

CULTIVO DE TEJIDOS DE ORQUIDEAS: *Cattleya*, *Eneyelia*, *Oncidium* y *Stanhopea*.

López Villalobos, A.¹; Mejía Muñoz, J.²; Sosa-Moss, C.³

RESUMEN. Con el objetivo de determinar el mejor medio de cultivo e intensidad de luz en el desarrollo *in vitro* de plántulas de los géneros de orquídeas *Cattleya*, *Eneyelia*, *Oncidium* y *Stanhopea* se estableció un experimento bajo un diseño factorial de 4×3^2 de acuerdo a un arreglo de bloques al azar generalizado, desbalanceado con submuestras, en el cual se consideró como bloque a la "intensidad de luz" (500, 1000 y 1500 lux) y como tratamientos las combinaciones de los cuatro géneros y tres medios de cultivo. Se registraron diferentes variables respuestas para medir el desarrollo de raíces y la parte aérea.

Del análisis de resultados se obtuvo que existen interacciones estadísticamente significativas entre los factores de estudio por lo que en la selección de un medio de cultivo se deben de considerar, además del género de orquídeas a propagar, la intensidad de luz en la que procederán las plántulas de orquídeas. La mejor intensidad de luz para los géneros probados fue de 1500 lux y el mejor medio de cultivo para los géneros *Cattleya*, *Eneyelia* y *Oncidium* correspondió al Vacin y Went (1949) suplementado con 25% de agua de coco, mientras que para *Stanhopea* el de Knudson (1946) modificado por Morel (1965, 1970) suplementado con 60 $g\ l^{-1}$ de pulpa de plátano (Arditti, 1977).

PALABRAS CLAVE. Micropropagación, luz, pulpa de plátano, agua de coco.

TISSUE CULTURE OF ORCHIDS: *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* and *Stanhopea*

SUMMARY. With the objective of determine the best culture media and intensity of light in the development *in vitro* of seedlings of the genus *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* and *Stanhopea*; an experiment was established in factorial design 4×3^2 in arrangement of generalized random blocks desbalanced with subsamples, the blocks were considered as "light intensity" (500, 1000 and 1500 lux) and like treatments the combinations of the four genus and three culture media. Different response variables were rested to measure the development of roots and shoots.

The results indicate that significant statistically interactions exist between the studied factor, thus the selection of a culture media must consider, appart of the orchid genus, the light intensity where the plants will be established. The best light intensity for the tested genus was 1500 lux and the best culture media for the genus *Cattleya*, *Encyclia* and *Oncidium* was the Vacin and Went (1949) supplemented with 25% of coconut water, for thegenus *Stanhopea* the culture media Knudson (1946) modified by Morel (1965-1970) supplemented with 60 $g\ l^{-1}$ of banana pulp (Arditti, 1977).

KEY WORDS: Micropropagation, light, banana pulp, coconut water.

INTRODUCCIÓN

La reproducción de orquídeas bajo condiciones naturales es sumamente difícil. Esto es debido a que las cápsulas son raramente formadas a causa de la baja polinización y fertilización de los óvulos. Adicionalmente, las semillas de orquídeas presentan requerimientos climáticos y bióticos (micorrizas) muy particulares por lo menos del 5% de éstas germinan. Por el contrario, mediante el cultivo de embriones se tiene un control de las condiciones ambientales y los medios nutritivos posibilitan la germinación asimbiótica de las semillas. Esto hace posible la obtención de un alto número de plantas a partir de una sola cápsula

umentando substancialmente la multiplicación de la especie (Knudson, 1946; Arditti, 1977).

