of polyphosphate

bodies. Clumps of degenerated hyphae were usually encased within material that stained positive with aniline blue, presumably callose

41. Rasmussen, H.N., *Seed dormancy patterns in Epipactis palustris (Orchidaceae): requirements for germination and establishment of mycorrhiza*. Physiologia Plantarum, 1992. **86**(1): p. 161-167.

Some terrestrial orchid species, including *E. palustris*, are considered extremely difficult to germinate and cultivate in vitro. Observations of orchids germinating in nature are very few, and the timing and requirements for seedling establishment are unknown for most species. Seeds of *E. palustris* were incubated in vitro with an unidentified fungal strain isolated from plants in the field, but germination was poor unless several other conditions were also met. These conditions were scarification of the testa in $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, an initial incubation for several weeks at 20 deg C, and a subsequent cold stratification for 8-12 weeks at 4-8 deg . With these pretreatments, germination responses exceeded 50% after incubation for 4 weeks at 20 deg . Healthy protocorms with normal organ development were only produced by symbiotic culture following this lengthy seed preparation. The findings suggest that under natural conditions the seeds need some after-ripening and the testa needs to be partially decomposed before germination. The requirement for chilling suggests that germination of seeds in situ occurs in spring

42. Masuhara, G., K. Katsuya, and K. Yamaguchi, *Potential for symbiosis of Rhizoctonia solani and binucleate Rhizoctonia with seed of Spiranthes sinensis var. amoena in vitro*. Mycological Research, 1993. **97**(6): p. 746-752.

Rhizoctonia isolates obtained from non-orchid sources were tested for symbiotic ability with seeds of *S. sinensis* var. *amoena* in vitro. All or some isolates of *R. solani* anastomosis group (AG)-1, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-7, AG-8 and AG-BI induced symbiotic germination of the orchid seeds. In binucleate *Rhizoctonia* anastomosis groups, also all or some isolates of AG-A, AG-Ba, AG-Bb, AG-B, AG-C, AG-D, AG-E, AG-F, AG-G, AG-H, AG-I, AG-K, AG-L, AG-M, AG-O, AG-P and AG-Q, induced the symbiotic germination. However, no germination occurred when the seeds were inoculated with *Sebacina vermifera* (*R. globularis*) and *Waitea circinata* (*R. zeae* and *R. oryzae*) in vitro

43. Yamashita, T. and K. Nishikawa, *Development and anatomy of the fungus-free, cultivated seedling and of underground organs of Habenaria radiata (Orchidaceae)*. Beitrage zur Biologie der Pflanzen, 1991. **66**(3): p. 351-370.

Seeds of *Habenaria radiata* [*Pecteilis radiata*] were germinated in sterilized nutrient medium and the seedlings were cultivated for 1 year in the same medium. Protocorms, shoot axes, adventitious roots and tuberous roots of the seedlings were investigated morphologically and anatomically. The tuberous root is initiated just below the shoot apex of the main axis, and the broadened proximal part of the tuberous root primordium envelopes the shoot apex. The apical part of the tuberous root primordium dissolves the surrounding stem cortex tissue and makes a hole through the stem epidermis. Finally the tuberous root, together with the enclosed shoot apex of the main axis, moves out of the plant body through the hole made in the stem epidermis. Thus, the seedlings grow monopodially, despite their peculiar appearance. Comparison with tuberous roots of adult, flowering plants in Ophrydeae is discussed

44. Rasmussen, H. and F.N. Rasmussen, *Climatic and seasonal regulation of seed plant establishment in Dactylorhiza majalis inferred from symbiotic experiments in vitro*. Lindleyana, 1991. **6**(4): p. 221-227.

Seeds of *D. majalis* (collected from a population in North Zealand, Denmark) were germinated in vitro with a compatible fungus, *Tulasnella calospora*. Germination itself was almost completely inhibited in long and short day photoperiods and at a very low light intensity, but initial illumination (particularly with red light) raised the eventual germination percentage. These responses would tend to enhance germination in open vegetation but below ground, where there are chances of immediate symbiotic infection and little risk of desiccation. Germination in vitro was highest at about 20 deg C with little diurnal fluctuation. Above 25 deg , seeds remained imbibed but did not germinate and rejected fungal infection. Symbiotic seedlings

grew well at fairly low temperatures and responded to chilling (5 deg for 15 weeks) by developing an aerial shoot and later a tuberoid. These findings suggest that the seeds normally germinate in autumn when saprophytic nutrition of the mycelium is optimal. The requirement of a cold season for further seedling differentiation may be restrictive for the distribution of this species

45. Anderson, A.B., *Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae)*. Lindleyana, 1991. 6(4): p. 183-186.

Seeds of *S. magnicamporum*, a species which is becoming increasingly rare in Canada and which has commercial potential, were germinated in vitro on (1) water agar, (2) modified Knudson's medium, or (3) oat medium containing the fungal symbiont *Epulorhiza repens* isolated from a naturally occurring plant of the same species. Symbiotic germination in medium (3) was variable, the fungus parasitizing many of the embryos and developing protocorms, but surviving seedlings grew well. Forty plants were potted at 4 months and kept at 10 deg C in 8-h days until they were 8 months old, when they were planted in a raised bed of calcareous sand in June. All survived to 23 months, when most of them flowered. With medium (2), containing 250 mg calcium nitrate, Burgeff's phosphate buffer, 5% potato extract but no potassium chloride, the germination was 45% with good development until 2 months when signs of N deficiency became evident; this was corrected by increasing the level of calcium nitrate to 1 g/litre. After potting at 4 months, only 2 of the 40 seedlings survived to 23 months. With medium (1) germination was excellent (99%) but there was no development beyond the protocorm stage. However, when protocorms were transferred to medium (3) and became infected with the fungus development was satisfactory; all 40 seedlings survived and most flowered in the following Sep

46. Arditti, J., et al., *The contribution of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review*. Lindleyana, 1990. 5(4): p. 249-255.

Topics discussed in this review include physiology of orchid seeds, contributions by the fungus, orchid-fungus specificity and nucleic acid metabolism

47. Rasmussen, H.N., B. Johansen, and T.F. Andersen, *Symbiotic in vitro culture of immature embryos and seeds from *Listera ovata**. Lindleyana, 1991. 6(3): p. 134-139.

Immature embryos as well as seeds of *L. ovata* were successfully inoculated with a symbiotic fungus (*Epulorhiza* sp.). Symbiotic protocorms developed from embryos in all stages, whereas asymbiotic culture of embryos only succeeded if the capsules were almost mature. Germination percentage in mature seeds was higher in symbiotic than asymbiotic culture, and symbiotic protocorms developed faster. Inoculation of immature embryos could be a generally applicable method to propagate 'hard-to-germinate' orchid species and to test compatibility of fungi

48. Rasmussen, H.N., *Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination in vitro*. New Phytologist, 1990. 116(1): p. 137-147.

Seeds of *D. majalis* were sown in vitro with a compatible fungus (*Epulorhiza* sp.). Germination, and establishment of mycorrhiza, took c. 14 d in vitro. From day 9 the protein reserves in the embryo were hydrolysed, the protein vacuoles coalesced and starch accumulated in plastids. Certain epidermal cells developed nuclei about 8 times original volume and produced rhizoids which emerged from day 11. The mycorrhiza was established after infection through the rhizoids: hyphae formed pelotons in central cells with enlarged nuclei (16-64 times original volume). Intracellular hyphae developed close contacts with the hypertrophied host nuclei. Collapsed pelotons were observed in cells from day 12, one day after infection. Meristematic activity in the uninfected chalazal end of the seedling began on day 12. On day 28 the first vascular tissue started to develop and on day 35 the beginning of a leafy shoot could be detected

49. Rasmussen, H., B. Johansen, and T.F. Andersen, *Density-dependent interactions between seedlings of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) in symbiotic in vitro culture*. Physiologia Plantarum, 1989. 77(3): p. 473-478.

In vitro growth of the heterotrophic seedlings of *D. majalis* with a symbiotic fungus (*Rhizoctonia* sp.) was density-dependent, even at densities that are not high enough to exploit the growth medium fully. Competition was two-sided; increasing density among seedlings did not increase size inequality between them. The slowly growing and smaller seedlings are normally more likely to die than the bigger ones, but mortality was not increased by higher density within the studied range (2-128 seedlings/dish). Growth depression by neighbouring seedlings was independent of their physical distance but varied with the total number of seedlings sharing the same culture dish and the same mycelium. Therefore, if the growth-promoting effects of different fungi or treatments are to be compared in future work, the density of planting in the culture dishes should be comparable

50. Xu, J.T. and S.X. Guo, *Fungus associated with nutrition of seed germination of Gastrodia elata - Mycena osmundicola* Lange. *Acta Mycologica Sinica*, 1989. 8(3): p. 221-226.

M. osmundicola was isolated and identified from the protocorms of germinated seeds of *G. elata* orchids for the first time in China. Seeds infected by str. 01 of *M. osmundicola* could germinate. Band numbers and mobility of esterase isoenzymes of str. 01 were shown to be the same by PAGE

51. Tsutsui, K. and M. Tomita, *Suitability of several carbohydrates as the carbon sources for symbiotic seedling growth of two orchid species*. *Lindleyana*, 1990. 5(2): p. 134-139.

The suitability of mono-, di- and polysaccharides in symbiotic cultures was investigated with three orchid-fungus combinations: *Spiranthes sinensis* with binucleate *Rhizoctonia* isolate No. 706, *S. sinensis* with *R. repens* isolate No. 624, and *Liparis nervosa* with isolate No. 624. The orchid seeds were sown on inoculated oat-agar medium. Cellulose and inulin were good carbon sources for all combinations. In general, mono- and disaccharides were inferior to these polysaccharides. This may be due to their early depletion in the media as a result of rapid uptake and utilization by the fungi. Pectin was also a good carbon source for *S. sinensis* when associated with isolate No. 706, but it was harmful to the orchid when associated with isolate No. 624. Mannitol was utilized very slowly by the fungi and was a good carbon source for symbiotic seedlings of *S. sinensis* but not so for those of *L. nervosa*. Galactose and galacturonic acid were detrimental to the orchids but were as suitable for the fungi as other soluble sugars. Galactose was as appropriate as other soluble sugars as a carbon source provided that orchids did not come into direct contact with it

52. Rasmussen, H., T.F. Anderson, and B. Johansen, *Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of Dactylorhiza majalis (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus*. *Plant, Cell & Environment*, 1990. 13(2): p. 171-177.

In vitro germination and development of *D. majalis* seeds in the presence of a *Rhizoctonia* strain was very temperature dependent. There was a marked decline in germination percentage at temperatures more than 23-25 deg C. Seeds that germinated at higher temperatures exhibited only slight or no mycorrhizal development and developed few or no rhizoids compared with seedlings raised at optimal or lower temperatures. When 6-week-old seedlings were grown for an additional 4 weeks at temperatures ranging from 10 deg to 28 deg the rate of increase of seedling length was highest at 23-24.5 deg . When grown at 26 deg , seedlings had smaller starch reserves than those grown at lower temperatures and increased in length as much as those kept at 13 deg . At 23-24.5 deg , seedlings grew to a larger size before shoot initiation than those kept at higher or lower temperatures. At 23-24.5 deg seed germination in the presence of *Rhizoctonia* was about double that in the absence of the fungus, and seedling length increased at 45% per week in the presence of the fungus compared with 30% in its absence

53. Tsutsui, K. and M. Tomita, *Effect of plant density on the growth of seedlings of Spiranthes sinensis Ames and Liparis nervosa Lindl. in symbiotic culture*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1989. 57(4): p. 668-673.

Seeds of each species were cultured with *Rhizoctonia* isolates on a medium containing a decoction of 25 g oats/litre and 1% agar, and the seedlings were transplanted to fresh medium at densities ranging from 1 to 10 per 60 ml medium. At high densities, the weights of individual seedlings after 10-16 weeks were

proportional to the volume of medium per plant. At densities more than 1 plant/60 ml for *S. sinensis* and more than 2 plants/60 ml for *L. nervosa*, the rate of FW increase decreased with increasing seedling density. Mycelium DW per culture flask also decreased with increasing seedlings density. The density effect was thought to be the result of competition for nutrients in the medium, rather than competition for space between the aerial parts

54. Mitchell, R.B., *Growing hardy orchids from seeds at Kew*. Plantsman, 1989. **11**(3): p. 152-169.

The symbiotic and asymbiotic techniques used at the Royal Botanic Gardens for raising hardy terrestrial orchids are described. Details are given of the isolation and storage of mycorrhizal fungi; seed collection, sterilization, sowing and germination media; transferring and growing-on protocorms; natural growth cycles of seedlings; weaning seedlings in the greenhouse; and establishing seedlings outdoors

55. Wilkinson, K.G., K.W. Dixon, and K. Sivasithamparam, *Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids*. New Phytologist, 1989. **112**(3): p. 429-435.

