

USO DE COMPLEJOS COMERCIALES COMO SUSTITUTOS DE COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PROPAGACION *IN VITRO* DE *LAELIA ANCEPS*

RODRIGO ROMERO-TIRADO^{1,2}, BÁRBARA S. LUNA ROSALES¹
& AMADEO BARBA ÁLVAREZ¹

¹Unidad de Investigación en Biología Vegetal-L 301, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campo II, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 0920, México, D.F., CP 09230, México.

²Autor para correspondencia: elalacran81@hotmail.com

PALABRAS CLAVE: propagación *in vitro*, germinación asimbiótica, fertilizantes, *Laelia anceps*, conservación, sales basales, carbohidratos

Las laelias son las orquídeas mexicanas más típicas que se han cultivado por siglos. *Laelia anceps* subsp. *anceps* habita bosques de encino cálidos en México, Guatemala y Honduras. Es una planta epífita de 25 a 50 cm de altura, con pseudobulbos elipsoide-ovoides con hoja solitaria y 2-3 flores grandes, usualmente de color rosa púrpura (Halbinger 1997). Debido a sus flores llamativas es sometida a una presión de colecta muy grande, además de la destrucción de su hábitat, lo cual está provocando la disminución acelerada de sus poblaciones. A pesar de que las orquídeas producen frutos con cientos hasta millones de semillas (Benzing 1981, Arditti & Arditti 1986) dependen para germinar en su hábitat de una asociación micorrízica (Stancato *et al.* 1998), de características específicas del árbol hospedero y de condiciones ambientales favorables (Madison 1977, Dressler 1981); por lo que solo un porcentaje extremadamente bajo alcanza la madurez; un ejemplo fue *Encyclia boothiana* (Lindl.) Dressler en Florida, cuya colonia de 29 adultos produjo solo una plántula en un año (Stenberg & Kane 1998). Una de las prácticas más adecuadas para salvaguardar las orquídeas es a través de la germinación asimbiótica *in vitro*, como lo estableció Knudson en 1922 (Hicks 2005), obteniendo miles de plantas, con una variabilidad genética mucho mayor que la obtenida por la micropropagación clonal (Stenberg & Kane 1998), lo cual es deseable en caso de una reintroducción a sus áreas naturales. Las sales basales utilizadas tradicionalmente en los medios de cultivo para la germinación y desarrollo *in vitro* de otras laelias y géne-

ros emparentados son las de Knudson C (KC) para *L. purpurata* Lindl. & Paxton (Stancato *et al.* 1998), *L. albida* Bateman ex Lindl. (Santos *et al.* 2005), *E. boothiana* (Stenberg y Kane 1998); y las de Murashige y Skoog (MS) para *L. flava* Lindl. (Morales *et al.* 2005) y *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl. (Pateli 2003). Las sales basales, así como la sacarosa grado analítico, tienen un costo elevado y son de difícil adquisición en zonas rurales de la mayoría de las entidades federativas de México, por tal razón resulta conveniente sustituirlos por fertilizantes inorgánicos y azúcares caseros para la germinación y desarrollo *in vitro* de *L. anceps* subsp. *anceps*, con el propósito de establecer un protocolo útil para su propagación y se aproveche en comunidades rurales que exploten esta orquídea a través de un manejo sustentable.

Metodología

MATERIAL BIOLÓGICO. Se colectaron tres cápsulas maduras dehiscentes de *L. anceps* subsp. *anceps*, para obtener semillas.

