

Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas

Loexis Rodríguez*, José R. Valles, Roberto González, Karen Alvarado, Enidia Telles, Amauri Díaz y Esmérida Sánchez. *Autor para correspondencia

Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz. El Salvador. Guantánamo. Cuba. e-mail: biotec@edm.gtmo.inf.cu

RESUMEN

Sobre las más de 300 especies de orquídeas nativas cubanas, se tiene poca referencia acerca de su micropropagación en la literatura científica, sin embargo, las técnicas biotecnológicas juegan un papel importante en el rescate de especies amenazadas. Por tales razones en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Desarrollo de la Montaña de Guantánamo se estudiaron aspectos relacionados con la germinación *in vitro* de *Campylocentrum micrantrum*, *Encyclia cochleata*, *Epidendrum difforme* y *Oceoclade maculata*; utilizando las sales de los medios de cultivo Murashige y Skoog (1962) y Knudson (1946) suplementado con carbón activado (0.1 y 2 g.l⁻¹) en medio gelificado con 6 g.l⁻¹ de Agar Técnico No. 3 y el pH ajustado a 5.6. Los explantes se incubaron bajo condiciones de 16 horas luz de fotoperiodo a intensidad de 27 $\mu\text{Mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ y 24 ± 1 °C. Los resultados alcanzados mostraron que la germinación de las especies estudiadas se obtuvo en diferentes tiempos y condiciones del medio de cultivo donde sobresalió por el menor tiempo utilizado para la germinación *Encyclia cochleata* a las ocho semanas en el medio de cultivo que contenían las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) y sin la adición de carbón activado, en tanto *Oceoclade maculata* necesitó 24 semanas para germinar.

Palabras clave: antioxidante, biotecnología, especies nativas, flores, micropropagación

ABSTRACT

About the most of 300 species of Cuban native orchids is have few reference of the micropropagation in the science literature. However, the biotechnical techniques fulfill an important acting in the rescue of threatened species. By that in the laboratory of Vegetable Biotechnology of the Mountain Development Center in Guantánamo, aspects related with the germination were studied *in vitro* of *Campylocentrum micrantrum*, *Encyclia cochleata*, *Epidendrum difforme* and *Oceoclade maculata* using the salts of the culture medium Murashige and Skoog (1962) and Knudson (1946), increasing with activate charcoal (0; 1; 2 g.l⁻¹), Agar technical No. 3 6 g.l⁻¹ and the adjusted pH at 5.6. The seeds was incubated under conditions of 16 hours light to intensity of 27 $\mu\text{Mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ and 24 ± 1 °C. The reached results showed that the germination of the studied species was obtained under different times and conditions of the medium of cultivation where it stood out for the smallest time used for the germination *Encyclia cochleata* to the eight weeks in the salts of Murashige and Skoog (1962) and without the addition of activated charcoal, as long as *Oceoclade maculata* needed 24 weeks to germinate.

Key words: antioxidante, biotechnology, flowers, micropropagación, native species

El elevado número de especies nativas de orquídeas existentes en Cuba, la ubica en el primer lugar en cuanto a riqueza orquideológica en el Caribe. El cálculo real, conservador, nos muestra no menos de setenta especies amenazadas, sesenta de ellas endémicas (Aleida, 1988).

En condiciones naturales las semillas son transportadas por el aire a grandes distancias desde las plantas y depositadas en el suelo, el agua o en la superficie de los árboles, pero solo podrán germinar y convertirse en plantas si son infectadas por una especie determinada de hongo al que podrá asociarse en un proceso de beneficio mutuo llamado simbiosis (Tompson, 1992).

Es bien conocido que la semillas de orquídeas crecen lentamente y requieren años para que la planta florezca. Algunas especies florecen más temprano, pero otras necesitan de tres a cinco años para florecer, por lo que la paciencia es el primer requerimiento para aumentar la población de una especies determinada. Sin embargo, es posible disminuir este tiempo e incrementar las

poblaciones de orquídeas a través de las técnicas biotecnológicas suministrando a las semillas todos los nutrientes que necesita para su crecimiento (Villalobo, 1990).

El cultivo de tejidos es usado para la rápida propagación de orquídeas bajo determinados intereses, y es usada industrialmente en Tailandia, Singapur, Malasia, Indonesia y otros países (Arditti, 1993).

Pierick (1994) argumentó que la deforestación de los bosques, la degradación de los ecosistemas montañosos y la contaminación ambiental han conllevado a que algunas especies se encuentren en peligro de extinción y con el menor conocimiento sobre su propagación. Por tales razones la realización de este estudio estuvo encaminado a tratar aspectos relacionados con la germinación *in vitro* de las especies cubanas *Campylocentrum micrantrum*, *Encyclia cochleata*, *Epidendrum difforme* y *Oceoclade maculata*.

Para la investigación se utilizaron semillas de las cuatro especies de orquídeas, procedentes de cápsulas tomadas en el orquideario del Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM).

