

GERMINACIÓN *in vitro* DE SEMILLAS INMADURAS DE TRES ESPECIES DE ORQUÍDEAS DE LA REGIÓN DEL SOCONUSCO, CHIAPAS, MÉXICO

A. Damon¹; E. Aguilar-Guerrero²; L. Rivera¹; V. Nikolaeva²

¹El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Apartado Postal 36, Tapachula, Chiapas. C. P. 30700. MÉXICO. Tel. +52 (962) 6289800. Fax: +52 (962) 62898062. Correo-e: adamon@tap-ecosur.edu.mx (*Autor responsable).

²Centro Internacional de Investigación y Capacitación Agropecuario (CIICA). Prolong. Central Oriente S/N, Plaza Kamico Local 4, Tapachula, Chiapas. C. P. 30700. MÉXICO. Fax: (962) 51065/54522. Correo-e: biotec@tapachula.podernet.com.mx

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue seleccionar entre cuatro medios de cultivo de uso común para la propagación *in vitro* de orquídeas, para la mejor germinación *in vitro* de semillas inmaduras y el desarrollo de protobulbos y plántulas hasta los ocho meses, de tres especies de orquídeas epífitas comunes de la región del Soconusco, Chiapas, *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis* y *Brassavola nodosa*, orquídeas con potencial como plantas de ornato. Para la evaluación, se identificaron seis valores, germinación, etapas de desarrollo de protobulbos y plántulas, número de hojas, número de raíces, color y tamaño, como indicadores del aporte de los medios de cultivo. El porcentaje de germinación para *Brassavola nodosa* fue parecido en todos los medios de cultivo, pero el desarrollo de los protobulbos y plántulas fue mejor en el medio Knudson C (macronutrientes Knudson C, [reemplazando el $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]; micronutrientes Knudson C) y el medio Dalla Rosa y Laneri (macronutrientes Dalla Rosa y Laneri KO7, [reemplazando el $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]; micronutrientes Dalla Rosa y Laneri KO7). *Cattleya aurantiaca* respondió mejor al medio Dalla Rosa y Laneri en todas las etapas. Para *Encyclia chacaoensis*, al principio, todos los medios se oscurecieron y la germinación y las primeras fases del desarrollo procedieron mejor en los medios Hutner (macro y micronutrientes Hutner) y Knudson C. A los 8 meses, Dalla Rosa y Laneri, seguido por Hutner + carbono activado dio mejores resultados en cuanto al color, tamaño, número de hojas y número de raíces de las protobulbos y plántulas. Este estudio forma una parte importante de un proyecto multidisciplinario dedicado a la conservación de orquídeas y en búsqueda de nuevos productos económicamente rentables para cafeticultores afectados por el bajo precio del aromático en la región del Soconusco, Chiapas, México.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis*, *Brassavola nodosa*, orquídeas, protobulbos, plántulas, cultivo de tejidos.

IMMATURE SEEDS *in vitro* GERMINATION OF THREE ORCHID SPECIES FROM THE SOCONUSCO REGION, CHIAPAS, MEXICO.

ABSTRACT

The objective of this study was to select, among four commonly used growth media for *in vitro* propagation of orchids, a medium to improve *in vitro* germination of immature seeds and development of proto-bulbs and seedlings, for up to eight months, in three epiphytic orchid species common to the Soconusco region, Chiapas: *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis* and *Brassavola nodosa*, orchids with potential as ornamental plants. For evaluation we identified six variables, germination, proto-bulb and seedling development stages, number of leaves, number of roots, color and size, as indicators of growth medium contribution. Germination percentage for *Brassavola nodosa* was similar in all growth media, but proto-bulb and seedling development was better in two media: Knudson C (macronutrients Knudson C, [replacing $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]; micronutrients Knudson C) and Dalla Rosa and Laneri (macronutrients Dalla Rosa and Laneri KO7, [replacing $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]; micronutrients Dalla Rosa y Laneri KO7). *Cattleya aurantiaca* responded better to the Dalla Rosa and Laneri medium in all stages. For *Encyclia chacaoensis*, in the beginning all media darkened, and germination and the first development stages were better in the Hutner (Hutner macro- and micronutrients) and Knudson C media. At 8 months, Dalla Rosa and Laneri, followed by Hutner + activated carbon, provided best results for color, size, number of leaves and number of roots in proto-bulbs and seedlings. This study is an important part of a multidisciplinary project dedicated to the conservation of orchids and in search of new economically rentable products for coffee producers affected by the low price of their product in the Soconusco region, Chiapas, Mexico.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis*, *Brassavola nodosa*, orchids, proto-bulbs, seedlings.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae contiene entre 17,000 y 35,000 especies (Atwood, 1986; Dressler, 1993; Stewart y Griffiths, 1995), muchas de las cuales pasan desapercibidas por ser muy pequeñas, por tener flores poco llamativas o por su ubicación en las copas de árboles grandes o peñascos inaccesibles. Las orquídeas en este estudio son epífitas comunes de la región del Soconusco, Chiapas. *Brassavola nodosa* y *Cattleya aurantiaca* se aprecian como plantas ornamentales; *B. nodosa* se encuentra en las altitudes bajas de la región, hasta la costa y los manglares, mientras que *C. aurantiaca* se encuentra entre 200 hasta 1,500 msnm y es común en los cafetales con árboles de sombra. Por último, *Encyclia chacaoensis*, también atractiva con flores muy aromáticas, está ampliamente distribuida desde la costa hasta los 1,600 msnm y se encuentra en varios hábitats, inclusive en potreros y cafetales. Todas estas orquídeas se encuentran en otras partes de México y Centro América.