Dentro de las especies silvestres de alto potencial económico se encuentran las pertenecientes a los géneros *Oncidium*, *Cattleya*, *Laelia*, *Encyclia*, *Epidendrum* y *Stanhopea* las cuales actualmente se comercializan en el mercado nacional. Sin embargo, en la mayoría de éstas no se tienen técnicas económicamente redituables para su reproducción comercial. Indudablemente, una de estas formas de propagación sería mediante la técnica de cultivo de tejidos. Aunque ya se han establecido las metodologías para propagar diferentes géneros comerciales de orquídeas, es necesario su adaptación debido a que es

1 Investigador adjunto, CEICADES, Colegio de Postgraduados, Cárdenas, Tabasco.

2 Profesor investigador, Depto. de Fitotecnia, UACh, Chapingo, México. C.P.56230.

3 Profesor investigador titular, Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

muy conocida la existencia de respuestas diferenciales por efecto de géneros, especies y cultivares (Dalla y Laneri, 1977 y Arditti *et al.*, 1981)

Actualmente existen muchos trabajos en los que se han determinado algunos medios de cultivo para la exitosa germinación de semillas de algunos géneros de orquídeas de clima tropical, sin embargo, aún no se tienen medios nutritivos que posibiliten un adecuado desarrollo de estas plantas, así como tampoco existe el conocimiento del efecto de algunas condiciones de cultivo en el fenómeno biológico anteriormente mencionado. En consecuencia de este trabajo fue determinar el mejor medio de cultivo e intensidad de luz en la etapa de desarrollo en el cultivo *in vitro* de semillas de los géneros de orquídeas *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* y *Stanhopea*.

REVISION DE LITERATURA

Factores que afectan la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas.

Nutrición mineral. En investigaciones iniciales en la germinación de semillas de orquídeas se usaron varios medios de cultivo. Una solución que fue definitivamente superior para la germinación y crecimiento de plántulas es la denominada Knudson B. Esta se utilizó ampliamente para la germinación de muchos géneros de orquídeas tales como *Cattleya*, *Epidendrum*, *Oncidium*, *Laelia*, *Odontoglossum*, *Phalaenopsis*, *Cymbidium* y otros (Knudson, 1946). Sin embargo, con el posterior desarrollo de otros medios nutritivos se observaron diferentes respuestas en las semillas. Muchas investigaciones realizadas con diferentes especies del género *Cattleya* han reportado al Knudson C y sus modificaciones como el mejor (Arditti, 1967). Otro medio utilizado ampliamente en el cultivo de semillas del género anterior y de algunos otros, tales como *Brassavola*, *Broughtonia*, *Epidendrum*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Aerides*, *Doritis*, *Phalaenopsis*, *Renanthera* y *Vanda* es el de Vacin y Went (1949) Almayor y Sagawa, 1967).

Comparando los medios de cultivo Knudson C, Vacin y Went (1949) y Murashige y Skoog (1962) en un híbrido de *Cattleya* *Enid alba* *Xlaelia anceps* var. *veitchii*, los resultados obtenidos mostraron que el mejor medio fue el Murashige y Skoog debido a que presentó el menor número de días para que las semillas se tornaran verdes y mayor peso seco; los valores obtenidos fueron de 24.8 días y 27.2 mg, respectivamente (Zeigler *et al.*, 1967).

Efecto de aditivos complejos. El agua de coco se ha usado en gran cantidad de experimentos de germinación. Se ha reportado al agua de coco como un componente estimulante en la germinación de semillas de *Oncidium*, *Epidendrum*, *Cattleya*, *Cydidium* y *Bras-*

savola (Valmayor y Sagawa, 1967 y Dalla y Laneri, 1977). Otras investigaciones realizadas con los géneros *Vanda*, *Vanilla*, *Cattleya* y *Paphiopedilum* reportan un aumento en el crecimiento y una mejor germinación al adicionar peptona al medio de cultivo (Arditti, 1977).