Endotrophic bacteria were isolated from the mycorrhizal tissues of 12 of 13 species of Western Australian terrestrial orchids tested. The bacteria were placed into 8 groups based on UV light fluorescence, Gram staining and colony characteristics. The most commonly isolated bacteria from 9 of the 12 orchid species sampled were str. within the *Pseudomonas fluorescens-putida* group. The abundance of bacteria followed a seasonal pattern that differed between orchid genera especially on the basis of the morphology of fungus infected tissue. There was little evidence of specificity of bacterial groups to orchid taxa or part of the plant infected by the fungus. Symbiotic germination of *Pterostylis vittata* seed in association with 7 bacterial isolates showed a significant promotion of germination and seedling development with 3 bacterial str. The influence of a fourth str. was no different to the control while the remaining 3 str. significantly suppressed seedling development

56. Masuhara, G. and K. Katsuya, *Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids*. Scientia Horticulturae, 1989. **37**(4): p. 331-337.

Effects of mycorrhizal fungi on germination and the early growth stage of *Spiranthes sinensis* var. *amoena*, *Ponerorchis graminifolia* [*Gymnadenia* sp.] and *Bletilla striata* were investigated in vitro. Fungi isolated from protocorms or roots of 2 wild and 4 cultivated orchids were used in the germination test with mature seeds of the 3 species on oatmeal agar. Promotion of germination and stimulation of protocorm growth were observed in *S. sinensis* var. *amoena* and protocorm growth was also observed in *P. graminifolia*. However, the symbiotic method was not effective for protocorm growth in *B. striata*

ANEXO 2. CONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS (IUCN).

(basado en Orchid Conservation News.1999 (2) 8-10)

Traducido por Mauricio Cisternas Báez, Escuela de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso.

Diversidad

Las Orchidaceae están entre las familias de plantas con flores más grandes del globo. Los últimos reportes estiman alrededor de 20.000 especies. No solo son importantes en número, sino también en la complejidad, mecanismos de polinización, colores y fragancia de sus flores. Las orquídeas crecen en todos los ecosistemas terrestres, a excepción de los polos y desiertos extremadamente secos, encontrándose la mayor diversidad en los trópicos. Estas plantas crecen en diferentes tipos de hábitat, siendo la mayoría especies con crecimiento epifíticas.

Muchos factores confunden el número exacto de especies dentro de esta familia, en algunos casos por el extensivo rango geográfico, tendiendo a tener diferentes nombres para cada región o país, y también por su importancia florística, las orquídeas son redundantemente descritas por los cultivadores, siendo común las sinonimias en este grupo de plantas. Además, la falta de botánicos dedicados a trabajar en revisiones taxonómicas ha contribuido a limitar las estimaciones reales del número de especies de orquídeas.

Las *orchidaceae* han evolucionado rápidamente hacia un polinizador que en muchos casos es específico. La gran cantidad de semillas que favorecen la expresión de la variabilidad genética, alta tasa de dispersión a través de barreras ecológicas y geográficas, ciclo de vida relativamente rápido, alta plasticidad en arquitectura floral y la adaptación a diferentes hábitat, han gatillado la gran diversidad en esta familia.

Distribución

La diversidad de orquídeas se encuentra mayormente en los trópicos que en cualquier otro tipo de ecosistema, reconociéndose alrededor de 36 géneros, y comprendiendo un total de 10849 especies, siendo los géneros *Pleurothallis*, *Epidendrum*, *Bulbophyllum* y *Dendrobium* los más numerosos del Neotrópico. Las orquídeas epifitas de las zonas del África tropical y Australia-Asia están pobremente representadas en este hemisferio.

Un reciente estudio de las especies de orquídeas del nuevo mundo, ha permitido estudiar la distribución de estas dentro del hemisferio. Se reconocen 10967 especies, principalmente en el sur de América Central y noroeste de América del Sur. Países como Ecuador (3270 sp.) y Colombia (2899 sp.) tienen la mayor diversidad de orquídeas, y Costa Rica y El Salvador tienen el mayor número de especies por Km², cabe destacar que Chile posee el menor número de especies por Km².

Varios factores parecen influir en la distribución de las orquídeas. Así se propone que la diversidad de orquídeas epifitas incrementa a lo largo de una gradiente latitudinal y de humedad. Según este análisis las zonas neotropicales con mayores precipitaciones anuales presentan mayor número de especies (Costa Rica 4000 mm), y la mayor diversidad de especies aparece entre los 1000-2000 m.s.n.m de altitud.

El endemismo local es poco citado en publicaciones sobre flora orquideológica o monografías, principalmente debido a la concentración de las investigaciones sobre endemismo que han sido dirigidas a pocos lugares, impidiendo conocer la situación actual. Se necesita compilar una lista global de especies de orquídeas para hacer una valoración realista del grado de endemismo, y lo más importante, identificar áreas/países que han recibido poca atención de parte de los investigadores.

Conocimiento actual de las Orquídeas

El conocimiento actual ha evolucionado rápidamente en el campo de la orquideología en los últimos diez años. Con el estudio del DNA, a través de marcadores moleculares y junto con estudios anatómicos y caracteres morfológicos, han logrado grandes avances en el área de la filogenética. Sin embargo, se necesitan estudios sobre sistemática de especies y géneros complejos que ayuden a comprender la clasificación de muchas especies problemáticas, de las cuales se sabe muy poco (Ej.: *Chloreinae*). Además se requiere mayor conocimiento sobre ecología de orquídeas, especialmente en aquellas áreas de alta diversidad y endemismo local. Para ello, es necesario reunir esfuerzos para proteger algunas de estas áreas, aminorando aquellas amenazas que ponen en peligro la estabilidad de estas especies y su complejo equilibrio con el ecosistema.

Amenazas para la conservación

Muchas especies de orquídeas están consideradas en alto riesgo de extinción como un resultado, directa o indirectamente, por dos tipos de actividades humanas:

Alteración del hábitat o destrucción derivada del cambio en el uso del entorno natural, y la extracción de plantas nativas para su posterior tráfico. Sin embargo, no todas las taxas están igualmente amenazadas por estos factores. De otra manera, la colección de plantas para tráfico, afecta mayoritariamente a aquellas taxas que presentan flores vistosas, o proveen de algún producto comestible (e.g. salep, vainilla). Sin embargo, la pérdida del hábitat, es la principal amenaza para la mayoría de las orquídeas.

El grado en el cual estos factores pueden afectar a cada especie de orquídea, varían según la distribución geográfica, especificidad de hábitat y tamaño de las poblaciones. Además estos criterios proveen de una base para la estimación relativa de la rareza para las orquídeas y otras plantas. Siendo estas las plantas más propensas a la extinción, debido principalmente a su estrecha distribución geográfica, hábitat muy reducidos, éstas se ven afectadas drásticamente por la actividad humana.

La destrucción, modificación y fragmentación del hábitat, son consideradas las principales amenazas para la biodiversidad, especialmente en los trópicos, donde es alta la diversidad de orquídeas y los programas de conservación no están dentro de las prioridades de las naciones. En los últimos años la creciente tasa de deforestación, ya sea modificación o destrucción completa de los bosques y la irreparable modificación que sufre el paisaje, han mermado notablemente las poblaciones de orquídeas, principalmente para satisfacer el incremento de las poblaciones a través del desarrollo urbanístico.

Desafortunadamente no todas las especies logran adaptarse a nuevo hábitat. Muchas de ellas sucumben al cambio climático, así las pocas especies que logran colonizar un nuevo hábitat están constantemente en peligro por presión de origen antropogénico.

Las actividades forestales y agrícolas han tenido gran influencia en la sobrevivencia de las orquídeas. Las actividades de explotación y maderero frecuentemente implica modificaciones en la intensidad lumínica, humedad, y otros factores microclimáticos que afectan la sobrevivencia de especies epífitas, aunque también se altera la ecología del suelo y con ello la relación micorrízicas de las especies terrestres. La introducción de especies arbóreas exóticas para plantaciones comerciales, tales como *Pinus sp* y *Eucalyptus sp*, causan una evidente pérdida de biodiversidad. Comúnmente estas especies son altamente invasoras y alelopáticas desplazando a la flora nativa. La agricultura con la remoción de la cubierta vegetal y el establecimiento de plantaciones de café, cítricos y otras especies arbóreas, han afectado gran parte de la carga de orquídeas epífitas en la regiones tropicales. Además, la rápida pérdida de los nutrientes de los suelo tropicales llevan constantemente a la abertura de nuevos terrenos selváticos para ser usados en la agricultura.

También en las zonas templadas las actividades agrícolas como cultivos de papas y trigo pueden causar la total extirpación de individuos en praderas colonizadas por orquídeas.

La fragmentación del hábitat (cualquier efecto de origen antrópico o natural que provoque la separación o transformación del área de distribución de las poblaciones), reduce los tamaños de las poblaciones, afectando la dispersión y flujo génico entre las subpoblaciones restantes, exponiendo a las orquídeas a condiciones marginales, esto también produce efectos indirectos al reducir o eliminar la tasa de polinizadores.

La actividad Humana es quizás la mayor amenaza a las poblaciones de orquídeas en áreas densamente pobladas (e.g. Europa Central), aunque también representa un problema en países en desarrollados donde hay poco o simplemente no existe control del crecimiento urbanístico. Los grandes proyectos de desarrollo vial han afectado negativamente las poblaciones de orquídeas, no solo por alteración del hábitat, sino también, por los procesos de construcción de estos mismos.

La exagerada colección de plantas desde poblaciones silvestres para tráfico internacional, hortícolas y coleccionistas aficionados, son una de la mayores causas de declinación de muchas orquídeas vistosas, llegando a límites de la extinción de algunas taxas. Especies del género *Paphiopedilum* y *Phragmipedium* han sido sobre colectadas, y gran parte de las poblaciones han desaparecido, incluyendo aquellas ubicadas en áreas protegidas. La situación crítica de esta especies llevo a su total inclusión en el apéndice I de CITES. También las orquídeas son a veces colectadas por propósitos alimenticios (e.g. *Vanilla*, *Aa*) disminuyendo sus poblaciones.

Estrategias de Conservación

Muchas especies de orquídeas han sido sujeta al tráfico internacional desde principios del siglo 18, cuando recién despierta el interés por estas plantas. Hoy en día, sin embargo el tráfico de especímenes colectados en la naturaleza ha ido en aumento hasta llegar a la extinción de algunas especies, por lo que ha sido urgente proteger estas plantas.

En 1973 se desarrolla la Convención para el Trafico Internacional de Especies en Peligro de la Flora y Fauna Silvestre (CITES). Desde que CITES entra en vigencia, la familia completa de las Orchidaceae esta incluida en sus apéndices, debido a que es difícil distinguir la categoría de las especies (amenazadas o no).

7 especies y 2 géneros están incluidas en el apéndice I, todas las otras especies están incluidas en el apéndice II. (todos los híbridos de orquídeas están cubiertos por CITES).

Sin embargo, las orquídeas no han recibido adecuada atención por el tráfico de plantas de la convención CITES, por lo que se ha creado la OSG (Grupo de Especialistas de Orquídeas) relacionado a CITES, e involucra varios aspectos a considerar en la convención, tales como:

- Análisis de las listas de orchidaceae que están en el apéndice I
- La conservación de especies de orquídeas amenazadas por el tráfico internacional
- Lista de chequeo de orquídeas
- Implementación de la regulación CITES para el tráfico en propagación artificial de especies de orquídeas y sus híbridos.
- Estimulación de propagación artificial
- Educación y servicio de información sobre conservación (e.g. jardines botánicos), tráfico (criaderos de plantas y asociaciones de tráfico de plantas), y coleccionistas (asociaciones de orquídeas nacionales e internacionales)

Conservación *in situ*

La estrategia de conservación *in-situ*, es el aspecto más importante en la conservación de orquídeas, que permite mantener una población dentro de una comunidad ecológica, conservando su hábitat original. Las poblaciones de orquídeas pueden ser manejadas efectivamente dentro de pequeñas áreas, basándose en varios aspectos ecológicos que incluye una evaluación de la diversidad local y detalles observados por especialistas. Así el manejo de las orquídeas en áreas protegidas o privadas será altamente importante, si la biodiversidad está adecuadamente conservada.

A pesar que las orquídeas son el grupo de plantas más populares, existe muy poco conocimiento sobre su ecología. La falta de información y de investigadores en esta área limita las acciones rápidas y oportunas para estabilizar la declinación de las poblaciones.

En general las orquídeas tienen una corta expectativa de vida, debido a sus nichos ecológicos, que son flujos sucesionales y porque están sujeto a numerosos eventos catastróficos, que limitan su expectativa de vida.

Además por su gran inversión en reproducción, grandes inflorescencia, flores atractivas y grandes cantidades de pequeñas semillas, les permite a las orquídeas colonizar nuevos hábitat temporales. Así muchas especies de la zonas templadas presentan estrategias de sobrevivencia, cuando sus ambientes ideales son transitorios, adaptándose a un nuevo hábitat.

Desde el punto de vista ecológico, las orquídeas son generalmente consideradas plantas adaptadas a condiciones de stress y disturbios, permitiendo a muchas orquídeas comportarse como malezas, desarrollándose en áreas dramáticamente alteradas, donde su protección inmediata es imposible.