Son varias las especies de orquídeas con un valor actual o potencial en el mercado de plantas de ornato, sin embargo, se dificulta la reproducción de las orquídeas por semilla, porque éstas son diminutas y en la mayoría de los casos, se requiere de la simbiosis con un hongo micorrízico para que la semilla germine (Arditti, 1984, Hadley, 1997). Aunque para orquídeas terrestres han habido avances importantes en cuanto a la germinación simbiótica, los avances para las orquídeas epífitas son pocos.

Actualmente, se presentan cuatro opciones para el cultivo y comercialización de orquídeas epífitas: 1. El saqueo ilegal de plantas de la naturaleza y su venta a bajo precio, 2. La propagación vegetativa, que es muy lenta y poco redituable, 3. La propagación *in vitro* usando semillas y 4. El cultivo de tejidos.

La germinación *in vitro* de semillas es muy importante para la producción comercial de muchas especies e híbridos de orquídeas (Arditti y Ernst, 1993), siendo la única manera de aprovechar las semillas. La primera propagación exitosa de orquídeas *in vitro* mediante la germinación de semillas en medios de cultivo fue lograda por Knudson (1922) con especies de *Cattleya* y *Laelia* en agar. Es difícil encontrar antecedentes en la literatura sobre los resultados de intentos previos de propagar cada especie de orquídea en diferentes medios de cultivo; existe información sobre pocas especies nada más, básicamente de valor comercial. La única opción ha sido aplicar métodos reportados en la literatura para la propagación de especies de orquídeas del mismo género, aun cuando se sabe que las diferencias entre especies puedan ser marcadas. La literatura menciona intentos de propagación de especies como *Encyclia cochleata* y *Cattleya aurantiaca* en el medio de cultivo Knudson (1946). En el caso del género *Brassavola*, no hay reportes al respecto.

El objetivo de este trabajo fue encontrar el mejor medio de cultivo, entre las opciones actualmente

disponibles, para la *in vitro* germinación de semillas inmaduras y el subsecuente desarrollo de las plántulas hasta los ocho meses, para cada uno de tres especies de orquídeas con valor ornamental, *Brassavola nodosa*, *Cattleya aurantiaca* y *Encyclia chacaoensis*. El estudio forma una parte importante de un proyecto multidisciplinario dedicado a la conservación de orquídeas y en búsqueda de oportunidades nuevas y económicamente rentables para productores de café afectados por el bajo precio del aromático en la región del Soconusco, Chiapas. El producto de la propagación de estas orquídeas, después de un periodo de adaptación, formó la base de cultivos, desde entonces sostenibles, instalados en los patios y parcelas de cafecultores de la región del Soconusco, México. (Damon, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y preparación de los medios de cultivo

Se seleccionaron cuatro medios de cultivo de uso generalizado para la germinación de semillas de orquídeas, estos fueron: 1. Hutner (1953), 2. Knudson C modificado, utilizando micronutrientes según Murashigue y Skoog (1962) (Knudson, 1946), 3. Dalla Rosa y Laneri KO7 (Dalla Rosa y Laneri 1977) y 4. Knudson C (Knudson, 1946), con algunas modificaciones (recomendaciones de Centro Informacional de Investigación y Capacitación Agropecuaria (CIICA) Chiapas, México), para la preparación de las soluciones concentradas como base de los medios de cultivo (Cuadro 1). Se niveló el pH con hidróxido de potasio según las recomendaciones para cada medio de cultivo. Las plántulas se cambiaron a medio nuevo cada dos meses.

Material vegetal

Las cápsulas de *Cattleya aurantiaca* y *Encyclia chacaoensis* provinieron de la colección de orquídeas del Jardín Botánico "El Soconusco", del Colegio de la Frontera Sur, ubicado en Tuzantán, Chiapas y fueron colectadas en estado inmaduro, de color verde, a fines del mes de noviembre 2000, cuando tenían aproximadamente 10 y 9 meses de edad, respectivamente. La cápsula de *Brassavola nodosa* se colectó, también en estado inmaduro, en enero de 2001, a una edad aproximadamente de siete meses.

Desinfección de las cápsulas

Las cápsulas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 50 % (Chlorox) con dispersante (Tween 20) al 0.1 % durante 5 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en condiciones asépticas. Se trataron con etanol al 70 % durante un minuto y posteriormente con una solución de hipoclorito de sodio al 80 % (Chlorox) con dispersante (Tween 20) al 0.1 % durante 10 minutos en agitación constante. Por último, se lavaron con agua destilada. Las cápsulas se disectaron en una caja Petri, para extraer las semillas.