Las cápsulas fueron lavadas con detergente al 1.0% y sumergidas cinco minutos en solución de hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) al 3.5% de cloro activo y enjuagadas con agua destilada estéril. En la cabina de flujo laminar se sumergieron en solución de sulfato de cobre (CuSO_4) al 2.0% durante cinco minutos luego en hipoclorito de calcio al 3.5% y finalmente fueron lavadas con suficiente agua destilada estéril. Se utilizaron frascos de 250 ml de capacidad a los que se le añadió 20.0 ml del medio de cultivo el cual contenía las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS) o Knudson (1946) (K) complementado con carbón activado (0, 1.0 y 2.0 g.l^{-1}) y gelificado con 6.0 g.l^{-1} de agar y el pH ajustado a 5.6. Las semillas se extrajeron de las cápsulas y fueron distribuidas de forma homogénea sobre

los medios de cultivo e incubadas bajo condiciones de 16 horas luz de fotoperíodo a intensidad de $27 \mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Se evaluó semanalmente la germinación y fenolización de los explantes.

En la tabla 1 se muestran los resultados alcanzados en la investigación, donde se aprecia la influencia que ejerció el carbón activado en la germinación. Van Waes (1987) citado por George (1993), planteó que la adición de carbón activado (1.0-2.0 g.l^{-1}) puede estimular la germinación y el crecimiento de las orquídeas, fundamentalmente en especies que liberan sustancias fenólicas al medio de cultivo. Por otra parte el ambiente oscuro que producen tiende a aparentar condiciones naturales para la germinación de la semilla. Se ha demostrado además que favorece la germinación de orquídeas terrestres. El uso de carbón activado en el medio de cultivo ha ganado amplia aceptación en corto período de tiempo, y la utilización del mismo se ha extendido a muchas familias de plantas.

Tabla 1. Número de semanas necesarias para la germinación de cuatro especies de orquídeas cubanas en dos medios de cultivos

Especie	MS			-(g.l^{-1})-	K		
	Carbón activado				carbón activado		
	0	1	2		0	1	2
<i>Campylocentrum micrantrum</i>	---	10	12		---	10	12
<i>Encyclia cochleata</i>	8	9	13		9	11	13
<i>Epidendrum difforme</i>	---	---	16		---	---	16
<i>Oceoclade maculata</i>	---	25	26		---	24	25

La fenolización ocasionó la muerte de los explantes.

Oceoclade maculata que fue la especie que más demoró en germinar, evolucionó diferente al resto de las especies, pues sus semillas formaron pequeños callos verdes y compactos que dieron lugar a las plantas. Este resultado se justifica si tenemos en cuenta que de las especies estudiadas es la única terrestres, y otros autores (Arditti y Ernst, 1993), han referido que las orquídeas con esta forma de vida, germinan y se desarrollan *in vitro* más lento que las epífitas, y generalmente requieren de medios de cultivo más complejos.

Las diferencias en las respuestas para la germinación teniendo en cuenta los factores analizados, también han tenido lugar en experimentos realizados con otras especies por Alvarez *et al.* (1990), donde han planteado la gran influencia que ejerce el genotipo en estos casos, lo que obliga a un estudio específico para cada especie. Pierik *et al.* (1988) señaló cómo algunos factores que afectan la germinación y crecimiento de las orquídeas entre ellos luz, temperatura, pH y concentración de sales influyen de distintas formas, incluso dentro de un mismo género. Los resultados obtenidos permiten conocer por vez primera las posibilidades para la germinación asimbiótica *in vitro* de las cuatro especies estudiadas, destacando que se logró la germinación de todas en los dos medios de cultivo empleados, aunque es importante resaltar que la germinación de tres de las cuatro especies se favoreció con la adición del carbón activado.

REFERENCIAS

- Aleida, DM (1988) Las orquídeas nativas de Cuba. Científico Técnica. La Habana
- Alvarez, M. Nueva L y Figueroa A (1990) Propagación de Plantas Ornamentales. Pueblo y Educación. La Habana
- Arditti, J y Ernst R (1993) Micropropagation of Orchids. JOHN WILEY. New York
- George, EF (1993) Plant propagation by tissue culture. 2nd ed, Part 1 Exegetics Ltd
- Knudson, L (1946) A New Nutrient Solution for Germination of Orchid Seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 15: 214-217
- Murashige, T y Skoog FS (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15: 433-497
- Pierik, R, Sprenkels B, Vander H y Vander M (1988) Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolares* Pfizt *in vitro*. Scientia Hortic 34: 139 – 153
- Pierik, RLM (1994) Biotecnología Vegetal como herramienta en la Horticultura Ornamental Chapingo. 1: 45-57
- Thompson, PA (1992) Orchids from Seed. Royal Botanic Gardens New Wakehurst place
- Villalobos, VN (1990) Historia del Cultivo de Tejido Vegetal. En: Rossely y Villalobos, JN (Eds) Fundamentos Teóricos – Prácticos del Cultivo de Tejido Vegetales, pp. 1-3. FAO. Roma