Dentro de las consideraciones de manejo, el diseño de las reserva, manejo de polinizadores, uso de áreas privadas, restauración y monitoreo son los principales componentes para una efectiva conservación *in-situ*.

Conservación *ex situ*

Las orquídeas a diferencia de otras plantas son extremadamente fecundas, una cápsula produce miles de semillas, cuya germinación en condiciones naturales es muy baja, restringiendo el desarrollo de estas plantas a pequeñas áreas, haciéndolas altamente vulnerable y excelentes candidatas para la conservación *ex situ*.

La conservación *ex situ*, permite mantener muestras representativas de la diversidad genética de las especies y sus poblaciones, fuera de sus hábitat originales.

Para fines de conservación *ex situ*, se deben extraer algunas plantas del medio natural, preferentemente de aquellos hábitat que están destruidos y que no tienen opción de regeneración. Un rescate oportuno de muchas orquídeas permitirá que este material sirva de base para la propagación artificial, ayudando a perpetuar a muchas especies.

El rol de los jardines botánicos, es muy importante al mantener colecciones vivas de plantas, además viveros y coleccionistas aficionados, contribuyen significativamente al coleccionar material genético (polen, semillas, material vegetativo, etc.) que pueden compartir entre ellos, manteniendo diversificado un gran pool genético.

Uno de los objetivos más importante en la conservación *ex situ*, es disponer rápidamente de plantas nuevas y raras reproducidas artificialmente para los viveros y jardines botánicos, así aquellas especies más deseables, en peligro y que generalmente son especies nativas, son protegidas de su exterminación al contar con grandes cantidades de plantas que satisfacen las necesidad del mercado.

Para preservar la diversidad de orquídeas, se requieren de estudios florísticos y biogeográficos, antes de determinar las estrategias de conservación a seguir, focalizando en mantener las orquídeas *in situ* más que *ex situ*, ya que con esta última estrategia solo permite preservar el pool genético de algunos individuos dentro de la especie, pero no del taxón, no preservando el potencial evolutivo a largo plazo de la especie.

En la actualidad, la protección, manejo y restauración de hábitat naturales es el mejor y más barato método de preservación de diversidad biológica y de estabilidad de ecosistemas globales.

Necesidades de investigación para la conservación de orquídeas.

- Se requiere más estudios florísticos y monografías, especialmente en aquellos géneros o áreas donde no exista información disponible.
- Reconocimiento de áreas de alta diversidad y endemismo, basada en información precisa.
- Reconocimiento de hábitat y especies las cuales se encuentran en situación critica de conservación, basados en trabajos de campo.
- Colección de información sobre la historia natural y ecología de las especies de orquídeas investigadas.
- Investigación demográfica sobre orquídeas, estableciendo modelos para el manejo de otras especies.
- Efectos demográficos y genéticos de la fragmentación del hábitat.
- Clases de manejos necesarios para realzar la preservación de la diversidad de orquídeas en sistemas agrícolas.

Educación

Una serie de instituciones y organizaciones pueden jugar un importante rol en promover la educación y reglamentación para la preservación de las orquídeas.

Los jardines botánicos, las áreas protegidas y reservas naturales son una de las mejores vías para diseminar y promover la información a una gran cantidad de personas sobre educación ambiental, relacionados a la familia orchidaceae, a través de exposiciones y programas que visualicen la diversidad orquideológica, hábitat y los diferentes peligros que amenazan la sobrevivencia de las orquídeas.

Las sociedades orquideológicas cumplen un importante papel en reforzar las prácticas y comportamiento éticos, permitiendo el intercambio de información con comunidades locales, capacitándolas en el uso de los recursos naturales, diseminando programas sobre cultivo y propagación de especies raras a viveros y coleccionistas aficionados.

Las autoridades deben mantener contacto oportuno con individuos y sociedades organizadas dentro de su jurisdicción, de manera que estén al tanto de la legislación que pudiera afectar a las orquídeas y su conservación.

Las organizaciones no gubernamentales (ONG) deben trabajar con otros grupos conservacionistas y autoridades, para educarse los unos a los otros respecto de las peculiaridades de las orquídeas y sus requerimientos. Es importante que formulen puntos de vistas consistentes, explicando el razonamiento que les da apoyo y trabajando para un consenso mutuo.

El Grupo de Especialista en Orquídeas (OSG) debe ayudar al comité de plantas de CITES en sus evaluación de los apéndices, estimulando la investigación sobre comercio y estado de conservación, y compartiendo información.

Orquídeas Chilenas

Las orquídeas Chilenas comprenden los géneros *Aa*, *Bipinnula*, *Brachysteles*, *Chloraea*, *Codonorchis*, *Gavilea* y *Habenaria*, con un total de 51 especies, de las cuales 24 son endémicas (47%), siendo todas las especies terrestres, eventualmente epífitas y litófitas.

Se distribuyen desde la latitud 18° y 22° S, hasta Tierra del Fuego 55° S. Sus rangos de hábitat van desde bosques prístinos hasta orillas de carreteras, incluyendo praderas de pastoreo, bordes de bosques y eventualmente pantano.

A pesar que las *Orchidaceae* han sido extensamente estudiadas en otras partes del mundo, en Chile es uno de los últimos grupos de plantas con flores estudiados. A la fecha no existe legislación nacional para proteger nuestras orquídeas.

Amenazas de las orquídeas chilenas

-Destrucción del hábitat causado por urbanización, como por ejemplo la construcción de caminos o desarrollo de centros recreacionales en biotopos costeros.

-La variabilidad genética y sobrevivencia de varias especies representada en áreas protegidas no esta garantizada (e.g. Ganado vacuno en área protegidas)

-Muchas orquídeas crecen a orillas de caminos y lugares accesibles a visitantes que colectan flores y ocasionalmente plantas completas.

-Introducción de animales exóticos para propósitos de caza, devoran las raíces, destruyendo poblaciones completas.

-Consumo de rizomas (e.g. *Aa* es consumida por lo lugareños en la I región)

-Marcada tendencia como maleza y son comúnmente encontradas en bordes de caminos y en hábitat de sucesión temprana. Desafortunadamente estas áreas son dramáticamente intervenidas y su protección inmediata es imposible.

-Presencia de malezas invasivas como *Ulex europeus* y *Teline monspessulana* reducen dramáticamente la vegetación nativa, incluyendo a las orquídeas.

-Indiscriminado uso de herbicida en plantaciones forestales han mermado fuertemente las poblaciones, especialmente en la zona centro-sur (e.g. *Chloraea crispa* en plantaciones de *Pinus sp.* en la localidad de Yumbel.

-Indiscriminado uso de pesticidas en la actividad silvoagropecuaria han disminuido las poblacionales de los polinizadores, que en muchos casos son específicos, lo que asociado a una baja polinización efectiva y baja cuaja de frutos, hacen dramático el descenso del éxito reproductivo en poblaciones aisladas.

-Tala forestal y trabajos asociados (poda, madereo, raleo, etc.)

-Apertura de terrenos para la actividad agrícola y forestal, transformando el paisaje y con ello la vegetación nativa, afectando la sobrevivencia de las orquídeas.

-Incendios forestales afectan gravemente los ecosistemas y con ello a las poblaciones de orquídeas

Necesidades de conservación

Efectivo establecimiento de estrategias de conservación para las orquídeas chilenas.

Objetivo a corto plazo:

- Urgente estudio taxonómico de los géneros de orquídeas chilenos.
- Actualización el inventario de orquídeas chilenas
- Determinación de la distribución actual, períodos de floración y abundancia de las especies.
- Determinación de áreas de alta diversidad y endemismo.
- Identificación de especies amenazadas y aplicación de las categorías de la “lista roja” de la IUCN.
- Identificación de amenazas a la sobrevivencia de las especies de orquídeas y sus hábitat.
- Desarrollo e implementación de estrategias para controlar estas amenazas.

Objetivos a largo plazo:

- Recopilar información sobre sistemática, sistemas reproductivos y ecología de poblaciones. Esta información es crucial para desarrollar efectivas estrategias de conservación in situ y ex situ.
- Programas educacionales focalizados en conservación de orquídeas chilenas promovidas por diferentes instituciones de investigación y jardines botánicos.

ANEXO 3. PRESENTACIONES EN CHARLA DE DIFUSIÓN.

YUMBEL, 06 DE DICIEMBRE DE 2001.

PROYECTO ORQUIDEAS NATIVAS CHILENAS (Género *Chloraea*)

CHARLA Y DIA DE CAMPO



Enrique Matthei J.



Yumbel, Jueves 06 de Diciembre de 2001

CONTENIDOS

- I. Introducción Proyecto de Innovación FIA
- II. Estado Actual Proyecto de Innovación FIA
- III. Difusión Programa de Formación FIA



I. Introducción Proyecto de Innovación FIA

1.1 Origen del proyecto





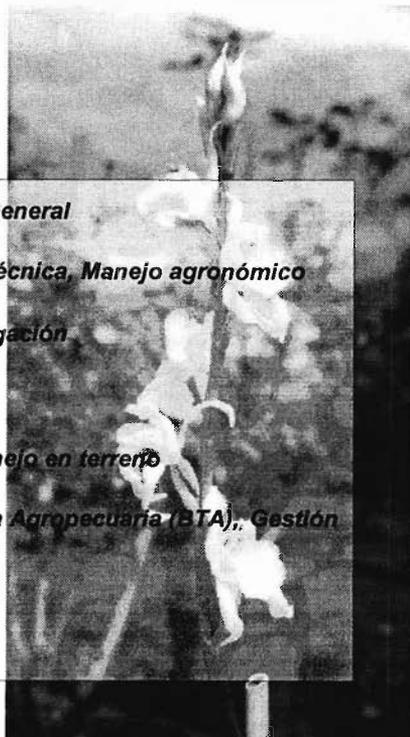
1.2 Presentación

- ***“Evaluación y multiplicación de especies orquídea nativa chilena (género Chloraea) para establecer las bases de un cultivo comercial en la octava región de Chile” FIA C98-1-A-022***
- ***Duración: 48 meses***
- ***Inicio : Diciembre de 1998***
- ***Unidades:***
 - ***Terreno: Los Ríos de Yahuiló (Yumbel) y UCV (Quillota)***
 - ***Laboratorio: UTA (Talca) y N. Garrido (Concepción).***
 - ***Gestión técnica y financiera: BTA (Santiago)***



1.3 Equipo de trabajo

- ***Enrique Matthei J., Coordinador General***
- ***Gabriela Verdugo R., Directora Técnica, Manejo agronómico***
- ***Ximena Calderón B., Micropropagación***
- ***Norberto Garrido G., Micorrizas***
- ***Michael Bourke, Recolección y manejo en terreno***
- ***Ximena Alvarez G., Biotecnología Agropecuaria (BTA), Gestión técnica y financiera***



II. Estado Actual Proyecto de Innovación FIA

*Ximena Alvarez G., Ing. Agr.
Biotecnología Agropecuaria S.A.*



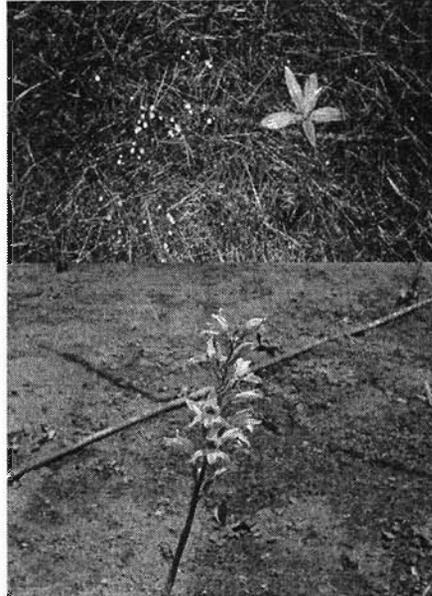
Objetivo General

Incrementar el conocimiento general y evaluar las especies de orquídea nativa chilena (género Chloraea) y optimizar su período vegetativo y reproductivo para fines comerciales en la VIII región de Chile.