Otro aditivo ampliamente utilizado para estimular el crecimiento de plántulas es la pulpa de plátano. La adición de 2-6 ml de homogenizado de plátano por 25 ml de medio sólido de Knudson C produjo un crecimiento cinco veces mayor al obtenido en el testigo. Algunos reportes también mencionan el efecto favorable de este componente sólo y en combinación con carbón activado en el crecimiento de plántulas de *Cattleya*, *Phalaenopsis* y *Paphiopedilum* (Dalla y Laneri, 1977).

Efecto de la luz. Las semillas de orquídeas varían considerablemente en sus respuestas al fotoperíodo e intensidad de luz. Algunas requieren luz para germinación, mientras que otras pueden germinar en la oscuridad. Las semillas de *Vanilla* germinan bien en la oscuridad, pero se ven afectadas con intensidades de aproximadamente 8600 lux (Arditti, 1967).

Otras especies germinan bien, tanto en luz, como en oscuridad, pero las plántulas que crecen en luz difieren de las que estuvieron en oscuridad. La mayoría de las investigaciones reportan que las semillas de *Cattleya* germinan exitosamente en la luz, con un fotoperíodo que varía de 10 a 18 horas, desarrollando un primordio de hoja a los 21 días (Arditti, 1967 y Nishimura, 1981).

En otros géneros como *Epidendrum*, *Encyclia* y *Stanhopea*, los requerimientos de luz no se han estudiado o existe poca información. En el primer género se obtiene éxito en la germinación cuando se utiliza luz continua y una intensidad de 1290 lux (Valmayor y Sagawa, 1967).

En trabajos realizados en la germinación de semillas de *Oncidium* se emplea un fotoperíodo de 16 horas o luz continua. En la etapa de crecimiento, no obstante que la plántula parece requerir oscuridad para la formación de hojas y raíces normales en esas condiciones, el crecimiento en condiciones de luz es mayor (Arditti, 1967).

MATERIALES Y METODOS

Cultivo *in vitro* de semillas. En este trabajo se utilizaron plántulas de orquídeas en la etapa de protocormo, sin o con una hoja, de las especies *Cattleya aurantiaca* (Batem) P.N., *Encyclia belizensis* subsp. *parviflora* (Regel) Dressler y Pollard, *Oncidium leucochilum* Bateman ex Lindley y *Stanhopea intermedia* Klinge. Estas se obtuvieron mediante la germinación *in vitro* de semillas en el medio Vacin y

Went (1949) modificado por la adición de 27.8 mg.l⁻¹ de FeSO₄·7H₂O y 37.3 mg.l⁻¹ de Na₂EDTA y 25 % v/v de agua de coco (Sagawa y Valmayor, 1967) en condiciones de cultivo de 25 1/2 C, fotoperíodo de 16 h, intensidad luminosa de 1500 lux y pH del medio de cultivo de 5.2. Las cápsulas se desinfectaron en etanol 70% durante un minuto y con 30% v/v de hipoclorito de sodio comercial que contiene 6% de producto activo.

En la sala de incubación se mantuvo una temperatura de 25 p 1 1/2 C y un fotoperíodo de 16 h. La intensidad luminosa fue un factor de estudio de este trabajo: los niveles que se probaron fueron 500, 1000 y 1500 lux. El pH del medio de cultivo fue de 5.2 p 0.1.

Los medios de cultivo que se probaron fueron los siguientes:

Vacin y Went (1949) (VWS) modificado por la adición de 27.8 mg.l⁻¹ de FeSO₄·7H₂O y 37.3 mg.l⁻¹ de Na₂EDTA y 25% de agua de coco (Sagawa y Valmayor, 1967).

Knudson (1946) (KPC) modificado por la adición de 60 g.l⁻¹ de pulpa de plátano verde y de 2 g.l⁻¹ de carbón activado (Dalla y Laneri, 1967).

Knudson (1946) (KMP) modificado por Morel (1965, 1970) suplementado con 60 g.l⁻¹ de pulpa de plátano (Arditti, 1967).