CUADRO 1. Medios de cultivo utilizado para la germinación de semillas inmaduras de orquídea.

Medio	Macronutrientes (mg·litro ⁻¹)		Micronutrientes (mg·litro ⁻¹)		Otros (por litro)	
Hutner	Hutner	Hutner				
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	35.4	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.03	Acido glutámico	4 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	50	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	6.598	Agar	15 g
	KH ₂ PO ₄	40	H ₃ BO ₃	5.720	Sacarosa	20 g
	NH ₄ NO ₃	20	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.393	pH	5.6
			Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.522		
			CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.162		
			FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.489		
Knudson C modificado	Knudson C modificado		Murashig y Skoog			
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,000	H ₃ BO ₃	6.2	Agar	17.5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	Agua de coco	150 ml
	KH ₂ PO ₄	250	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Sacarosa	20 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	500	Na ₂ MoO ₄	0.25		
			CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	pH	5.1
			CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		
			KI	0.83		
			FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85		
			Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.27		
Dalla Rosa y Laneri K07	Dalla Rosa y Laneri K07		Dalla Rosa y Laneri K07			
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,000	MnSO ₄ ·4H ₂ O	7.5	Agua de coco	150 ml
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	Agar	8 g
	KH ₂ PO ₄	250	NaEDTA·2H ₂ O	37.25	Sacarosa	20 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	500			pH	5.5
Knudson C	Knudson C					
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,000	MnSO ₄ ·4H ₂ O	7.5	Agar	17.5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	FeSO ₄ ·7H ₂ O	25	Sacarosa	20 g
	KH ₂ PO ₄	250			pH	5.1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	500				

En algunos medios se reemplazó el FePO₄·4H₂O, de la receta original por FeSO₄·7H₂O y/o Na₂ EDTA·2H₂O (recomendación de Centro Internacional de Investigación y Capacitación Agropecuaria (CIICA), Chiapas, México).

Siembra de semillas en medios de cultivos

La siembra se realizó en condiciones asépticas, en una cámara de flujo laminar. En cajas Petri de 10 cm, con 25 ml de medio de cultivo, con una cucharilla se esparcieron una capa delgada de semillas, en la superficie de los cuatro medios de cultivo. Posteriormente, se etiquetaron las cajas, se sellaron con parafilm y se colocaron en una cámara de incubación (25 a 28 °C, fotoperíodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad; intensidad de luz 3,500 lux; utilizando lámparas de luz de día).

Diseño del experimento

Para cada una de las tres especies se estableció un experimento con cuatro tratamientos (medios de cultivo), con un diseño experimental totalmente al azar. Se realizaron un total de cuatro evaluaciones, el primero a los 45 días

(en enero para *C. aurantiaca* y *E. chacaoensis*, y a fines de marzo para *B. nodosa*), seguido por tres evaluaciones más a los cuatro, seis y ocho meses después de la siembra en los medios de cultivo, para poder tomar en cuenta todos los estados de desarrollo, desde semillas hasta plántula. En la primera evaluación se consideraron tres repeticiones por especie y 50 individuos por repetición. En la segunda, tercera y cuarta evaluación se utilizaron seis repeticiones por especie y 50 individuos por repetición.

Evaluación del porcentaje de germinación y desarrollo de protobulbos y plántulas en los diferentes medios de cultivos.

En estos experimentos se identificaron seis variables como indicadores del aporte del medio de cultivo al proceso de propagación de las tres especies de orquídeas usando semillas inmaduras.

En las primeras dos evaluaciones se tomaron en cuenta el porcentaje de germinación y se utilizaron índices para distinguir entre seis etapas del desarrollo de los protobulbos (Figura 1). En la tercera y cuarta evaluación se continuó con las medidas de porcentaje de germinación y el desarrollo de los protobulbos. También, mediante observación detallada en el transcurso del estudio, se establecieron índices para distinguir entre niveles para las variables de tamaño (de 0 a mayores de 23 mm, 8 niveles), número de hojas (9 niveles), número de raíces (5 niveles) y color (negro, amarillo, verde pálido, verde oscuro, 4 niveles) (Cuadro 2). Para los índices que describen todas las variables, nivel 1 es lo más bajo y menos deseable.

El procedimiento para realizar las evaluaciones consistió en tomar tres pequeñas muestras de 2 cm², del medio de cultivo con las semillas-protobulbos-plántulas de orquídeas para su observación al estereomicroscopio. El resto de las plántulas se transfirieron a medio fresco para seguir con su desarrollo.