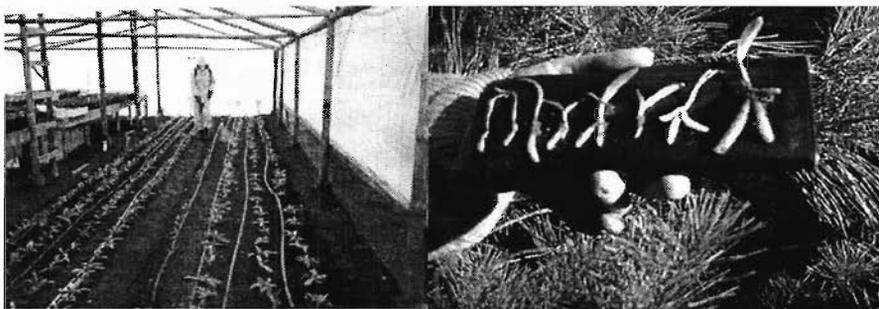
Objetivos Específicos

1. *Generar los conocimientos botánicos y fisiológicos (género *Chloraea*)*
2. *Evaluar y mejorar la eficiencia de los mecanismos de reproducción y el período vegetativo*
3. *Evaluar técnicas de micropropagación*



Objetivos Específicos

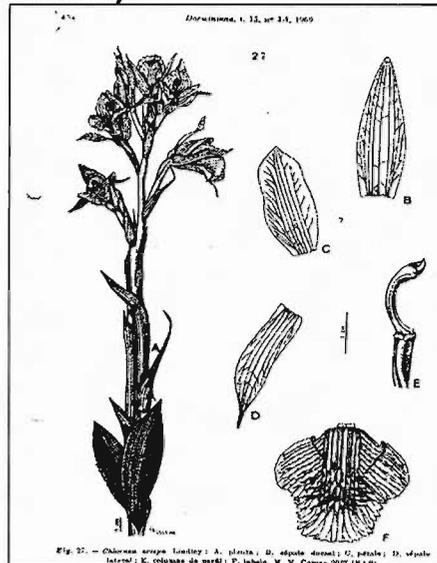
4. *Desarrollar un procedimiento de poscosecha*
5. *Evaluar técnica y económicamente los resultados del proyecto*
6. *Transferir la información generada*



Metodología

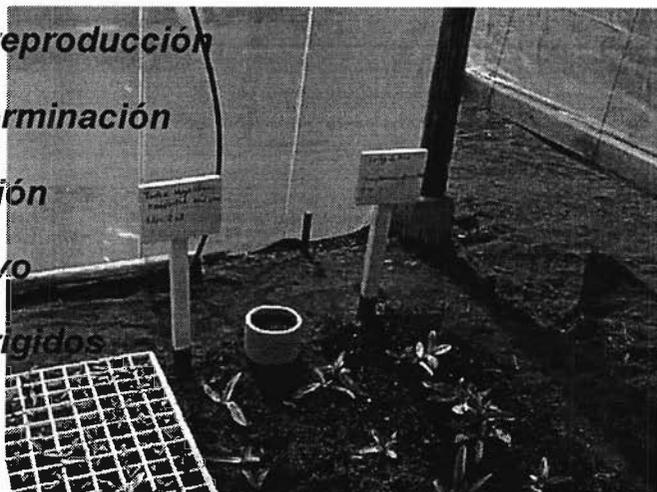
Obj. 1. Generar los conocimientos botánicos y fisiológicos (género *Chloraea*)

- *Recuperación bibliográfica del género *Chloraea**
- *Estudio de hábitat natural*
- *Recolección de material de diversas poblaciones*
- *Identificación de características relevantes*



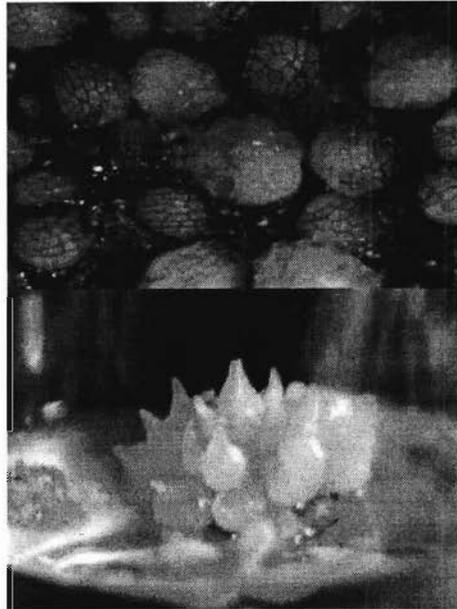
Obj. 2. Evaluar y mejorar la eficiencia de los mecanismos de reproducción y el período vegetativo

- *Mecanismos de reproducción*
- *Evaluación de germinación*
- *Épocas de floración*
- *Ensayos de cultivo*
- *Cruzamientos dirigidos*



Obj. 3. Evaluar técnicas de micropropagación

- *Evaluación de germinación in vitro*
- *Micropropagación vegetativa*
- *Aislamiento, identificación e inoculación con micorrizas*



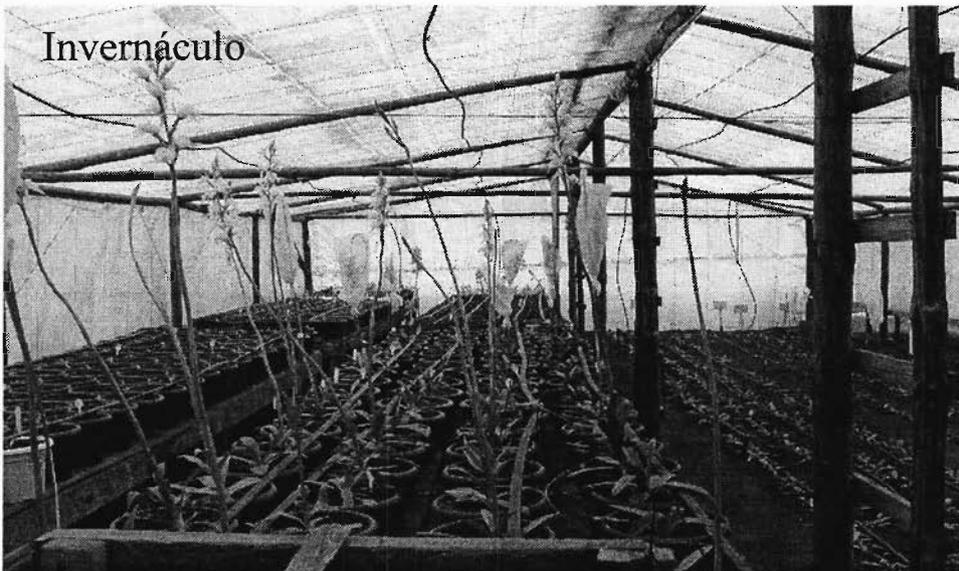
Obj. 4. Desarrollar un procedimiento de poscosecha

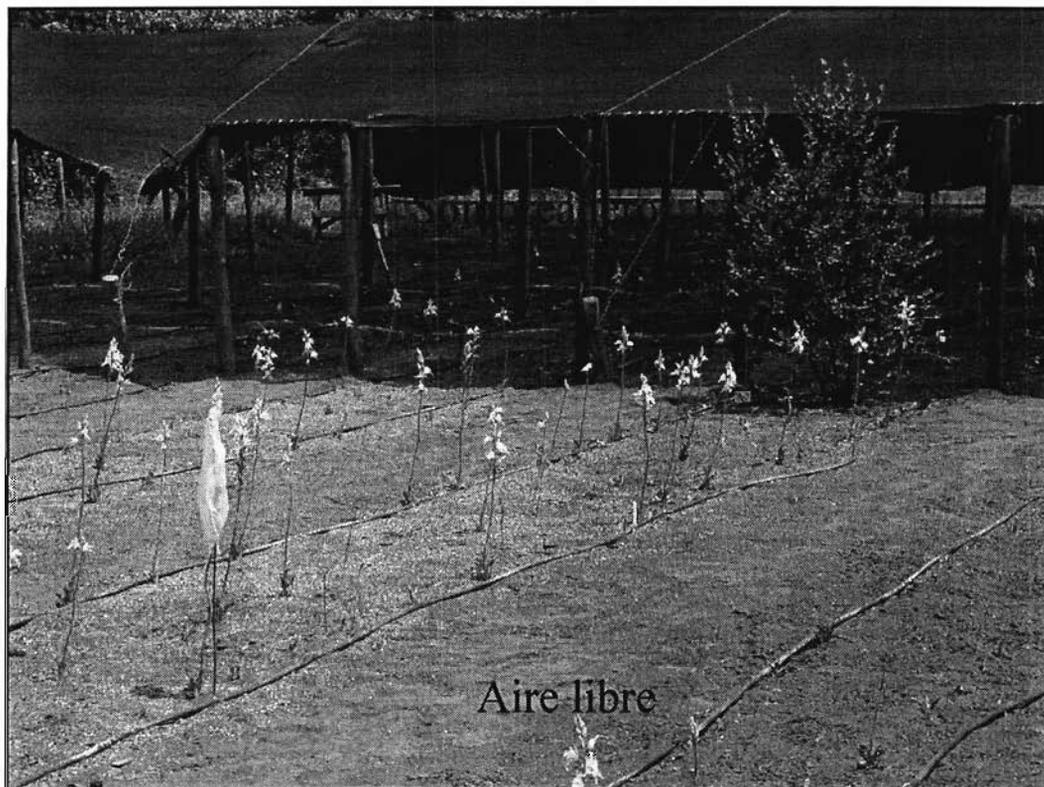
- *Duración inflorescencia*
- *Evolución bajo condiciones de simuladas de exportación*
- *Senescencia en flores individuales*



Obj. 5. Evaluar técnica y económicamente los resultados del proyecto

Invernáculo





Obj. 6. Transferir la información generada

- *Reuniones equipo técnico*
- *Días de campo*
- *Charlas técnicas*
- *Manual de producción*



Resultados a la fecha

- ***Base de datos agroclimática y edáfica***
- ***Evaluación de los mecanismos de reproducción y desarrollo: semillas y rizomas***
- ***Evaluación de técnicas de micropropagación: vegetativa y germinación in vitro***
- ***Análisis de poscosecha y características relevantes***

Proyecciones de líneas de investigación

- ***Desarrollo de líneas madres / variedades***
- ***Manejo de fertilización orgánica***
- ***Inoculación de semillas y plantas con micorrizas***
- ***Trasplante a terreno***



Ensayos agronómicos descripción y
evaluación del comportamiento de Chlorea
crispa como flor de corte

Proyecto FIA- Enrique Matthei

Investigadores:

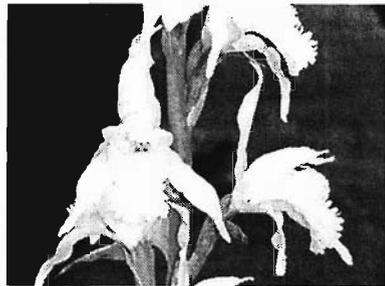
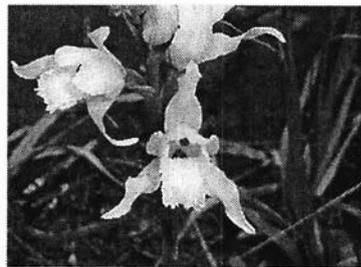
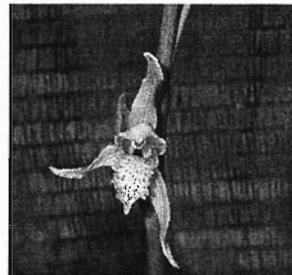
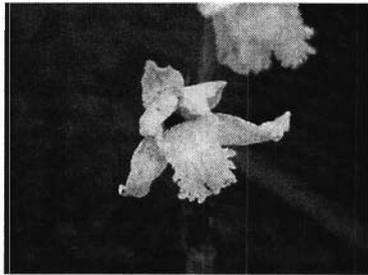
Gabriela Verdugo, Alejandra Uribe, Angélica Rendich,
Maritza Troncoso y Mauricio Cisternas



Desarrollo de la especie



Tipos de flores





Floración

Se desconoce el periodo juvenil

En general las plantas florecen
cada dos temporadas



Evaluaciones de calidad de la flor

- **Tiempo transcurrido entre aparición del primer botón y apertura del mismo 7 días**
- **Tiempo entre apertura del primer y último botón 28 a 35 días**
- **Tiempo entre apertura del primer botón y senescencia del mismo 49 días**

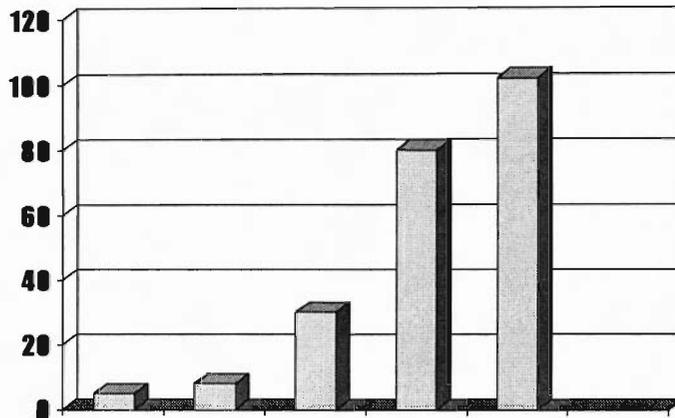


Floración

- **Número promedio de flores por vara 12
rango 6 a 18**
- **Promedio de flores abiertas simultáneas 11
rango de 6 a 15**



Crecimiento de varas florales



Duración de la flor después de cortada

- **Vida de florero vara completa 28 días**
- **Vida de florero de una flor separada de la vara 28 días**
- **Temperatura ambiente**



Tiempos de desarrollo de la flor individual fuera de la planta

- **Botón verde a blanco globoso 16.3 días**
 - **Botón blanco plano a blanco globoso 7 días**
 - **Botón blanco globoso a flor abierta 7 días**
-
- **Temperatura ambiente**