Diseño del experimento. El diseño experimental fue un factorial 4X3² en un arreglo de bloques al azar generalizado desbalanceado con submuestreo, en el cual se consideró como bloque el factor intensidad de luz y como tratamientos, las combinaciones de los cuatro géneros y los tres medios de cultivo. El número total de tratamientos fue de 36 y el de repeticiones fue variable, debido a la pérdida de algunas unidades experimentales por contaminación. La unidad experimental consistió de un recipiente con medio de cultivo conteniendo de 5 a 10 plántulas. El tamaño de la muestra varió de 2 a 4 plantas debido a la mortalidad, sin embargo, en la mayor parte de los tratamientos se muestrearon 4 plantas.

Variabes respuesta. Las variables respuesta que se midieron fueron, número de hojas (NOHO) y raíces (NORA), altura de planta (ALTU), longitud de raíces (LORA), ganancia de peso fresco por planta (PEFR), porcentaje de mortalidad por unidad experimental (MOTT) y relación raíz/parte aérea considerando el número de hojas y raíces (RRPN) en un caso, y la longitud de raíces y altura de planta (RRPL) en el otro.

Análisis estadístico. En todos los experimentos se realizó el análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey utilizando el paquete estadístico SAS. También con el propósito de obtener homogeneidad de varianzas se utilizó la

transformación ángulo = arco seno X, donde X es el porcentaje de mortalidad.

RESULTADOS

Todas la variables respuesta presentaron efectos altamente significativos en la fuente de variación de tratamientos y género. En el factor intensidad de luz se tuvieron diferencias estadísticamente significativas en casi todas las variables, con excepción en el número de hojas, ganancia de peso fresco, número de raíces en el primer muestreo, y altura de planta. De manera similar, el factor medio de cultivo no presentó efecto significativo únicamente en la variable relación raíz/parte aérea, cuando se consideró la longitud de la raíz y altura de planta. Con respecto a las interacciones entre los factores de estudio, todas tuvieron significancia en las variables altura, longitud de raíces, mortalidad y relación raíz/parte aérea. Sin embargo, la interacción intensidad de luz-género, no presentó diferencias significativas en las variables ganancia de peso fresco y número de hojas y raíces en el primer muestreo; la interacción de intensidad de luz/medio de cultivo no fue significativa solamente en las variables ganancia de peso fresco y número de hojas en ambos muestreos, mientras que la triple interacción no tuvo significancia en las variables número de hojas y raíces en el primer muestreo y en la ganancia de peso fresco.

En el factor intensidad de luz se tuvo que el nivel de 1500 lux fue estadísticamente superior con respecto a los demás niveles (Cuadro 1), mientras que los géneros probados *Encycle* fue el que tuvo mayor crecimiento comparado con los demás, con excepción en el número de hojas y raíces y la relación raíz/parte aérea donde las medias obtenidas fueron estadísticamente menores o iguales al género *Cattleya*. Con respecto a los medios de cultivo probados, en el segundo muestreo el medio VWS fue estadísticamente superior a los demás, no obstante de que en las variables ganancia de peso en fresco el medio KPC tuvo un promedio estadísticamente igual y en la mortalidad de plantas y relación raíz/parte aérea (RRPL) los promedios en la prueba de comparación de medias fueron iguales. Sin embargo, en el primer muestreo este mismo medio de cultivo presentó un número de raíces estadísticamente menor que el medio KPC (Cuadro 2).

Finalmente, debido a las interacciones entre los factores se seleccionó el mejor medio de cultivo e intensidad de luz para cada género considerando cada tratamiento. En el género *Cattleya* el medio VWS y una intensidad de luz de 1000 y 1500 lux presentaron promedios estadísticamente superiores con respecto a los demás. Similares resultados se obtuvieron con los géneros *Encyclia* y *Oncidium* pero, a diferencia del género anterior, la mejor intensidad de luz fue la de

1500 lux. Por el contrario, en el género *Stanhopea* el mejor medio resultó el KMP bajo la misma intensidad de luz que los géneros anteriores.

