

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA ORQUIDEA *Brassia verrucosa* BATEMAN EX. LINDL

Georgina Flores-Escobar^{1¶}; Isaías Gil-Vásquez¹;
María Teresa Colinas-León²; Martín Mata-Rosas³

¹Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5
Carretera México- Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

²Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5
Carretera México- Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

Correo-e: gina0958@yahoo.com ([¶]Autor para correspondencia).

³Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec Núm. 351,
El Haya, Xalapa, Veracruz. C.P. 91070. MÉXICO.

RESUMEN

Se llevó a cabo la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl., con el fin de determinar las mejores condiciones de cultivo para la germinación de las semillas y desarrollo de plántulas, y diseñar una estrategia inicial para su conservación y rescate. La germinación se realizó en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS); el desarrollo de las plántulas se llevó a cabo en los medios MS (T₁), MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y carbón activado (T₂) y MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y ácido giberélico (T₃). La germinación fue de 56.70 % y dio inicio seis días después de la siembra. Las variables número de brotes, ancho de hoja y longitud de raíces fueron afectadas por los tratamientos, no así la longitud de hoja, número de raíces y altura de plántula. El análisis de medias de Tukey mostró diferencias significativas para todas las variables, a excepción de ancho de hoja y longitud de raíces. El T₂ mostró los mayores valores en número de brotes, longitud de hoja, número de raíces y altura de planta. La germinación y desarrollo de las plantas *in vitro* son el inicio de una estrategia para la conservación y rescate de *Brassia verrucosa*.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Germinación, rescate, carbón activado, crecimiento.

IN VITRO PROPAGATION OF *Brassia verrucosa* (BATEMAN EX LINDL.) ORCHID

SUMMARY

Brassia verrucosa Bateman ex- Lindl was propagated *in vitro* to determinate the best conditions of culture for seed germination and seedling development, to facilitate the design of an initial strategy for its conservation and rescue. Seeds were germinated in Murashige and Skoog (MS) medium, and seedling were grown in MS (T₁), MS supplemented with organic extracts, coconut water, peptone and active charcoal (T₂) medium and MS supplemented with organics extracts, coconut water, peptone and gibberellic acid (T₃). Germination was 56.70 %, initiating six days after sowing. The variables number of buds, leaf width and root length were affected by the treatments, but not leaf length, root number or seedling height. The Tukey analysis showed significant differences for all the variables with the exception of leaf width and root length. T₂ showed the highest values for the variables number of buds, leaf length, root number and seedling height. Germination and development of the plants are the beginning of a strategy for conservation and rescue of the species.

ADDITIONAL KEY WORDS: Germination, rescue, activate charcoal, growth.

INTRODUCCIÓN

La orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex Lindl., conocida comúnmente como "grillitos" y "orquídea araña", es una planta con hábito de crecimiento epífita, con distribución en Guatemala, Honduras, Venezuela y México en los estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas; se desarrolla en bosques de encino y pino así como sobre árboles de sombra en los cafetales

a una altitud de 900 a 1,600 m, y posee un alto potencial ornamental. Esta especie está siendo amenazada, al igual que toda la familia Orchidaceae, por la reducción de su hábitat natural debido a la deforestación, cambios de uso de suelo, presencia de incendios, plagas y enfermedades, así como por la extracción de su hábitat natural (Hágsater *et al.*, 2005). Por otra parte, la polinización natural, su compleja germinación y sus largos periodos de crecimiento,

son factores que también inciden en dicha problemática. El uso de semillas para la germinación *in vitro* es uno de los componentes más importantes para la conservación y propagación de orquídeas, ya que permite mantener la variabilidad genética de las poblaciones naturales y no solamente clones, como en el cultivo de tejidos.

En el desarrollo del trabajo aquí espuesto se llevó a cabo la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl., con objeto de determinar las mejores condiciones de cultivo para la germinación de las semillas y desarrollo de plántulas, así como para diseñar una estrategia inicial en pro de su conservación y rescate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal utilizado.

Se seleccionó la especie *Brassia verrucosa*, cultivada en el orquidario de la Universidad Autónoma Chapingo (Figura 1). Se colectaron cápsulas indehiscentes obtenidas de plantas adultas. Las semillas fueron extraídas de las cápsulas y sembradas catorce días después de la colecta de las cápsulas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

Medios de cultivo.