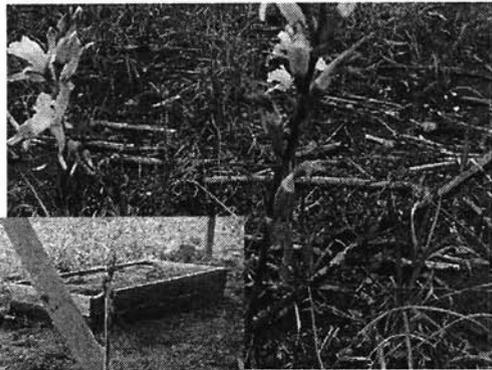
Estado del rizoma postfloración

- **En rizomas no florales se obtuvo una ganancia de peso promedio de 45.52 % con respecto al peso inicial del rizoma**
- **En rizomas florales se obtuvo una pérdida de peso de 25.81 % con respecto al peso inicial de los rizomas**

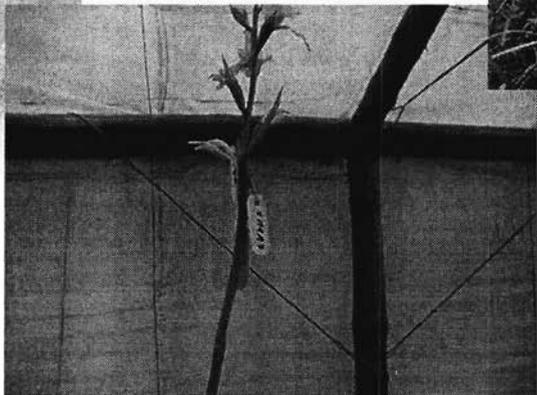


Problemas presentados

- **Botrytis y Phoma**

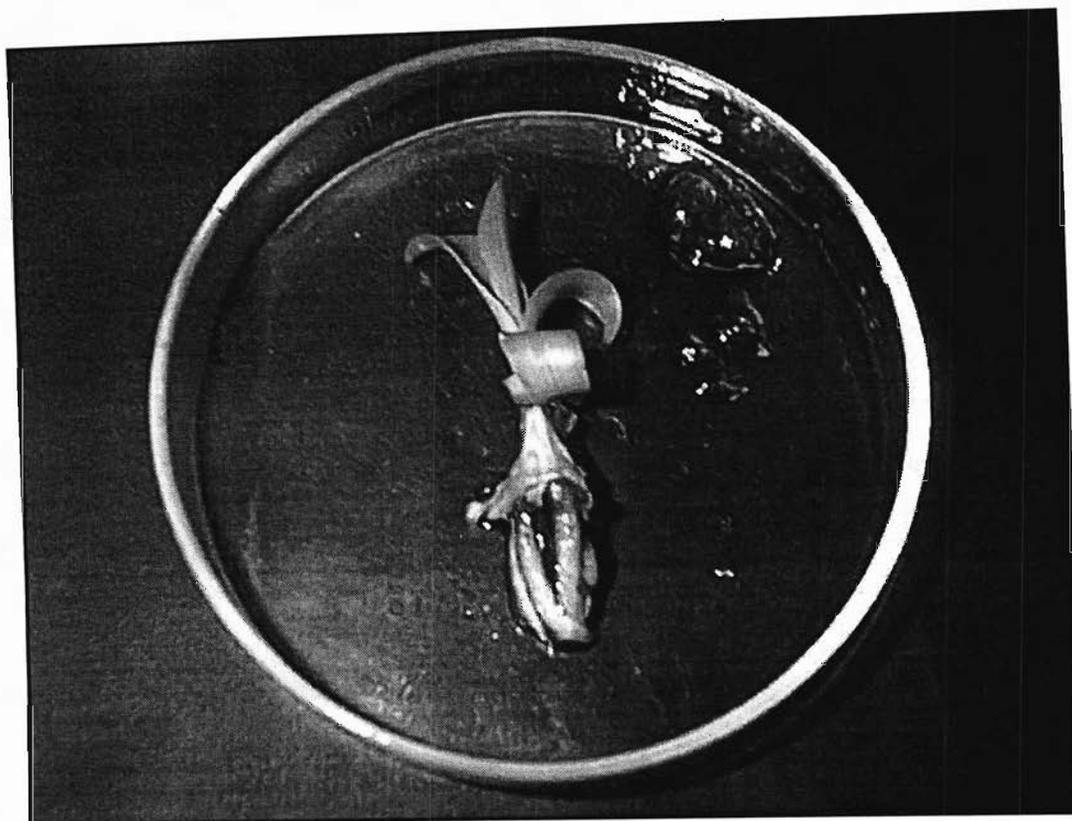


Cruzamientos



Continuara.....

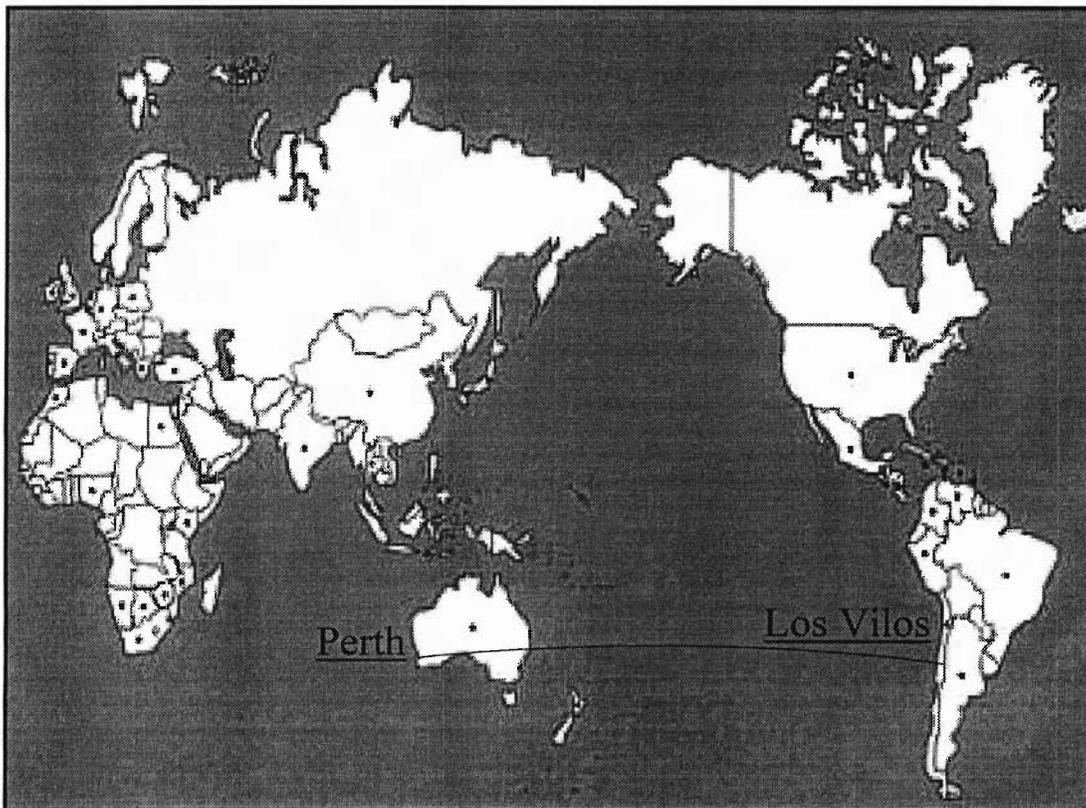




II. Difusión Programa de Formación

Introducción

- ***“Curso de Técnicas Especializadas de Conservación de Orquídeas y Congreso Internacional de Conservación de Orquídeas”***
- ***Cofinanciado por Programa de Formación de FIA***
- ***Institución: Kings Park and Botanic Garden***
- ***Lugar: Perth, Australia***
- ***Duración: 10 días***



Objetivo General

Aprender técnicas especializadas en manejo y conservación de orquídeas terrestres para potenciar el desarrollo futuro a escala comercial de las orquídeas nativas chilenas Chloraea.

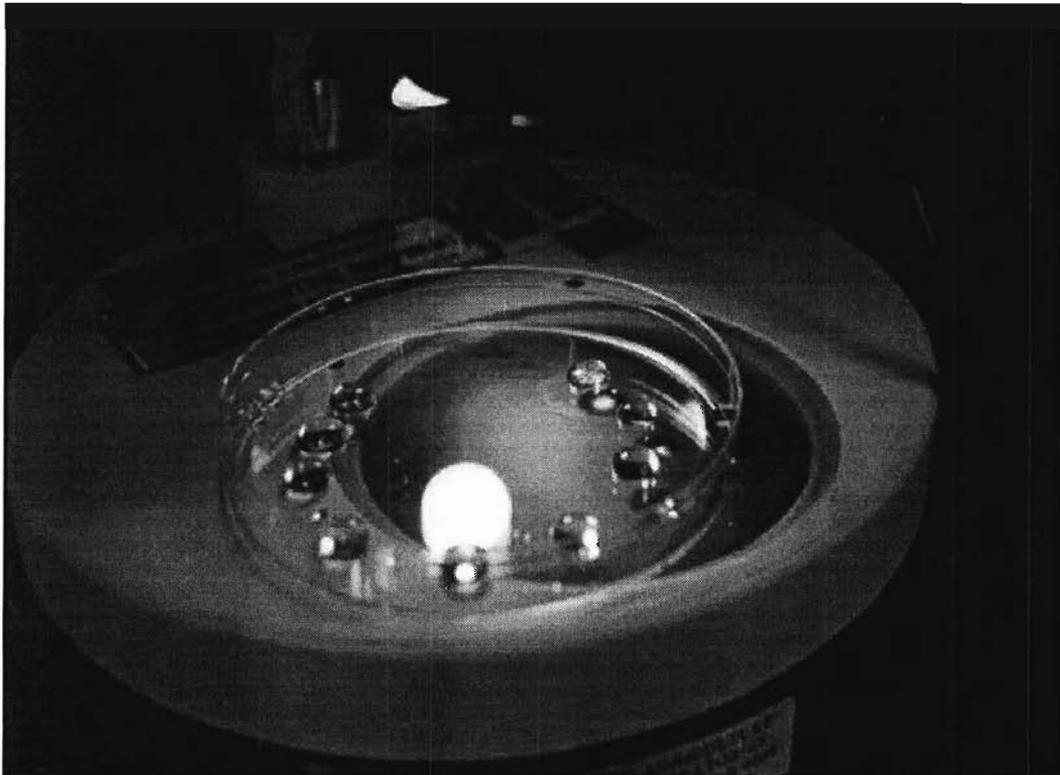
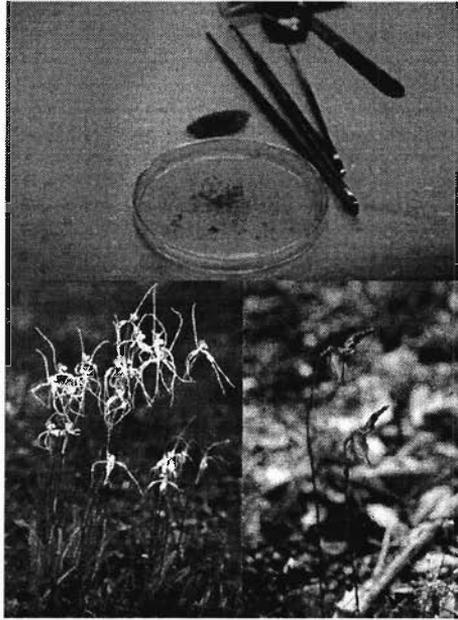


Objetivos Específicos

- 1. Mejorar el conocimiento en técnicas de conservación de Orquídeas Terrestres (OT).***
- 2. Aumentar conocimientos de germinación, polinización y multiplicación de OT.***
- 3. Establecer contactos con especialistas, investigadores y productores del rubro.***
- 4. Difundir aspectos técnicos-prácticos y teóricos obtenidos en las actividades.***

Participantes en la actividad

- *Enrique Matthei J.*
- *Ximena Calderón B.*
- *Mauricio Cisternas B.*
- *Ximena Alvarez G.*



Curso de Técnicas Especializadas de conservación de orquídeas

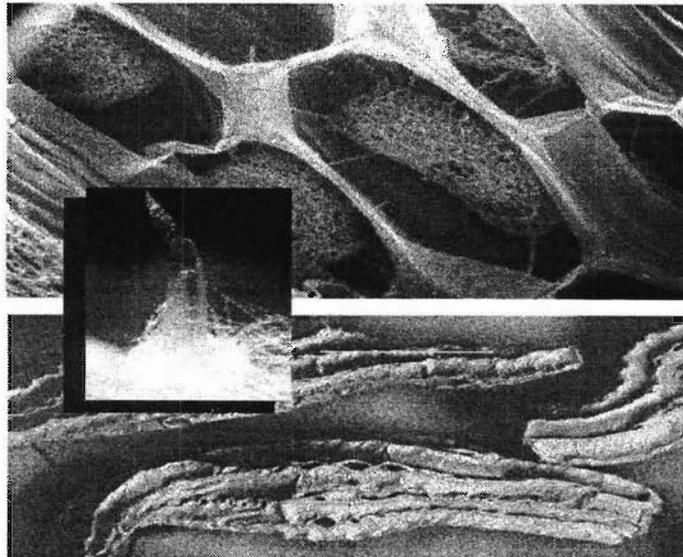
Dr Enrique Matthei J.