DISCUSION

Las intensidades de luz no tuvieron mucho efecto en la estimulación del desarrollo de la parte aérea (en la altura y formación de hojas) pero sin el desarrollo del sistema radical (Cuadro 1). Aunque no se conocen los mecanismos sobre cómo la luz afecta el desarrollo de

ha observado que la luz favorece el crecimiento de la parte aérea siempre y cuando las plántulas se encuentren en una etapa de desarrollo avanzada (Yates y Curtis, 1949).

Con respecto al desarrollo de las plántulas en los diferentes medios de cultivo, se tuvo que el medio VWS fue el que produjo mejores resultados, con excepción del género *Stanhopea*. Esto es contradictorio a los resultados que se ha obtenido con algunos componentes orgánicos complejos. Dalla y Laneri (1977) encontraron que la adición de pulpa de plátano en el

Cuadro 1. Efectos simples de la intensidad de luz en las diferentes variables respuesta en el desarrollo de plántulas de diferentes especies de orquídeas.

Intensidad de luz	Variables								ALTU	LORA	PEFR	MOTT	RRPN	RRPL
	NOHO		NORA											
	1	2	1	2										
500	2.259a	5.138a	0.551ab	1.431c	1.765a	0.968c	0.434a	16.253a	0.275c	0.499c				
1000	2.190a	5.318a	0.536b	2.076b	1.970a	1.376b	0.389a	15.474a	0.383b	0.666b				
1500	2.155a	5.251a	0.640a	2.852a	1.859a	1.850a	0.415a	12.533b	0.520a	1.021a				

Cuadro 2. Efectos simples del medio de cultivo en el crecimiento de diferentes especies silvestres de orquídeas.

Medio de cultivo	Variables								ALTU	LORA	PEFR	MOTT	RRPN	RRPL
	NOHO, +		NORA +											
	1	2	1	2										
VWS	2.367a	5.446a	0.625b	2.776a	2.186a	1.614a	0.433ab	14.766a	0.490a	0.766a				
KPC	2.437a	4.653b	1.012a	1.919b	1.745b	1.246b	0.486a	15.642a	0.410b	0.740a				
KMP	1.834b	5.535a	0.136c	1.615b	1.657b	1.297b	0.334b	12.225a	0.279c	0.677a				

raíces *in vitro*, algunos autores han observado sus efectos en esta parte de la plántula. Ernest (1974) señala que la obscuridad del medio de cultivo, proporcionada por el carbón activado, estimuló el crecimiento de raíces de plántulas de *Paphiopedilum*, siendo mayor su número y longitud comparado con el testigo. Otro aspecto que resulta importante, es la falta de significancia de los efectos de la luz, así como en la mayoría de diferentes variables que midieron el desarrollo de la parte aérea de las plántulas; una explicación posible de esto es esta porción que podría estar mayormente influenciada por la disponibilidad de nutrimentos en el medio de cultivo. Otros autores mencionan que este estímulo preferencial de la luz en la plántula dependen de los requerimientos particulares de cada género de orquídeas, así como la etapa de desarrollo de ésta (Kundson, 1922); en diferentes géneros de orquídeas se

medio nutritivo produjo mayor desarrollo en plántulas de *Cattleya* en comparación con el medio con agua de coco; similares resultados obtuvo Ernst (1974) con plántulas de *Paphiopedilum*. Sin embargo, es probable que el medio VWS suministre de una forma tan adecuada los nutrimentos y que no sea necesario la adición de otros compuestos estimuladores del desarrollo, tal es el caso del resto de los medios de cultivo probados.

CONCLUSIONES

En la selección del mejor medio de cultivo se debe considerar las interacciones de este factor con el género a cultivar y la intensidad de luz a emplear.