El medio de cultivo utilizado para la germinación fue el de Murashige y Skoog (1962) suplementado con $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de mio-inositol, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicina, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa y $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agar como agente gelificante (T1); el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 ; la esterilización del medio se llevó a cabo en autoclave durante 20 minutos a $1.2 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ de presión y 120°C de temperatura. Para el desarrollo de las plántulas, además del medio de cultivo para la germinación (T1), se ensayaron los medios de cultivo: a) MS más $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa, $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de peptona, $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de carbón activado y extractos orgánicos obtenidos al licuar $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de manzana, plátano, jitomate y $100 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ de agua de coco y $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agar (T2); b) Medio de cultivo similar al anterior sustituyendo el carbón activado por $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido giberélico (AG) (T3); el pH en los tres casos fue ajustado a 5.0 ± 0.1 . La esterilización se llevó a cabo bajo las condiciones antes mencionadas.

Desinfestación de semillas.

Se pesaron en una balanza analítica 0.375 mg de semillas; para la desinfestación se procedió de la forma siguiente: a) se midió con una pipeta serológica 1.25 ml de hipoclorito de sodio al 5 % (v/v) y se aforó con agua destilada a 25 ml en una probeta graduada; b) se agregaron las semillas a la solución de hipoclorito de sodio más dos gotas de Tween 20 cubriendo con papel parafilm y agitando durante 15 segundos hasta que las semillas se tornaron de color amarillo, y c) se colocaron en la campana de flujo laminar, esperando cinco minutos para su posterior siembra.



FIGURA 1. Planta adulta de *Brassia verrucosa*

Siembra de semillas.

Después de la desinfestación, las semillas fueron decantadas en un embudo con papel filtro estéril, enjuagándose cuatro veces con agua destilada estéril; la siembra se realizó de la manera siguiente: a) con pinzas estériles se tomó el papel filtro y se depositó sobre una caja de petri estéril desdoblándose para exponer las semillas, b) con una microespátula estéril se tomaron las semillas y se distribuyeron uniformemente sobre cajas de petri con 20 ml de medio de cultivo para germinación. Una vez terminada la siembra, las cajas se colocaron en la sala de incubación a una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, a fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad e intensidad luminosa de $41 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes marca Phillips® de 30 watts. La temperatura promedio fue de 24°C por el día y 18°C por la noche, llegando a 18°C como mínima y 28°C como máxima.

Germinación de semillas.

El porcentaje de germinación se consideró cuando se observó que los embriones rompieron la testa y se cuantificó el número de semillas germinadas por cm^2 , esto mediante la ayuda de una hoja de papel milimétrico.

Desarrollo de las plántulas.

Con la finalidad de determinar el medio de cultivo idóneo para la propagación, se probaron tres medios, estableciéndose bajo un experimento completamente al azar con tres tratamientos (medios de cultivo) y 30 repeticiones por tratamiento (frascos).

Una vez germinadas las semillas (fase de protocormo), se seleccionaron los protocormos que midieron de 2 a 3 mm de diámetro y se distribuyeron en un número de cuatro por frasco (unidad experimental) en los medios de cultivo seleccionados para el desarrollo. Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia dentro de la campana de flujo laminar. Los cultivos se incubaron bajo las condiciones

antes mencionadas y se realizaron subcultivos mensuales a sus respectivos medios de cultivo.

Las variables evaluadas en el desarrollo de las plantas fueron: número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número de raíces (NR), longitud de raíces (LR) y altura de plántula (AP), las cuales se registraron cada quince días utilizando un vernier. Se realizó un total de cuatro evaluaciones durante el experimento.

Análisis de datos.

Los datos obtenidos de las variables NB, LH, AH, NR, LR y AP, para cada uno de los tratamientos, se analizaron mediante un análisis de varianza. Para los casos que mostraron diferencias significativas se llevó a cabo una prueba de comparación de medias de Tukey a una $P \leq 0.05$ con el paquete estadístico SAS versión 8.0 (SAS, 1999).

RESULTADOS

La germinación alcanzada por *Brassia verrucosa* fue de 56.70 % (Figura 2), la cual dio inicio seis días después de la siembra, considerándose cuando el embrión absorbió agua e incrementó su circunferencia y longitud, llegando a romper la testa.

Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de las plantas.

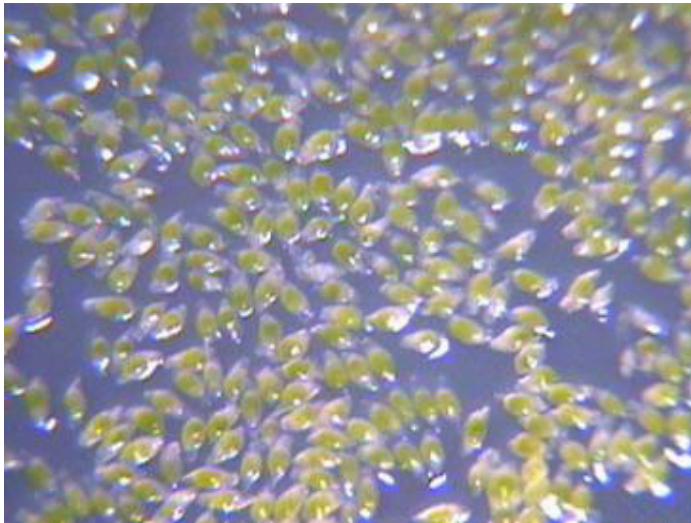


FIGURA 2. Germinación de semillas de *Brassia verrucosa*.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos (Cuadro 1) mostró diferencias significativas entre los tratamientos para las variables número de brotes (NB), ancho de hoja (AH) y longitud de raíces (LR). La longitud de hoja (LH), el número de raíces (NR) y la altura de plántula (AP) no se vieron afectadas por los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de las plantas. Los valores del coeficiente de determinación (R^2) fueron superiores a cero para todas las variables estudiadas.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de comparación de medias para las variables estudiadas en tres medios de cultivo durante la propagación de *Brassia verrucosa*; sólo las variables AH y LR no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, lo que sugiere que dichas variables no se ven afectadas por ninguno de los medios de cultivo utilizados. Por otro lado, el tratamiento dos mostró los mayores valores para las variables número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), número de raíces (NR) y altura de planta (AP).

CUADRO 2. Comparación de medias para número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número y longitud de raíces (NR y LR) y altura de plántula (AP) para tres medios de cultivo durante la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa*.

T	NB	LH	AH	NR	LR	AP
1	2.44b	1.60b	0.24a ^z	1.54b	0.79a	2.33b
2	3.93a	1.90a	0.24a	2.18a	1.06a ^z	2.92a
3	3.57a	1.69ab	0.21a	0.95c	0.78a	2.54ab
DMS	0.864	0.260	0.036	0.450	0.321	0.503

^zMedias con la misma letra dentro de columnas, no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de medias de Tukey a una ($P \leq 0.05$).

DMS: Diferencia mínima significativa. LH y AP están dadas en cm.

DISCUSIÓN

La germinación de 56.70 % obtenida en *Brassia verrucosa* en el medio Murashige y Skoog (1962) al 100 % es aceptable. El medio de Murashige y Skoog se ha utilizado para la germinación de semillas de diversas especies de orquídeas en diferentes proporciones y suplementados con reguladores de crecimiento y otras sustancias, obteniéndose resultados similares. Los resultados obtenidos en *Brassia verrucosa* pueden deberse

CUADRO 1. Análisis de varianza para número de brotes (NB), longitud y ancho de hoja (LH y AH), número y longitud de raíces (NR y LR) y altura de plántula (AP) en la germinación *in vitro* de *Brassia verrucosa*.

F.V.	G.L	NB	LH	AH	NR	LR	AP
Trat.	2	28.75*	0.12 ^{NS}	0.01*	18.08 ^{NS}	1.24*	4.21 ^{NS}
Error	69	107.92	9.82	0.19	28.43	14.87	36.54
Total	71	136.68	10.95	0.21	46.51	16.12	40.76
C.V.		37.74	21.81	23.18	41.55	52.83	28.02
R^2		0.210	0.102	0.066	0.338	0.077	0.103

^{NS}, *; No significativo, significativo con $P \leq 0.05$.

a los altos contenidos de nitrógeno y potasio que ayudaron a la germinación de las semillas, debido a que durante la germinación la mejor fuente de nitrógeno es el nitrato de amonio (Mittra, 1987), así como también a la viabilidad presente en las semillas utilizadas.