Ing. Agr. Ximena Alvarez (BTA)

Mauricio Cisternas (est U. Cato Vlpso)

Dr. Ximena Calderón Baltierra (U. Talca)

Orchid Conservation Techniques Manual



**ACTIVIDADES
REALIZADAS**

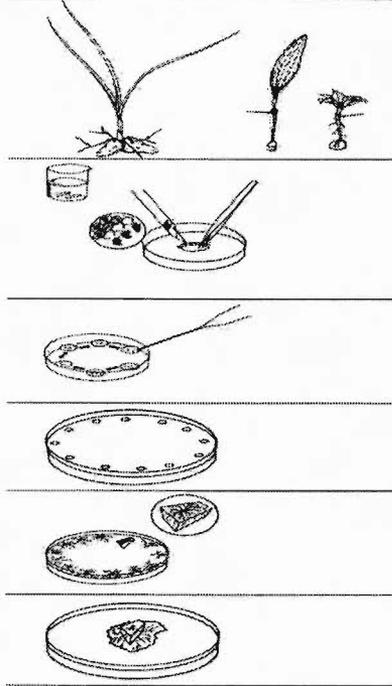
**AISLAMIENTO E
IDENTIFICACION DE
HONGOS**



AISLAMIENTO DEL HONGO

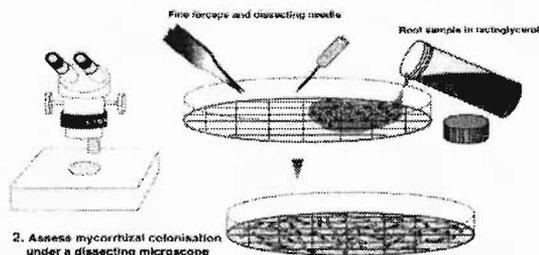
- Colección de plantas
- limpieza del material
- lavado de los
pelotones
- plaqueo de pelotones
- subcultivo de los
aislados

Diagram



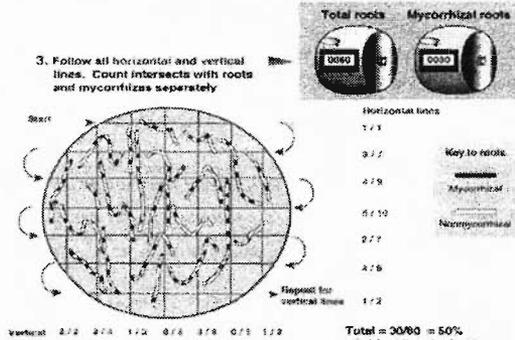
THE GRIDLINE INTERSECTION METHOD

1. Randomly disperse cleared and stained roots in dish with grid lines



2. Assess mycorrhizal colonisation under a dissecting microscope

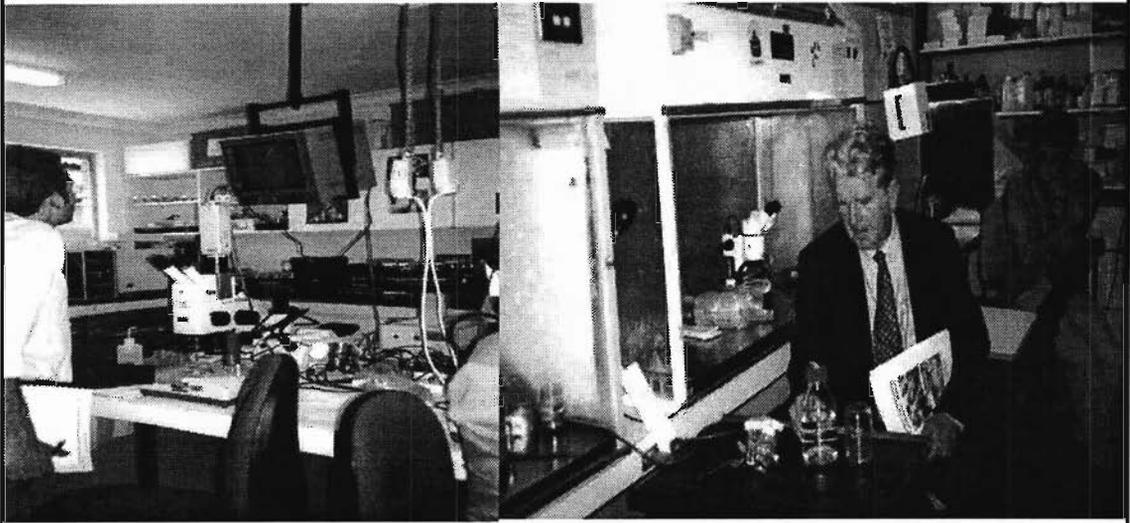
3. Follow all horizontal and vertical lines. Count intersects with roots and mycorrhizas separately





AISLAMIENTO DEL HONGO

- Colección de plantas
- limpieza del material
- lavado de los
pelotones
- plaqueo de pelotones
- subcultivo de los
aislados

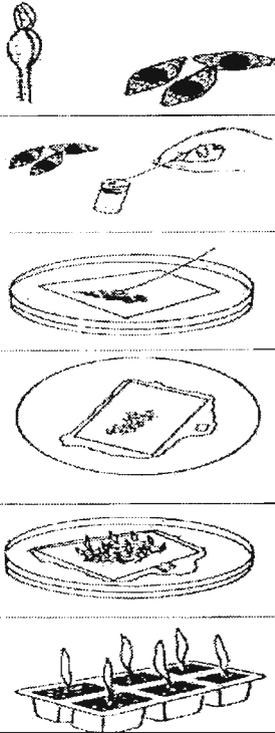


1. PROPAGACION SIMBIOTICA DE ORQUÍDEAS TERRESTRES

ETAPAS

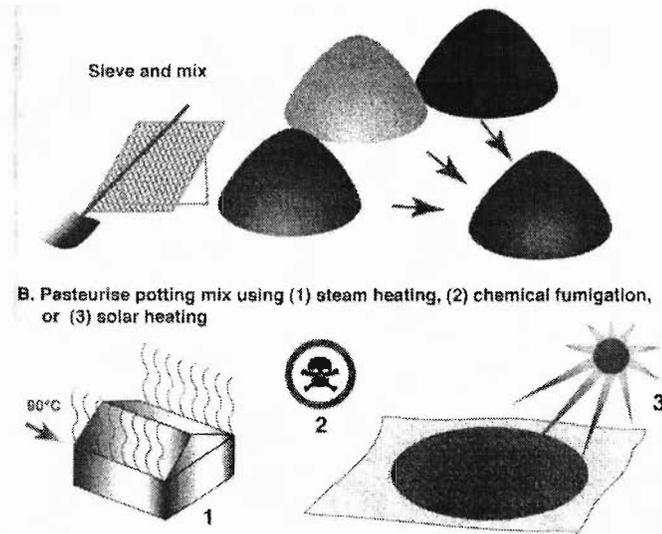
- colección de semillas
- Esterilización
- remojo
- infección
- inoculación con hongo
- germinación semilla
- crecimiento
- Identificación del hongo

Diagram



Interesante
día
de
campo!!!

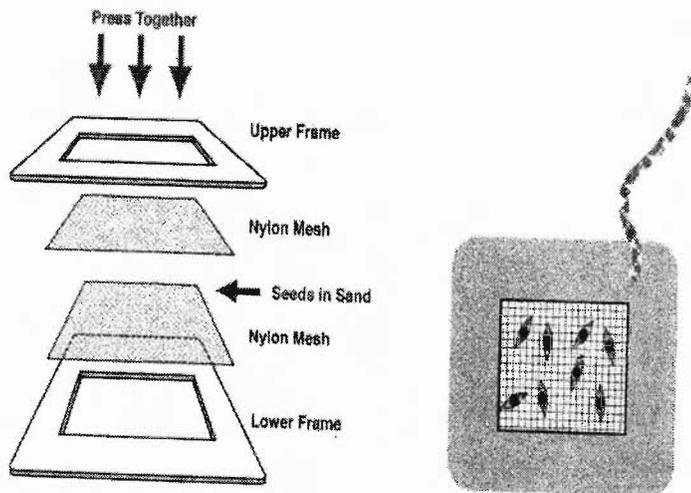
PREPARACION DEL COMPOST



Win98:

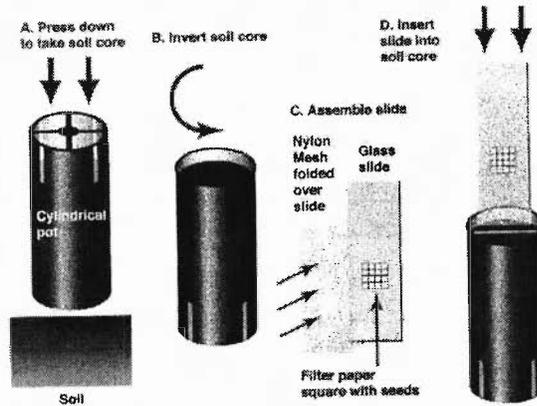
INFECCION DE SEMILLAS EN TERRENO

(THE SLIDE FRAME BAITING METHOD)

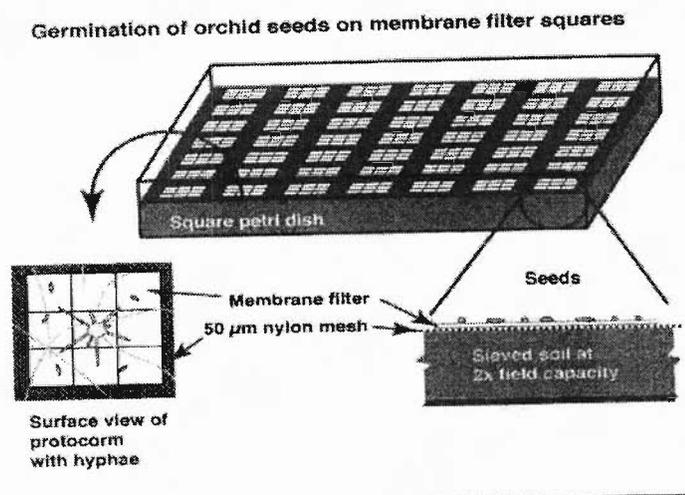


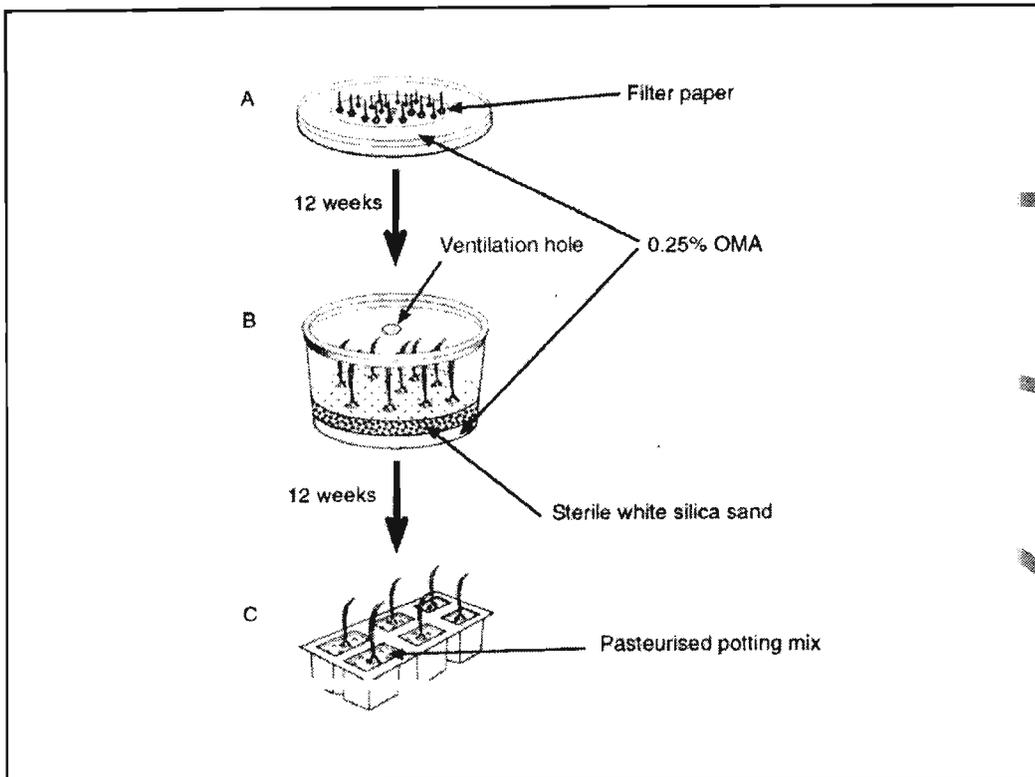
MÉTODOS DE GERMINACIÓN

Intact Soil Core Baiting: usada en laboratorio para comparar germinación entre taxas