En el caso de *E. chacaoensis*, todos los medios se oscurecieron y en las primeras dos evaluaciones se observó poca germinación y desarrollo en los medios Knudson C modificado y Dalla Rosa y Laneri. En lugar de cancelar el estudio de esta especie, se reemplazaron estos dos medios

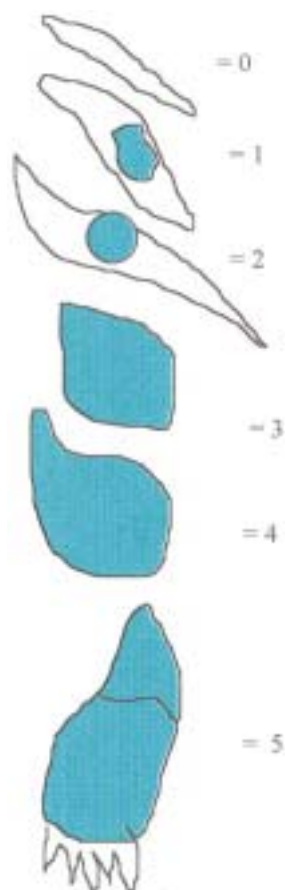


FIGURA 1. Etapas de desarrollo de las protobulbos y plántulas de orquídeas y los índices correspondientes.

CUADRO 2. Índices utilizados para los la evaluación del desempeño de las protobulbos y plántulas de tres especies de orquídeas en cuatro medios de cultivo.

Tamaño (mm)	Índices	Hojas índices	Raíces índices	Color	Índice
0 a 1	0	0	0	Negro	0
2	1	1	1	Amarillo	1
3 a 5	2	2	2	Verde pálido	2
6 a 7	3	3	3	Verde oscuro	3
8 a 10	4	4	4		
11 a 14	5	5	5		
15 a 17	6	6	6		
18 a 22	7	7	7		
23+	8	8	8		

con Hutner con la adición de agua de coco, y Hutner con carbono activado. Después de la tercera evaluación, ahora con plántulas más desarrolladas, se volvió a incorporar en el estudio el medio Dalla Rosa y Laneri KO7.

Secuencia de evaluaciones de la especie *Epidendrum chacaoensis*:

primera – medios Hutner, Knudson C modificado, Dalla Rosa y Laneri, Knudson C.

segunda – medios Hutner, Knudson C modificado, Dalla Rosa y Laneri, Knudson C.

tercera – medios Hutner, Hutner + carbon activado, Hutner + agua de coco, Knudson C.

cuarta – medios Hutner, Hutner + carbon activado, Dalla Rosa y Laneri, Knudson C.

Análisis de datos

Para cada especie de orquídea, cada repetición y variable, se calculó el porcentaje de germinación y la suma y promedio de los individuos evaluados que se ubicaron dentro de cada nivel de índice. Los datos para cada especie de orquídea y cada medio de cultivo fueron comparados por ANOVA. En el caso de una diferencia significativa, se aplicó la prueba de Tukey.

RESULTADOS

Debido a que se tomaron muchos datos, la mayoría de los cuales no facilita la selección entre los cuatro medios de cultivo, se resumen los resultados presentándose únicamente las diferencias significativas.

***Cattleya aurantiaca*:**

Germinación y desarrollo de las plántulas – No hubo diferencia significativa entre el número de semillas germinadas de la *Cattleya aurantiaca* en los cuatro medios de cultivo, en las primeras dos evaluaciones. En la segunda evaluación, el porcentaje de germinación promedio fue muy similar, 91.3, 93.2, 92.12 y 91.9 % en los medios Hutner, Knudson C modificado, Dalla Rosa y Laneri, Knudson C, respectivamente. No hubo diferencia significativa en cuanto al desarrollo de plántulas en los diferentes medios de cultivo.

Color – En la primera evaluación, no hubo diferencia significativa en el color de las plántulas entre los cuatro medios de cultivo (22.7, 8.7, 11.3 y 64 % con color verde oscuro en los medios Hutner, Knudson C modificado, Dalla Rosa y Laneri, Knudson C, respectivamente). En la segunda evaluación se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), presentándose mayor desarrollo del color verde oscuro en los medios Knudson C modificado (92 %) y Knudson C (87.7 %) seguido por Hutner (76.3 %) y por último Dalla Rosa y Laneri (62.6 %). En la tercera evaluación no hubo diferencia significativa (97, 99.3, 99.3, 99.7 % con color verde oscuro en los cuatro medios de cultivo). Finalmente, en la cuarta evaluación, se observó una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.01$), indicando el pobre desarrollo del color en el medio Hutner, con la presentación de colores no deseables desde verde claro hasta amarillo en las plántulas.

Número de hojas – En la tercera evaluación, se encontró una diferencia significativa entre los cuatro medios de cultivo, con mayor número de hojas en el medio Dalla Rosa y Laneri y menor en el medio Knudson C ($P \leq 0.05$). En la cuarta evaluación, también el medio Dalla Rosa y Laneri fue el mejor, pero las diferencias entre los medios fueron más notables, con una diferencia significativa entre éste y el medio Hutner ($P \leq 0.01$), además del medio Knudson C.