El efecto positivo del medio de cultivo (T2) suplementado con carbón activado y peptona sobre la longitud de hoja, número y longitud de raíces así como altura de plántula, pudo deberse, por un lado, a que el carbón activado fomenta una mayor aireación, establece un ambiente oscuro que propicia el desarrollo de las raíces y absorbe sustancias inhibitorias indeseables como el etileno o los pigmentos tóxicos (Arditti, 1993; Pan y Staden, 1998) y, por el otro, a que favorece la inducción de yemas, brotes, el desarrollo de raíces y la proliferación de pseudobulbos (Fridborg *et al.*, 1978; Moraes *et al.*, 2005; Nagaraju y Mani, 2005; Vij *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 2006; Waes, 2005); los efectos favorables del carbón activado no sólo se presentan en la propagación de orquídeas sino también en otras especies (Nhut *et al.*, 2008). Lo anterior puede deberse también al efecto de la peptona, que puede acelerar la formación de los pseudobulbos (Buyun *et al.*, 2004; Martin y Madassery, 2006).

CONCLUSIONES

La germinación *in vitro* de las semillas de *Brassia verrucosa* se presentó de forma adecuada para el desarrollo de las plántulas, mismas que fueron establecidas exitosamente en el medio de cultivo MS suplementado con 30 g·L⁻¹ de sacarosa, 100 ml·L⁻¹ de agua de coco, 40 g·L⁻¹ de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g·L⁻¹ de peptona, 1.0 g·L⁻¹ de carbón activado y 6.5 g·L⁻¹ de agar y que se recomienda para su propagación. Estas condiciones permiten la propagación *in vitro* de *Brassia verrucosa* para su rescate y conservación.

LITERATURA CITADA

- ARDITTI, J. 1993. Micropropagation of Orchids. Ed. John Wiley and Sons. New York. 949 p.
- BUYUN, L.; LAVRENTYEVA, A.; KOVALSKA, L.; IVANNIKO, R. 2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. Acta Universitatis Latvienis, Biology 676: 159-162.
- FRIDBORG, G.; PEDERSEN, M.; LANDSTROM, L. E.; ERIKSSON, T. 1978. The effect of activated charcoal in tissue culture: absorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiologia Plantarum 43: 104-106.
- HÁGSATER, E.; SOTO-ARENAS, M. A.; SALAZAR-CHÁVEZ, G. A.; JIMÉNEZ-MACHORRO, R.; LÓPEZ-ROSAS, M. A.; DRESSLER, R. L. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, México. 303 p.
- MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. Scientia Horticulturae 108 (1): 95-99.
- MITRA, G. C. 1987. Some aspects of asymbiotic nutrition of orchid's embryos. J. Orch. Soc. Ind. 1: 91-108.
- MORAES, L. M.; FARIA, R. T.; CUQUEL, F. L. 2005. Activated charcoal for *in vitro* propagation of brazilian orchids. Acta Horticulturae (ISHS) 683: 383-389.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A Revised Medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- NAGARAJU, V.; MANI, S. K. 2005. Rapid *in vitro* propagation of Orchid *Zygopetalum intermedium*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 14: 27-32.
- NHUT, D. T.; THI, N. N.; THANK KHIET, B. L.; QUOC LUAN, V. 2008. Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). Scientia Horticulturae 115 (2): 124-128.
- PAN, M. J.; STADEN, VAN. 1998. The use of charcoal *in vitro* culture – a review. Journal of Plant Growth Regulation 26 (3): 155-163.
- SAS® Institute Inc. 1999. Cary, NC, USA. SAS, Version 8.
- VIJ, S. P.; SOOD, A.; PLAHA, K. K. 1984. Propagation of *Rhynchostylis retusa* BL. (Orchidaceae) by direct organogenesis from leaf segment cultures. Botanical Gazette 145(2): 210-214.
- WAES, V. J. 2005. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of western european orchids. Acta Horticulturae. (ISHS) 212: 131-138.
- YANG, N.; HU, H.; HUANG, J.; XU, K.; WANG, H.; ZHO, Z. 2006. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds. Journal of Plant Cell 84 (1): 1573-5044.