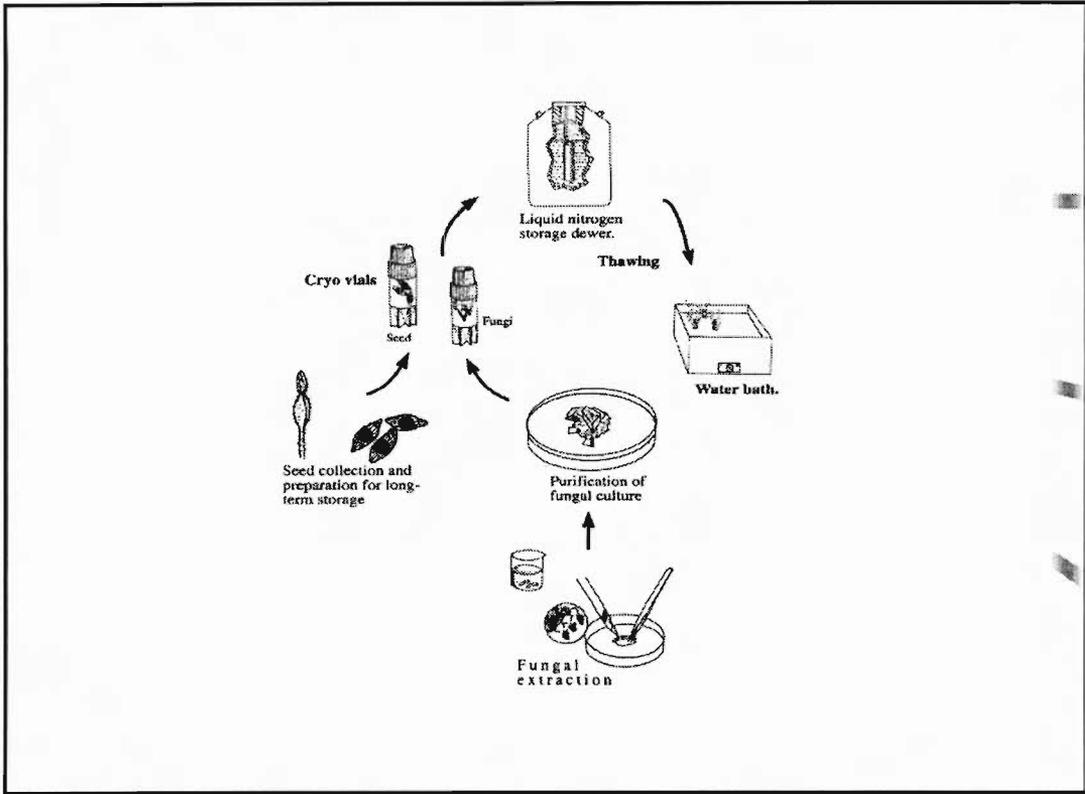


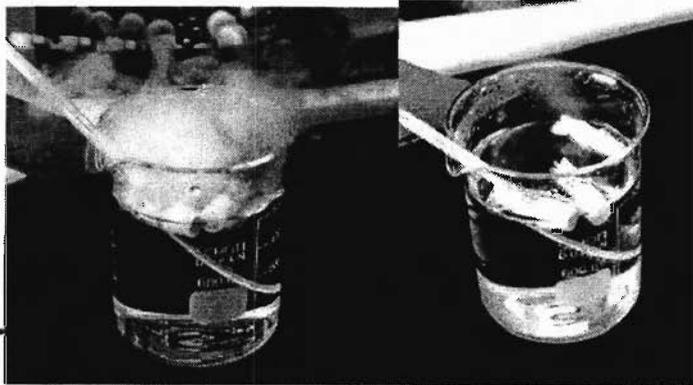
METODO DE GERMINACION SOBRE FILTROS DE MEMBRANA





CRIOPRESERVACIÓN





Two ml vials containing orchid fungi undergoing rapid thawing in 40°C water bath.

Figura 9: Resultados test Tetrazolio (# tubo en **negrita** de tabla 1)

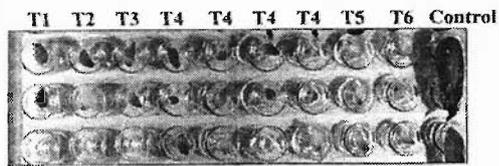


Figura 10: Pérdida de la viabilidad por tratamiento con PSV2mod comenzando en la zona basal de un E.S.



Figura 11: Fenolizacion de E.S. en medio de recuperacion (Recuadro a la izquierda indica el color normal de un E.S.)

Desarrollo embrionario de *Chlorella sp* in vitro

Figura 5 - 6: Deseccación por silica gel y en cámara de fajo laminar

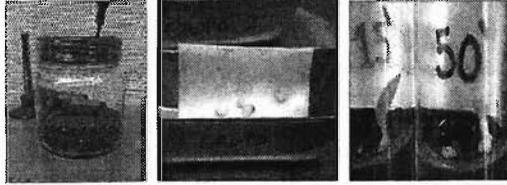


Figura 7: Detalle E.S. desecados luego de 60 días.

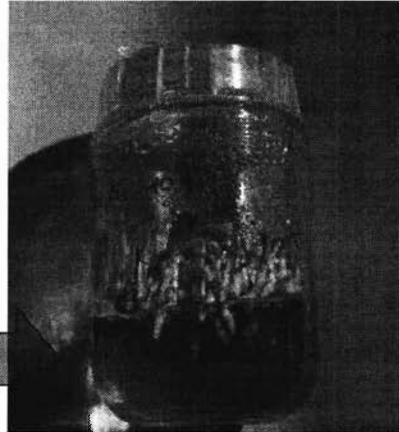


Figura 8: Desarrollo de brotes a partir de E.S. desecados a diferentes tiempos.



Antecedentes generales sobre conservación de orquídeas

*Mauricio Cisternas B.
Facultad de Agronomía
Universidad Católica de Valparaíso*

Antecedentes generales sobre conservación de orquídeas

- *La familia Orchidaceae, se compone de más de 700 géneros y entre 18.000-25.000 especies.*
- *Las orquídeas terrestres son consideradas como componentes complejos de los ecosistemas.*
 - *Presencia de una asociación micorrízica*
 - *Presencia de flores altamente evolucionadas (polinizadores específicos).*

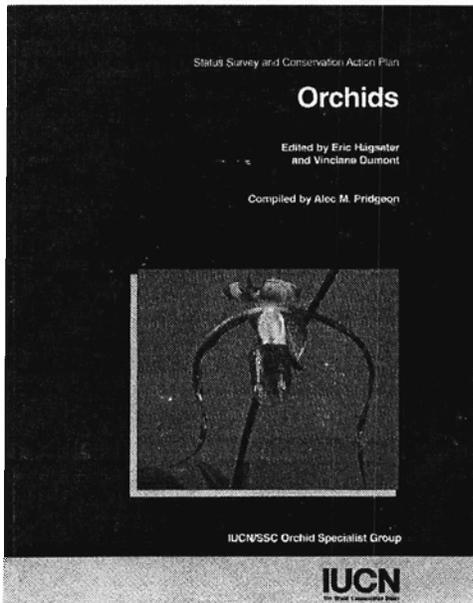


- ***Estas complejas relaciones hacen que las orquídeas sean vulnerables a alteraciones a su ambiente, hecho que se refleja en la inclusión de 7 especies y dos géneros en el Apéndice I de CITES, y la presencia de todas las demás especies en el Apéndice II de esta convención.***



Principales amenazas para la conservación de orquídeas en el mundo.

Amenaza	Causa
Destrucción, modificación y fragmentación del hábitat	Procesos de urbanización
	Fragmentación del hábitat
	Tala forestal
	Agricultura
Sobre colecta desde el hábitat natural	Introducción de especies exóticas
	Comercio de flores y plantas
	Colecciones botánicas
	Consumo (e.g. Aa)



THREATENED SPECIES INFORMATION

Recovery planning for threatened species in NSW

What is a recovery plan?

A recovery plan is a comprehensive document outlining those management actions aimed at preventing the extinction of threatened species, populations or subspecies.

Why is a recovery plan needed?

The status of species in NSW has led to the present status of many threatened species. The continued threat of habitat loss, agriculture and change and the pressures and competition of introduced species have resulted in over 600 plants and animals being listed as threatened in the State. It is essential that the conservation of these species in their natural habitats is given the highest priority in conservation efforts, the best chance of survival.

Who prepares recovery plans?

The Director-General of the NSW National Parks and Wildlife Service is responsible for the preparation of recovery plans for threatened species in NSW. When preparing recovery plans, the Director-General may consult with other government departments and agencies which have a role in the recovery of the species. This means that both relevant government departments and agencies will be involved in the development of comprehensive plans.

What's in a recovery plan?

Recovery plans outline the best way to deal with and prevent the extinction of a species by listing the actions to be taken, the objectives and the strategies for the system, a list of the actions which have led to the decline of the species and the actions which may be undertaken to prevent the extinction of a species. These actions may be undertaken by the government or by other agencies which are responsible for the recovery of the species. When the actions are undertaken, the Director-General will be encouraged to work together with the recovery team.

Development methods to all the conservation and recovery of the species. The recovery plan is a recovery plan and a legal obligation on a private landholder.

If an action is identified in the responsibility of a private landholder, the action must be undertaken in the plan. The plan must also include a list of the actions which are to be undertaken to carry out the actions.

When preparing a recovery plan, the Director-General must be aware of the following:

- the significance of the species and its conservation value;
- the actions which the public can undertake in the conservation of the species; and
- the actions which the public can undertake in the conservation of the species, populations or subspecies.

Consenting on a recovery plan

An action plan has the opportunity to continue on a long-term basis. There is a list of actions which have been prepared in a plan, which are to be undertaken in the plan. The plan must be published in a newspaper as well as a local newspaper, during the period of a plan. The plan must be approved by the Director-General. All actions must be undertaken in the plan.

How is the plan approved?

The plan must be approved by the Director-General. The plan must be approved by the Director-General. The plan must be approved by the Director-General.

How is the plan put into action?

The recovery plan is approved by the Director-General. The plan must be approved by the Director-General. The plan must be approved by the Director-General.



NSW NATIONAL PARKS AND WILDLIFE SERVICE

Estrategias de conservación

- *El avance en el conocimiento de las especies nativas (importancia la búsqueda de un posible valor de uso de las especies problemática).*
- *Las estrategias de conservación in-situ deben estar insertas en los planes regionales de desarrollo y uso sustentable de los recursos naturales*
- *Necesidad de creación de instituciones que se encarguen de mantener el sistema de conservación de las especies.*
- *Participación de las comunidades locales, a través de la capacitación en el uso de los recursos naturales*

Tipos de conservación

- *Conservación in situ: Mantención de una población dentro de una comunidad ecológica y de su ambiente original.*
- *Conservación ex situ: Mantención de muestras fuera de sus sitios de origen, domesticación en el caso de cultivos, en bancos de germoplasma.*

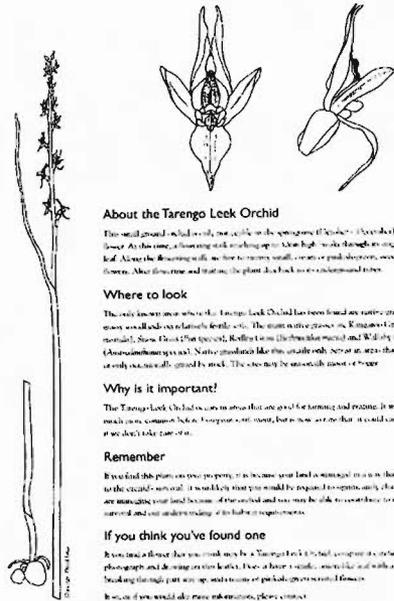


Planes de acción

- 1. Identificación de n° de individuos y número de poblaciones.***
- 2. Identificación taxonómica de las especies (sitios prioritarios de conservación).***
- 3. Conocer la biología reproductiva de las especies.***
- 4. Variabilidad genética de la especie.***
- 5. Confección de mapas de distribución de poblaciones, con características de hábitat y paisaje existente (tipo de hábitat ha conservar).***



Have
you
seen
this
plant?



About the Tarengo Leek Orchid

This small ground-dwelling orchid is only one of the 20 species of orchids that are found in the area. At the time of flowering each orchid grows to about 100 cm high, with the flowers on a single stem. Above the flowering stalk, the plant has several small, narrow, green, lanceolate leaves. Above the flowering stalk, the plant has several small, narrow, green, lanceolate leaves. Above the flowering stalk, the plant has several small, narrow, green, lanceolate leaves.

Where to look

The orchid is found in areas where the Tarengo Leek Orchid has been found in the past. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid.

Why is it important?

The Tarengo Leek Orchid is an important species for the area. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid.

Remember

Remember that the plant is very fragile. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid.

If you think you've found one

If you think you've found one, please contact the relevant authorities. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid. It is found in the areas of the Tarengo Leek Orchid.

