

Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiata*

Loexis Rodríguez^{1*}, Roberto González¹, Amauri Díaz¹, Ernesto Fajardo¹, Esmérida Sánchez¹, Juan Hernández², María Castañeira², Gerardo de la Cruz³ y Jorge González³. *Autor para correspondencia.

¹ Centro de Desarrollo de la Montaña Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo Telef: (021) 82207 – 82140 – 322229 biotec@cdm.gtmo.inf.cu

² Centro Nacional de Áreas Protegidas.

³ Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado.

RESUMEN

Teniendo en cuenta que *Cattleya labiata* es una especie que ha sido descrita como muy difícil de germinar *in vitro*, se concibió esta investigación con el objetivo de evaluar diferentes factores que pueden influir en la germinación asimbiótica *in vitro*. Para ello se tuvieron en cuenta los factores siguientes: edad de maduración de las cápsulas, estado físico del medio de cultivo y concentración de carbón activado en el medio de cultivo semisólido. Los resultados obtenidos demostraron que fue posible la germinación y que para ello fue necesario utilizar cápsulas con 180 días de edad sembradas en medio de cultivo líquido e incubada a 100 rpm o medio de cultivo semisólido con carbón activado. A pesar de que los porcentajes de germinación fueron numéricamente bajos, estos fueron suficiente para iniciar satisfactoriamente el proceso de micropropagación de *Cattleya labiata*.

Palabras clave: carbón activado, medio de cultivo líquido, micropropagación, orquídeas

ABSTRACT

Cattleya labiata is an specie that has been described as "Hard Germinate" *in vitro* culture, this investigation was realized to value some factors that can influence on seed germination asymbiotic *in vitro* in this specie. The following factors were studied: maturity age of capsule, condition of aggregation of culture medium and dose of charcoal active in the semisolid culture medium. The results obtained showed that it was possible the germination asymbiotic *in vitro* culture of seed *Cattleya labiata*, but was necessary to use capsule with 180 days age in liquid culture medium and hatched at 100 rpm or semisolid culture medium with charcoal active. Though the percentages of germination were poor, they were sufficient for begining efficiently the micropropagation process of *Cattleya labiata*.

Key words: charcoal active, liquid culture medium, micropropagation, orchids

Dentro de las orquídeas, las *Cattleyas* constituyen uno de los géneros de mayores demandas. Las rarezas de sus flores y follajes y sus desafiantes requerimientos para el cultivo, hacen que sean acogidas por los cultivadores con especial interés. *Cattleya labiata* es una especie que ha sido referida durante mucho tiempo por ser recalcitrante al cultivo *in vitro* a través de la germinación de semillas. Los resultados más concretos se refieren a la micropropagación mediante cultivos de callos utilizando fundamentalmente meristemo como explante inicial (Hew, 1997). Sin embargo, es una necesidad poder contar con un procedimiento adecuado para la germinación de semillas, teniendo en cuenta las conveniencias que desde el punto de vista de la conservación de la biodiversidad de las especies se logra con el empleo de esta técnica. Ello garantiza además la no utilización de reguladores del crecimiento, algunos de estos con probado poder mutagénico.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto se concibió esta investigación con el objetivo de evaluar diferentes factores que pueden influir en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiata*.

El material vegetal de inicio consistió en semillas procedentes de cápsulas inmaduras (60-80 días después de la polinización según Arditti y Ernst, 1993) y cápsulas maduras, estas últimas tenían 180 días de edad.

Para la investigación se utilizó, además, la mitad de las sales del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS), en estado líquido y semisólido adicionando 10% de agua de coco, 2.0% de sacarosa, 0.1 mg.l⁻¹ de tiamina y para los medios semisólidos 0.7% de carbón activado a razón de 0, 0.1 y 0.2%. A los medios de cultivo líquidos no se les adicionó carbón activado considerando las ventajas adicionales que

poseen los mismos para contrarrestar la fenolización y la factibilidad de poder cambiarlo por medio de cultivo fresco de ser necesario.

La desinfección de las cápsulas se realizó teniendo en cuenta el grado de maduración de las mismas, por lo que se estableció la desinfección I para cápsulas inmaduras y desinfección II para cápsulas maduras. La utilización de dos tipos de desinfección se justifica porque las semillas de las cápsulas maduras se encontraban expuestas a contaminaciones. Por su parte con la desinfección I solo se desinfectaron las cápsulas porque solo ellas lo requieren.

Desinfección I: Las cápsulas fueron lavadas con detergente al 1.0% y sumergidas cinco minutos en solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 1.0% de cloro activo al que se le añadieron dos gotas de Tween 20 y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. En cabina de flujo laminar se sumergieron las cápsulas en solución de sulfato de cobre al 2.0% durante cinco minutos, luego en NaOCl 1.0%, y finalmente se lavaron con suficiente agua destilada estéril. Antes de seccionar las cápsulas fueron sumergidas en alcohol al 70% y flameadas.

Desinfección II: Las semillas fueron expuestas directamente a los desinfectantes, para ello primeramente se seccionaron las cápsulas y las semillas se sumergieron en solución de NaOCl al 1.0% acompañado con dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos en agitación constante. En condiciones

de cabina de flujo laminar y con la ayuda de una bomba de vacío, embudo y papel de filtro de 11 cm de diámetro se filtraron las semillas y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

En el experimento se utilizaron erlenmeyer de 250 ml de capacidad, en todos los casos se les añadió 25 ml del medio de cultivo, al cual se le ajustó el pH a 5.6 antes del autoclaveado.