Número de raíces – Se encontró una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.01$) con un mejor desarrollo de las raíces en los medios Hutner y Dalla Rosa y Laneri. En la misma manera que con las hojas, hubo mayor diferencia significativa entre los medios en la cuarta evaluación, que en la tercera, y sobresalió el medio Dalla Rosa y Laneri como el más favorable para el desarrollo de las raíces ($P \leq 0.01$).

Tamaño de las plantas – Tanto en la tercera como en la cuarta evaluación, se encontraron diferencias altamente significativas entre el tamaño de las plantas en los diferentes medios de cultivo, con un mejor tamaño en el medio Dalla Rosa y Laneri ($P \leq 0.01$) (Cuadro 3).

***Epidendrum chacaoensis*:**

Durante los primeros dos meses, todos los medios de cultivo se oscurecieron, por lo que se reemplazaron los medios Knudson C modificado y Dalla Rosa y Laneri por los medios Hutner + carbono activado y Hutner + agua de coco, así que para la interpretación de los resultados de esta especie, se tiene que tomar en cuenta los ajustes que se realizaron en los contenidos de los medios.

Germinación – En la primera evaluación no hubo diferencia significativa entre los cuatro medios de cultivo (70.6, 73.3, 66, 69.3 % de germinación en los cuatro medios de cultivo). En la segunda evaluación, hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$), siendo los medios Hutner (95.3 %) y Knudson C (92.4 %) los que mejor facilitaron la germinación de las semillas de la *E. chacaoensis* (en comparación a Knudson C modificado, 90 %; Dalla Rosa y Laneri, 78.34 %).

Desarrollo – No hubo diferencia significativa entre los cuatro medios de cultivo en la primera evaluación. En la segunda evaluación, hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre todos los medios de cultivo, siendo los medios Hutner y Knudson C los que mejor promovieron el desarrollo de las plántulas.

Color – No hubo diferencia significativa entre los medios de cultivo en cuanto al color en la primera evaluación, pero en la segunda, las plántulas en el medio Dalla Rosa y Laneri presentaron colores desde verde amarillo a amarillo, con una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.01$) indicando el pobre desarrollo del color en comparación a los demás medios.

En la evaluación tres, se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), encontrándose en el medio Knudson C las plántulas con el óptimo color de verde oscuro.

Los resultados de la cuarta evaluación también indicaron el menor desarrollo del color verde oscuro en el medio Hutner, con una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.01$).

Número de hojas – En la tercera evaluación, se encontró una diferencia significativa entre los cuatro medios de cultivo, con mayor número de hojas en el medio Hutner + carbono activado ($P \leq 0.01$).

En la cuarta evaluación se demostró la superioridad en hojas del medio Dalla Rosa y Laneri (diferencia altamente significativa, $P \leq 0.01$), a pesar de los malos resultados con este medio al principio del experimento, este fue seguido por el medio Hutner + carbono, como promovedores de la producción de hojas.

Número de raíces – Los resultados de la tercera evaluación demostraron una mayor cantidad de raíces en

CUADRO 3. Promedio de protobulbos y plántulas de *Cattleya aurantiaca* y *Encyclia chacaoensis* por tamaño en mm (8 niveles) en cuatro medios de cultivo a los 6 y 8 meses después de la siembra.

Especie	Edad (meses)	Tamaño (mm)	Promedio de protobulbos y plántulas			
			Hutner	Knudson C modificado	Dalla Rosa y Laneri	Knudson C
<i>C. aurantiaca</i>	6	2	4.83	8.3	1.7	19.0
		3 a 5	17.5	25.3	4.5	11.2
		6 a 7	23.3	4.0	25.3	19.0
		8 a 10	3.3	12.2	11.8	0.0
		11 a 14	0.5	0.2	5.7	0.0
		15 a 17	0.0	0.0	1.0	0.0
	8	2	8.2	9.2	1.3	10.0
		3 a 5	4.3	13.5	1.2	13.5
		6 a 7	21.0	27.0	8.0	25.5
		8 a 10	5.8	0.3	11.3	0.8
		11 a 14	3.3	0.0	14.0	0.2
		15 a 17	0.2	0.0	10.0	0.0
		18 a 22	0.0	0.0	1.7	0.0
		>23	0.0	0.0	0.8	0.0
<i>E. chacaoensis</i>	6	2	33.0	20.0	31.8	25.5
		3 a 5	4.0	2.0	4.3	5.2
		6 a 7	11.8	21.2	13.3	19.2
		8 a 10	1.2	6.5	0.5	0.2
		11 a 14	0.0	1.2	0.0	0.0
		15 a 17	0.0	0.2	0.0	0.0
	8	2	2.5	0.2	0.0	0.2
		3 a 5	2.5	0.3	0.2	7.7
		6 a 7	13.8	9.5	8.0	35.2
		8 a 10	7.3	23.0	24.3	7.0
		11 a 14	2.3	16.0	13.0	0.0
		15 a 17	0.0	1.0	3.5	0.0
		18 a 22	0.0	0.0	1.0	0.0
		>23	0.0	0.0	0.0	0.0

los medios Hutner + carbono y Knudson C, respectivamente, con una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.01$).