La mejor intensidad de luz para los géneros probados en la etapa de desarrollo fue de 1500 lux y el

mejor medio de cultivo para los géneros *Cattleya*, *Encyclia* y *Oncidium* correspondió al Vacin y Went (1949) suplementado con 25% de agua de coco, mientras que para *stanhopea* el de Knudson (1946) modificado por Morel (1965, 1970) suplementado con 60 gl^{-1} de pulpa de plátano (Arditti, 1977).

LITERATURA CITADA

- ARDITTI, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Reviews*, 33:1-97.
- ; J. A. JOHNSON y R. G. PERERA. 1981. Culture media which do not require sterilization: *Phalaenopsis* flowers stalk nodes. *Orchid Review* 89:240-245.
- . 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture. In: Arditti, J. *Orchid Biology, Reviews y Perspectivas*. Ed. Comstock Publishing Associates. New York. Tomo I. 203-294.
- DALLA, R.M.; U. LANERI. 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.
- ERNST, R. 1974. The use of activated carchoalin asymbiotic seedling culture *Paphiopedilum*. *American Orchid Society Bulletin* 43:35-39.
- KUNDSON, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchids seeds. 73:1- 25.
- , 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 19:214-216.
- MURASHIGE, T.; F. SKOOG. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, 15:472-497.
- NISHIMURA, G. 1981. Comparative morfology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *Botanical Gazzete* 3:360-361.
- VACIN, E.; F. WENT. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazzete* 110:605-613.
- VALMAYOR, L. H.; Y. SAGAWA. 1967. Ovule Culture in some orchids. *American Orchid Society Bulletin* 36:766-769.
- YATES, R. C.; J. T. CURTIS. 1949. The effect of sucrose and others factors on the shoot-root ration of orchid seedlings. *American Journal of Botany* 36:390-395.
- ZEIGLER, A. R.; SHEEHAN; R. T. POOLE. 1967. Influence of various media and Photoperiod on the growth and amino acid content of orchid seedlings. *American Orchid Society Bulletin* 36:195-202.

mejor medio de cultivo para los géneros *Cattleya*, *Encyclia* y *Oncidium* correspondió al Vacin y Went (1949) suplementado con 25% de agua de coco, mientras que para *stanhopea* el de Knudson (1946) modificado por Morel (1965, 1970) suplementado con 60 g l⁻¹ de pulpa de plátano (Arditti, 1977).

LITERATURA CITADA

- ARDITTI, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Reviews*, 33:1-97.
- ; J. A. JOHNSON y R. G. PERERA. 1981. Culture media which do not require sterilization: *Phalaenopsis* flowers stalk nodes. *Orchid Review* 89:240-245.
- . 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture. In: Arditti, J. *Orchid Biology, Reviews y Perspectivas*. Ed. Comstock Publishing Associates. New York. Tomo I. 203-294.
- DALLA, R.M.; U. LANERI. 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.
- ERNST, R. 1974. The use of activated carboalgin asimbiotic seedling culture *Paphiopedilum*. *American Orchid Society Bulletin* 43:35-39.
- KUNDSON, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchids seeds. 73:1- 25.
- . 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 19:214-216.
- MURASHIGE, T.; F. SKOOG. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, 15:472-497.
- NISHIMURA, G. 1981. Comparative morfology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *Botanical Gazzete* 3:360-361.
- VACIN, E.; F. WENT. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazzete* 110:605-613.
- VALMAYOR, L. H.; Y. SAGAWA. 1967. Ovule Culture in some orchids. *American Orchid Society Bulletin* 36:766-769.
- YATES, R. C.; J. T. CURTIS. 1949. The effect of sucrose and others factors on the shoot-root ration of orchid seedlings. *American Journal of Botany* 36:390-395.
- ZEIGLER, A. R.; SHEEHAN; R. T. POOLE. 1967. Influence of various media and Photoperiod on the growth and amino acid content of orchid seedlings. *American Orchid Society Bulletin* 36:195-202.