© 2010 NSW Department of Environment and Heritage
 10/10/10 10:10:10 AM
 10/10/10 10:10:10 AM

Planes de acción

- 6. **Censo de especies para mantener registros en el tiempo que permitan observar fluctuaciones en la dinámica poblacional, con lo que se puede predecir el riesgo de extinción y estado de conservación de las especies.**
- 7. **Identificación de amenazas actuales**



TAXON:		POPULATION No.:	
<input type="checkbox"/> EBF <input type="checkbox"/> Endemic Species <input type="checkbox"/> IFL <input type="checkbox"/> Partial Survey <input type="checkbox"/> Full Survey <input type="checkbox"/> New Population			
FROM: REGION: File Ref.	TITLE: DISTRICT: Map/Spot Ref.	SURVEY DATE:	SHEET: Reserve No.
LOCATION:			
LATITUDE:		LONGITUDE:	
LAND STATES: <input type="checkbox"/> National Reserve <input type="checkbox"/> National Park <input type="checkbox"/> State Forest <input type="checkbox"/> Water Reserve <input type="checkbox"/> Other		<input type="checkbox"/> Private <input type="checkbox"/> Pastoral Lease <input type="checkbox"/> VCL <input type="checkbox"/> State <input type="checkbox"/> Other	
<input type="checkbox"/> Grand Res. State <input type="checkbox"/> Rd. Verge State <input type="checkbox"/> Other State Res. <input type="checkbox"/> SLK		<input type="checkbox"/> G.P.S. USED: <input type="checkbox"/> ASPICP:	
LANDFORM:			
<input type="checkbox"/> Ridge <input type="checkbox"/> Cliff <input type="checkbox"/> Breakover <input type="checkbox"/> Sand Dune <input type="checkbox"/> Flat <input type="checkbox"/> Slope <input type="checkbox"/> Low Plain <input type="checkbox"/> Other			
<input type="checkbox"/> Valley <input type="checkbox"/> Gully <input type="checkbox"/> Stream <input type="checkbox"/> Riverbank <input type="checkbox"/> Swamp <input type="checkbox"/> Lake Edge			
ROCK TYPE:			
<input type="checkbox"/> Laticite <input type="checkbox"/> Sand <input type="checkbox"/> Granite <input type="checkbox"/> Igneous <input type="checkbox"/> Limestone <input type="checkbox"/> Metamorphic <input type="checkbox"/> Sedimentary <input type="checkbox"/> Other			
<input type="checkbox"/> Slate <input type="checkbox"/> Sandstone <input type="checkbox"/> Shale <input type="checkbox"/> Clay <input type="checkbox"/> Gneiss <input type="checkbox"/> Quartzite <input type="checkbox"/> Basalt <input type="checkbox"/> Andesite <input type="checkbox"/> Granite <input type="checkbox"/> Limestone <input type="checkbox"/> Other			
SOIL TYPE:			
<input type="checkbox"/> Red <input type="checkbox"/> Brown <input type="checkbox"/> Black <input type="checkbox"/> Yellow <input type="checkbox"/> Grey <input type="checkbox"/> White <input type="checkbox"/> Other			
SOIL CONDITION:			
<input type="checkbox"/> Good <input type="checkbox"/> Poor <input type="checkbox"/> Very Poor <input type="checkbox"/> Other			
VEGETATION CLASSIFICATION (Damon):			
ASSOCIATED SPECIES:			
No. of PLANTS: <input type="checkbox"/> Mature <input type="checkbox"/> Seedlings <input type="checkbox"/> Dead <input type="checkbox"/> Asexual <input type="checkbox"/> Epiphytic <input type="checkbox"/> Area Occupied			
REPRODUCTIVE STAGE: <input type="checkbox"/> Flower bud <input type="checkbox"/> Flower <input type="checkbox"/> Immature fruit <input type="checkbox"/> Fruit <input type="checkbox"/> Fruit Dehiscent <input type="checkbox"/> Vegetative			
POLLINATORS: <input type="checkbox"/> Native bees <input type="checkbox"/> Honey bees <input type="checkbox"/> Other insects <input type="checkbox"/> Birds <input type="checkbox"/> Mammals			
Other observations:			
CONDITION OF POPULATION: <input type="checkbox"/> Healthy <input type="checkbox"/> Moderate <input type="checkbox"/> Poor <input type="checkbox"/> Flowered <input type="checkbox"/> Overmatted			
POTENTIAL THREATS: <input type="checkbox"/> Firebreaks <input type="checkbox"/> Mining <input type="checkbox"/> Historical structures <input type="checkbox"/> Roadworks <input type="checkbox"/> Clearing			
<input type="checkbox"/> Weeds <input type="checkbox"/> Invasive <input type="checkbox"/> Pesticide/Herbicide <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> Contaminant			
FIRE HISTORY: <input type="checkbox"/> Not known <input type="checkbox"/> Burned in <input type="checkbox"/> Summer <input type="checkbox"/> Autumn <input type="checkbox"/> Winter <input type="checkbox"/> Spring			
FENCING: <input type="checkbox"/> Not Reported <input type="checkbox"/> Fenced <input type="checkbox"/> Reported <input type="checkbox"/> Reported/Reported			
ROADSIDE MARKERS: <input type="checkbox"/> Not Reported <input type="checkbox"/> Present <input type="checkbox"/> Reported <input type="checkbox"/> Reported/Reported			
OTHER COMMENTS (include photos):			
VOUCHER SPECIMENS: <input type="checkbox"/> Reported Herb <input type="checkbox"/> Dicotyledon Herb <input type="checkbox"/> WA Herb <input type="checkbox"/> Other			
ATTACHED: <input type="checkbox"/> Map <input type="checkbox"/> Abacus <input type="checkbox"/> Illustration <input type="checkbox"/> Photo <input type="checkbox"/> Field Notes			
COPY SENT TO: <input type="checkbox"/> Regional Office <input type="checkbox"/> District Office <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> Specific			
Signed: _____ Date: _____			

Aspectos legales en Chile (“Red list”)

- **La protección y conocimiento de la diversidad es tarea prioritaria de todas las naciones.**
- **Chile en la ley 19.300 de bases generales del Medio Ambiente, 1994, art. 38 obliga a los “organismos competentes del estado a confeccionar y mantener actualizado inventarios de la flora y fauna silvestre”.**
- **El art. 37 de esta ley establece el reglamento donde se fijan las diferentes 6 categorías de conservación, las que son: Extintas (EX), en peligro de extinción (EP), vulnerables (VU), raras (sólo animales), insuficientemente conocidas (IC) y fuera de peligro (FP).**

Categorías de Conservación de Orquídeas

- *Bipinnula fimbriata* FP
- *Brachysteles unilateralis* IC (EX?)
- *Chloraea bletiodes* IC (EX?)
- *Chloraea chica* (NE)
- *Chloraea chrysantha* IC
- *Chloraea disoides* IC
- *Chloraea galeata* IC (VU?)
- *Gavilea leucantha* IC (FP?)
- *Habenaria pauciflora* IC (EX?)



Aspectos legales en Chile (“Red list”)

- *A pesar de que las orquidáceas han sido extensamente estudiadas en otras partes del mundo, en Chile es uno de los últimos grupos de plantas con flores estudiadas. Hasta la fecha no existe legislación nacional para proteger las orquídeas chilenas. Así Hoffman (1989) afirma “que es un grupo de plantas numerosas y que requieren de más estudio”, por lo que las orquídeas no fueron consideradas en los status de conservación de las geófitas monocotiledoneas chilenas.*
- *Estudios recientes del Libro Rojo de la flora nativa de la región de Coquimbo y de los sitios prioritarios para su conservación (Squeo et. al., 2001) aparecen 9 especies de orquídeas con sus estatus de conservación, denotándose no claridad en las categorías.*

Especies de orquídeas chilenas

- *Las orquídeas chilenas comprenden 49 especies, con 7 géneros, siendo todas las especies terrestres, eventualmente epífitas y litófitas.*
- *Se distribuyen desde la latitud 18° y 22° S, hasta tierra del fuego en la latitud 55°S.*

Género	N° total de sp.	N° de sp. nativas	N° de sp. endémicas
<i>Aa</i>	<i>App. 20</i>	<i>1</i>	
<i>Bipinnula</i>	<i>11</i>	<i>5</i>	<i>5</i>
<i>Brachystele</i>	<i>App.10</i>	<i>1</i>	
<i>Chloraea</i>	<i>47</i>	<i>29</i>	<i>15</i>
<i>Codonorchis</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	
<i>Gavilea</i>	<i>13</i>	<i>11</i>	<i>4</i>
<i>Habenaria</i>	<i>App.500</i>	<i>1</i>	
		<i>49</i>	<i>24 (49%)</i>

Amenazas de orquídeas chilenas

- ***Destrucción del hábitat causado por urbanización.***
- ***La variabilidad genética y sobrevivencia de varias especies de orquídeas representadas en áreas protegidas no esta garantizada.***
- ***Crecimiento en lugares accesibles a visitantes que colectan flores y ocasionalmente plantas completas.***
- ***Introducción de animales exóticos.***

Amenazas de orquídeas chilenas (cont.)

- ***Marcada tendencia a comportarse como malezas***
- ***Presencia de malezas invasivas***
- ***Discriminado uso de herbicidas en plantaciones forestales***
- ***Indiscriminado uso de pesticidas en la actividad silvoagropecuaria***

Establecimiento de estrategias de conservación efectivas para orquídeas chilenas.

Objetivos de corto plazo

- 1. Preparación de monografías de géneros *Bipinnula*, *Chloraea* y *Gavilea*.**
- 2. Actualización de base de datos.**
- 3. Determinación de la distribución actual, periodos de floración y abundancia de las especies.**

Objetivos de corto plazo (cont.)

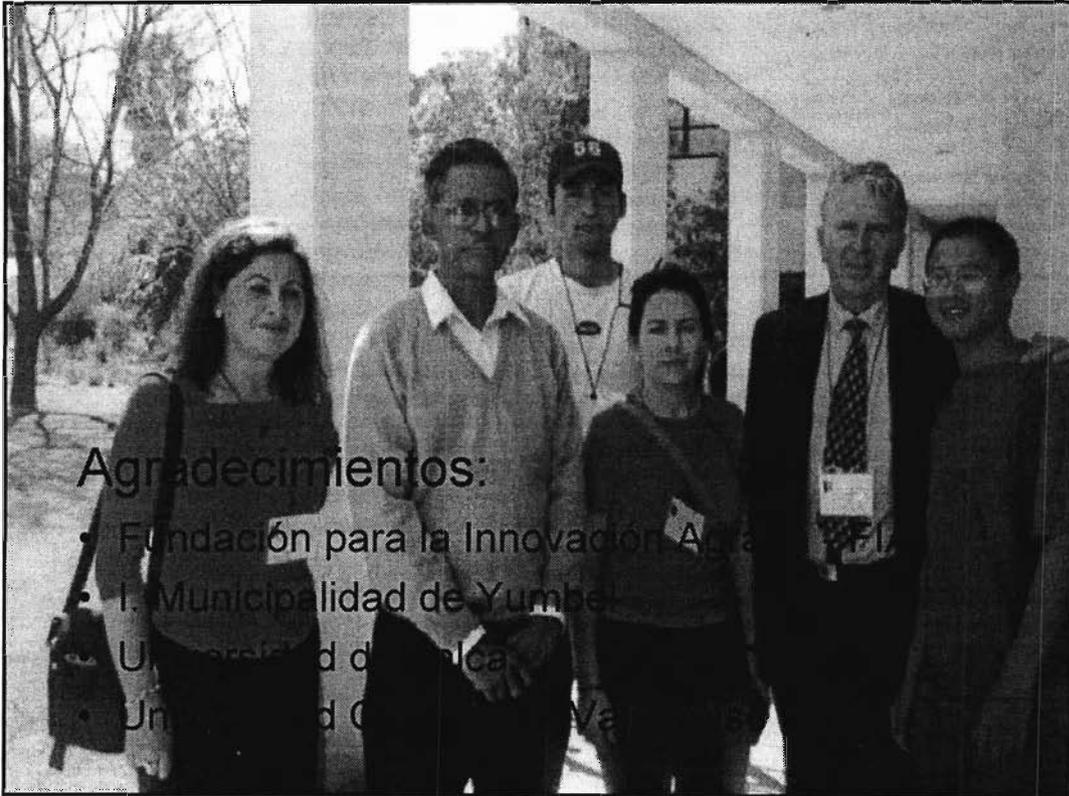
- 4. Determinación de áreas de alta diversidad y endemismo.**
- 5. Identificación de especies amenazadas y aplicación de las categorías de la "lista roja" de la IUCN.**
- 6. Identificación para la sobrevivencia de la especie y sus hábitats**
- 7. Desarrollo e implementación de estrategias de control para estas amenazas**

Objetivos de largo plazo

- 1. *Recopilar información sobre sistemática, sistemas reproductivos y ecología de poblaciones. Esta información es crucial para desarrollar efectivas estrategias de conservación in-situ y ex-situ.***
- 2. *Programas educacionales focalizados en conservación de orquídeas chilenas promovidas por diferentes instituciones de investigación y jardines botánicos.***

Las presentaciones estarán disponibles en la sección *Difusión y Transferencia* del sitio:

<http://www.bta.cl>



Agradecimientos:

- Fundación para la Innovación Agraria (FIA)
- I. Municipalidad de Yumbel
- Universidad de Talca
- Universidad Católica de Valparaíso