En la evaluación cuatro, resultó más favorable el medio Dalla Rosa y Laneri para el desarrollo de las raíces, seguido por el medio Hutner + carbono (diferencia altamente significativa, $P \leq 0.01$).

Tamaño de las plantas – En la evaluación 3, se encontró una diferencia significativa entre el tamaño de las plantas en los diferentes medios de cultivo, con un mejor tamaño en el medio Hutner + carbono activado ($P \leq 0.01$) (Cuadro 3).

En la cuarta evaluación, el medio Dalla Rosa y Laneri fue el mejor promotor de crecimiento, seguido por la

combinación del medio Hutner + carbono, con una diferencia significativa ($P \leq 0.01$) en comparación con los demás medios (Cuadro 3).

***Brassavola nodosa*:**

Por el rápido desarrollo de esta especie, se midieron las variables de germinación y desarrollo de protobulbos solamente en la primera evaluación. En la segunda evaluación se pasó directamente a medir el tamaño, número de hojas y número de raíces además del color, que se estimó en todas las evaluaciones. Asimismo, después de la tercera evaluación, las plántulas pasaron directamente a la fase de aclimatación, sin realizar la cuarta evaluación.

Germinación – En la primera evaluación, el grado

de germinación en los cuatro medios de cultivo fue similar en los medios Hutner, Dalla Rosa y Laneri y Knudson C (73.3, 74 y 78 %, respectivamente) y significativamente mejor que en el medio Knudson C modificado (64 %) ($P \leq 0.01$).

Desarrollo – En la primera evaluación, se observó un mejor desarrollo en el medio Knudson C y niveles muy parecidos entre los demás medios ($P \leq 0.01$).

Color – En la primera evaluación, el color fue óptimo en tres de los medios pero entre amarillo y verde claro en el medio Knudson C modificado, con una diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

En la segunda evaluación, hubo una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.01$) entre el color de las plantas en los cuatro medios de cultivo, siendo el medio Dalla Rosa y Laneri el que ofreció las condiciones para el mejor desarrollo del color. A los 6 meses, también las plántulas en este medio tenían el mejor color ($P \leq 0.01$).

Número de Hojas – A los cuatro meses, el medio Dalla Rosa y Laneri proporcionó las condiciones para el desarrollo de la mayor cantidad de hojas, con una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.01$). A los seis meses, el mismo medio siguió ofreciendo las mejores condiciones para el desarrollo de las hojas ($P \leq 0.01$).

Número de Raíces – En la segunda y tercera evaluaciones, a los cuatro y seis meses, respectivamente, el desarrollo de las raíces fue mejor en el medio Dalla Rosa

y Laneri, con una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.01$).

Tamaño – En la segunda evaluación, se encontró que las plantas en el medio Dalla Rosa y Laneri tenían un tamaño significativamente mejor ($P \leq 0.01$) que las plantas en los otros medios. El desarrollo en el medio Knudson C fue muy limitado (Cuadro 4). A los seis meses, el medio Dalla Rosa y Laneri demostró una clara ventaja en cuanto al tamaño de las plántulas (Cuadro 4).

DISCUSIÓN

Existen muy poca información sobre la propagación *in vitro* por semillas inmaduras de orquídeas, y mucho menos para especies que, hasta la fecha, carecen de valor comercial. Se ha generado información sobre la propagación de orquídeas terrestres raras y en peligro de extinción, pero se sabe muy poco de la propagación de la gran mayoría de las orquídeas que son epífitas. La producción de cápsulas de semillas en la naturaleza por la mayoría de las orquídeas es muy poca, pero se compensa pero la presencia de miles de semillas por cápsula, hasta uno o dos millones en algunos casos y un máximo de cuatro millones recordado para *Cycnoches* sp. (Pridgeon *et al.*, 1999), recurso de suma importancia para la conservación y cultivo sustentable de estas plantas. La mayoría de las orquídeas epífitas dependen de la relación simbiótica con un hongo para la germinación de las semillas y la persistencia de las plántulas. Por ahora, la carencia de conocimientos al respecto hace obligatorio la aplicación de métodos de *in vitro* para la propagación masiva de orquídeas, sin embargo, se ha notado que la adaptación a

CUADRO 4. Promedio de protobulbos y plántulas de *Brassavola nodosa* por tamaño en mm en cuatro medios de cultivo a los 4 y 6 meses después de la siembra.