Para demostrar la efectividad de los tratamientos en la germinación, se determinaron los días en que ocurrió y el porcentaje de germinación. El procesamiento estadístico de los resultados solo tuvo en cuenta los tratamientos que mostraron algún indicador de germinación por ser los menos frecuentes y de mayor importancia, para ello se utilizó un ANOVA simple y las medias se compararon mediante la prueba de Duncan para un 0.05 nivel de probabilidad.

A diferencia de otras especies de orquídeas con las cuales pueden emplearse diferentes estados de madurez de las cápsulas para lograr la germinación de las semillas, en la presente investigación los resultados mostraron que cuando se utilizaron cápsulas verdes no hubo germinación de las semillas de *Cattleya labiata*. Las mismas mantuvieron su color normal y no mostraron ningún cambio excepto cuando no se añadió carbón activado al medio de cultivo que los explantes se fenolizaron independientemente de la edad de las cápsulas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de los tratamientos en la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas utilizando cápsulas de 180 días de edad.

Tratamientos	Días [*]	porcentaje ^{**} de germinación de semillas
Medio de cultivo sólido(Carbón activado 1 g.l ⁻¹)	71 ^a	1.1 ^a
Medio de cultivo sólido(Carbón activado 2 g.l ⁻¹)	60 ^b	2.1 ^b
Medio de cultivo líquido sin carbón activado	35 ^c	2.3 ^c
±EE ^{***}	0.48	0.06

* Letras diferentes difieren estadísticamente para un 0.05 nivel de probabilidad de la prueba LSD.

** Las medias de los porcentajes fueron transformadas para la comparación por arcosen x (Steel y Torrie 1980).

*** Error Estándar.

Los resultados mostraron diferencias estadísticas favorables al empleo del medio de cultivo líquido con menor tiempo para la germinación y mayor porcentaje de la misma. Del mismo modo fue significativamente superior el empleo de la mayor concentración de carbón activado (2 g.l⁻¹) con respecto a la menor (1 g.l⁻¹) para las variables días y porcentaje de germinación.

La selección del medio de cultivo con la mitad de las sales MS para evaluar la germinación de *Cattleya labiata* tuvo lugar al considerar que es rico en Nitrato de Amonio, y según Hew (1997), se ha observado que los embriones de este género de planta son

hábiles en utilizar el ión Nitrato durante los estados iniciales de la germinación, pero solo a partir de un período cercano a los 60 días, coincidiendo con la aparición de la nitrato reductasa. Los resultados mostrados en esta experiencia coinciden con los del propio autor cuando se empleó medio de cultivo semisólido, no así con la utilización de medio de cultivo en estado líquido en el que se alcanzó la germinación a los 35 días.

Tsuchiya (1954), planteó que con el empleo de cápsulas inmaduras para la germinación *in vitro* de orquídeas se obtenía un incremento en la germinación

y se reducía el tiempo para la floración. Sin embargo, estudios más recientes demostraron la importancia de que al momento de realizar la siembra el embrión halla alcanzado un grado de diferenciación tal que le permita germinar en el menor tiempo posible (Singh, 1993). Por otro lado Raghavan y Torrey (1964), llegaron a la conclusión de que las diferentes respuestas de las semillas de orquídeas a la germinación *in vitro* dependía fundamentalmente del estado de madurez de las cápsulas en el momento en que se cosecha al comprobar que la habilidad para sintetizar la nitrato reductasa en *Cattleya* fue observada solamente en estados de desarrollo tardíos.

El efecto positivo del medio de cultivo líquido en la germinación de las semillas puede estar dado, entre otros factores, por la mejor aireación, el incremento de la superficie aérea y la dilución de inhibidores. Todo ello provoca una acción conjunta que propicia condiciones favorables para un mejor desarrollo de los explantes. Arditti y Ernest (1993), plantearon que entre las posibles explicaciones al efecto positivo que ejerce el carbón activado en el cultivo de tejidos en orquídeas se encuentran el aumento de la aereación dentro del medio de cultivo y por otro lado absorbe el 5-hidroxymetylfurfural que se forma por la deshidratación de la sacarosa durante el autoclaveado el cual puede inhibir el crecimiento y la diferenciación.

De manera general resultó importante haber podido lograr la germinación de semillas de *Cattleya labiata*, resultado que posibilita establecer el punto de partida para un esquema de micropropagación de esta especie a partir de semillas.

BIBLIOGRAFÍA

Arditti J y Ernest R (1993) Micropropagation of Orchids. John Wiley-Sons, INC. New York

Hew, C y Yong JW (1997) The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry. World Scientific. National University of Singapore. 331 p.

Murashige, T y Skoog F S (1962) A revied medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue culture. Plant Physiology. 15: 173-197.

Raghavan, V y Torrey JG (1964) Inorganic nitrogen nutrition of the seedling of the orchids, *Cattleya*. American Journal Botanic 51: 264-274

Singh, F (1993) *In Vitro* Orchid Seed Germination and Cloning of Orchids. En: Plant Biotechnology Science publishers, Inc. Lebanon, USA. 289 p.

Steele RGD y Torrie J H (1980) Principles and procedures of statistics. pp 495-520McGraw-Hill Book Co, New York

Tsuchiva, I (1954) Germination of orchids seeds from premature pods. Na Pua Okita o Hawai Nei. 4: 130-134