Especie	Edad (meses)	Tamaño (mm)	Medio de cultivo			
			Hutner	Knudson C modificado	Dalla Rosa y Laneri	Knudson C
<i>B. nodosa</i>	4	2	28.0	18.3	6.3	46.8
		3 a 5	6.4	9.7	2.7	1.6
		6 a 7	15.6	21.8	32.7	2.2
		8 a 10	0	0.2	5.3	0
		11 a 14	0	0	2.8	0
		15 a 17	0	0	0.2	0
	6	2	0	0	0	22.5
		3 a 5	15.0	15.0	0.2	16.3
		6 a 7	31.2	34.2	8.2	11.2
		8 a 10	3.7	0.7	13.3	0
		11 a 14	0.2	0.2	18.0	0
		15 a 17	0	0	8.2	0
		18 a 22	0	0	1.3	0
		>23	0	0	0.8	0

las condiciones naturales de orquídeas propagadas *in vitro*, sin la relación simbiótica con un hongo micorrízico, implica muchas pérdidas (Damon, 2002). Estas plantas, recién salidas de condiciones asépticas y controladas, con un alto grado de humedad, tienden a padecer de un cutícula, estomas (Hew y Yong, 1999) y sistema radical poco desarrollados, que hace que las plántulas demuestran poca resistencia hacia la deshidratación y ataques por plagas y enfermedades. Entonces, urge el estudio de la relación simbiótica para poder maximizar el aprovechamiento de las semillas.

Hay que tener siempre presente que la respuesta de las semillas a las condiciones *in vitro* sería muy diferente a la respuesta a las condiciones naturales. En la naturaleza, las orquídeas epífitas viven en condiciones muy deficientes de nutrimentos y los medios de cultivo tendrán una concentración muy por arriba de las concentraciones encontradas en el medio natural; por ejemplo, Lugo-Lugo (1955a y b) reportó que la *Vanilla planifolia* se desarrolló mucho mejor en el medio de cultivo Knudson B a una concentración de una décima parte del original. La situación en la naturaleza es muy compleja y poco estudiada e involucra muchos factores ambientales y, además de los hongos micorrízicos, posiblemente se ven implicados otros organismos más, como los líquenes y musgos (Frei, 1973).

En este estudio sobre germinación de las semillas y desarrollo de los protobulbos y plántulas hasta los ocho meses, de las orquídeas epífitas, *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis* y *Brassavola nodosa*, un factor importante y poco estudiado, que no se consideró era la madurez y la condición en la que se encuentran las semillas de la orquídea. Se comenta en la literatura la existencia de factores de inhibición en la cápsula de algunas especies de orquídeas; entonces para éstas sería mejor colectar la cápsula en estado inmaduro. Así mismo, la tasa de germinación de algunas especies de orquídeas puede mejorarse mediante técnicas físicas y químicas, por ejemplo remoción o la esterilización de la superficie de la semilla, técnicas que probablemente logran quitar las sustancias inhibitorias (Pritchard, 1989). Harrison (1973, 1977) demostró que los embriones de las semillas de la *Cattleya aurantiaca* contienen reservas de lípidos y algunos cuerpos proteicos. En otros grupos de plantas mayores, la conversión de las reservas de lípidos toma lugar en los cotilodones, mediante los glioxisomas, en donde el acetato, proveniente de los lípidos, se convierte en azúcares. Las orquídeas no tienen cotilodones y se observó que durante la germinación de las semillas y el subsiguiente desarrollo de los protobulbos, los lípidos se consumieron muy lentamente por limitantes en la disponibilidad de caminos bioquímicos para su metabolización, posiblemente por falta de la contraparte, el hongo micorrízico. El desarrollo de una técnica que permita un mejor aprovechamiento de esta reserva por parte de la planta tierna puede ayudar mucho en su desarrollo. Existen algunos estudios hechos con *C.*

aurantiaca que indican que esta orquídea puede aprovechar nutrientes básicos como el azúcar y los diferentes fuentes de nitrógeno, como los amino ácidos, amonio y nitratos durante diferentes etapas de su desarrollo (Harrison, 1973, 1977; Harrison y Arditti, 1978). A pesar de estos factores, en el estudio actual, la germinación de las semillas de *C. aurantiaca* fue arriba de 90 % en todos los medios y la única diferencia significativa fue para las semillas de *B. nodosa*, que no germinaron bien en el medio Knudson C.

Recientemente se han hecho varios estudios sobre el efecto de la incorporación de hongos micorrízicos en los medios de cultivo y se ha comprobado que las semillas de algunas especies de orquídea germinan muy bien en sustratos con trialosa y manitol, dos carbohidratos de origen fúngica (Hew y Yong, 1999). Además, las técnicas más modernas para la propagación *in vitro* promueven el desarrollo del aparato fotosintético de la planta y una disminución de contaminación, mediante una reducción de carbohidrato en el medio de cultivo, condiciones de alta iluminación y un intercambio de gases mejorado. Técnicas para facilitar el intercambio de gases también previene la acumulación de etileno, que inhibe el crecimiento (Hew y Yong, 1997). Sin embargo, estas técnicas no están al alcance de la mayoría de los productores pequeños, aquellos que pueden intervenir en la conservación de componentes de la riqueza biológica, como las orquídeas.

Nuestra meta en este estudio fue la selección del mejor método entre los que ya existen, para la propagación de tres especies de orquídeas con potencial como plantas de ornato. Se espera así ofrecer de inmediato una técnica económica y sencilla para las propagación de orquídeas que fuera alcanzable por los cafeticultores de la región del Soconusco, México, y que ofreciera una alternativa al saqueo interminable de plantas de la naturaleza. El proyecto "Ecología y cultivo sustentable de orquídeas nativas del Soconusco" de ECOSUR, Unidad Tapachula, México, también se dedica a estudiar la problemática de la relación simbiótica con hongos micorrízicos como coadyuvante al proceso de la propagación *in vitro*, además de la polinización de orquídeas por diversas especies de insectos para asegurar la fuente de cápsulas de semillas.

Los resultados de este trabajo indican que cada medio de cultivo presenta ventajas y desventajas; para ninguna de las especies de orquídeas sobresalió sólo uno de los medios para todas las variables en conjunto. Es difícil identificar prioridades y decidir, por ejemplo, que alcanzar a un mayor número de raíces para adherirse al sustrato y captar agua y nutrimentos sería más importante que el desarrollo de un buen color que ofrecería a la plántula mayores posibilidades de autosuficiencia. No se encuentran estudios de este tipo en la literatura y es necesario investigar precisamente la importancia relativa de estos aspectos del desarrollo y crecimiento que se identificaron en este estudio como indicadores del aporte de los medios de cultivos.

Durante el proceso de adaptación al medio natural, hubo muchas pérdidas pero de manera pareja y no se identificaron debilidades relacionadas a la proveniencia de un determinado medio de cultivo (Damon, 2002). En este estudio se decidió enfocarse en el tamaño del producto como el indicador que más representa el aporte del medio de cultivo. En resumen, según los resultados de este trabajo, se puede recomendar el medio Dalla Rosa y Laneri (macronutrientes Dalla Rosa y Laneri KO7, [reemplazando el $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]; micronutrientes Dalla Rosa y Laneri KO7) para la germinación y primera fase del desarrollo, hasta los ocho meses, de las orquídeas *Cattleya aurantiaca* y *Brassavola nodosa*. La tercera especie, *Encyclia chacaoensis* presentó problemas en todos los medios de cultivo probados en este estudio, especialmente en Knudson C modificado y Hutner + agua de coco; se recomienda volver a probar el efecto, durante el proceso completo, desde semilla a plántula, de Dalla Rosa y Laneri y Hutner + carbono activo, además de buscar otros sustratos para esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias a la cooperación del departamento de biotecnología del Centro Internacional de Investigación y Capacitación Agropecuaria, A. C. (CIICA), y el financiamiento de la Fundación Produce, A. C. de Tuxtla Gutiérrez.

LITERATURA CITADA

- ARDITTI, J. 1984. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press. Ithaca, USA. 432 p.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. 1993. *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Sons, New York. USA. 640 p.
- ATWOOD, J. T. JR. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 7:129-247.
- DALLA ROSA, M.; LANERI, U. 1977. Modification of nutrient solutions for germination and growth "in vitro" of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. *American Orchid Society Bulletin* 46: 813-820.
- DAMON, A. 2002. Informe final. Proyecto: "Factibilidad, rendimiento y disponibilidad de polinizadores, para el cultivo de 6 especies de orquídeas propagadas *in vitro* y establecidas en plantaciones de café y cacao en la región del Soconusco. Fundación Produce, Chiapas.
- DRESSLER, R. L. 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 330 p.
- FREI J. K. 1973. Orchid ecology in a cloud forest in the mountains of Oaxaca, Mexico. *American Orchid Society Bulletin* 42: 307-314.
- HADLEY, G. 1997. Orchid mycorrhiza, pp. 83-118. *In: Orchid Biology: Reviews and Perspectives Vol. II*. Cornell University Press.
- ARDITTI, J.; PRIDGEON, A. M. (eds.). Ithaca, New York. USA.
- HARRISON, C. R. 1973. Physiology and ultrastructure of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae) germination. Ph. D. Thesis. University of California, Irvine, USA.
- HARRISON, C. R. 1977. Ultrastructure and histological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 138: 41-45.
- HARRISON C. R.; ARDITTI, J. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 139: 180-189.
- HEW, C. S.; YONG, J. W. 1999. *The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry*. World Scientific Publishing. Singapore, Singapore. 341 p.
- HUTNER, S. H. 1953. Comparative physiology of heterotrophic growth in plants, pp. 417-446. *In: Growth and Differentiation in Plants*. LOOMIS, W. E. (ed.). Iowa State College Press. Ames, USA.
- KNUDSON, C. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73: 1-25
- KNUDSON, C. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- LUGO-LUGO, H. 1955a. Effects of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia* seeds. *American Orchid Society Bulletin* 24: 309-312.
- LUGO-LUGO, H. 1955b. The effect of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia* seeds. *American Orchid Society Bulletin* 24: 679-684.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- PRIDGEON, A. M.; CRIB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. 1999. *Genera Orchidacearum. Volume 1. General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Oxford University Press. Oxford, UK. 352 p.
- PRITCHARD, H. W. (ed.). 1989. *Modern Methods in Orchid Conservation the Role of Physiology, Tecology and Management*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 192 p.
- STEWART, J.; GRIFFITHS, M. 1995. *Manual of Orchids*. Timber Press. Portland, USA. 388 p.