DESINFESTACIÓN Y SIEMBRA *IN VITRO*. Se colocaron aproximadamente 100 semillas en sobres de papel filtro para su desinfestación, con etanol al 70% durante 5 min y hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.55% por 10 min, y siembra sobre los medios de cultivo para germinación. Al registrar que más del 50% de las plántulas presentaron al menos dos raíces, se transfirieron a los medios de cultivo para el desarrollo de

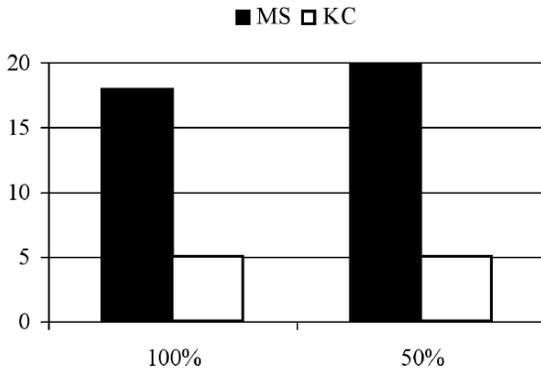


FIGURA 1. Desarrollo de plántulas a los 270 días de cultivo en medios de germinación.

plántulas con fertilizantes o con sustitutos de carbohidratos. Los cultivos se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 horas de iluminación de 581 lux emitida por cuatro lámparas fluorescentes de 40W a 20° C.

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO. Se utilizaron para la germinación de las semillas las sales basales de MS (Sigma Chemical Cat. # M5524), adicionado con vitaminas y sacarosa grado analítico, y el medio de cultivo KC (Cat. # K4003). Se prepararon al 100% y 50% de la concentración de sales con diez repeticiones cada uno. Para el desarrollo de plántulas se prepararon medios de cultivo sustituyendo las sales basales con tres fertilizantes comerciales o tres sustitutos de carbohidratos. Los fertilizantes, Peters (P) (24-8-16), Floren (Fl) (10-15-5) y Folifértil (Fol) (20-30-10), fueron utilizados en tres concentraciones, al 100%, 50% y 25%, la primera concentración igualó el peso de las sales del medio MS utilizado como testigo. Los sustitutos de carbohidratos, azúcar refinada (AR), azúcar no refinada (ANR) y piloncillo (P) fueron adicionadas por separado al medio MS (testigo), en sustitución de la sacarosa grado analítico (S). Se utilizaron 20 plántulas o repeticiones para cada medio de cultivo. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 20 lbs pulg⁻¹ y 120° C durante 15 min. En los medios de cultivo para germinación se registraron a los 270 días el número y peso fresco de las plántulas germinadas. Las plántulas después de 100 días de cultivo, en el medio para su desarrollo, se registraron altura de la planta, longitud de raíz, número de raíces y plantas con pseudobulbos. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA), con el

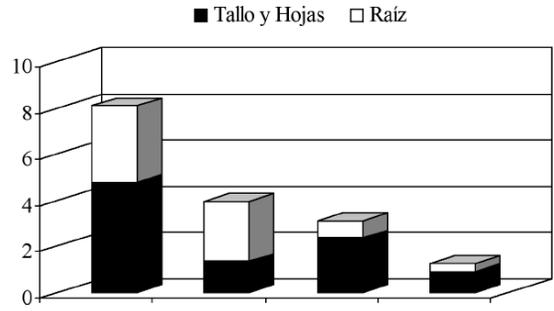


FIGURA 2. Peso fresco en gramos de plántulas a los 270 días de cultivo en medios de germinación.

programa Statgraphics Plus 5.0, cuando el análisis fue no paramétrico se empleó la prueba de Kruskal Wallis y el diagrama de cajas y alambres y cuando fue paramétrico se utilizó la prueba de intervalos de Tukey, para establecer en cual de los medios de cultivo se obtuvo mejor respuesta para la germinación y desarrollo de plántulas de *L. anceps* subsp. *anceps*.

Resultados y Discusión

GERMINACIÓN. Después de 270 días de la siembra de las semillas de *L. anceps* subsp. *anceps* para su germinación se determinó que en los medios MS al 50 y 100% se desarrollaron una mayor cantidad de plántulas con dos o más raíces (Fig. 1). A pesar de no existir diferencias significativas entre ellas, las plántulas obtenidas en el medio MS 100% fueron más vigorosas, lo que se reflejó en su peso fresco (Fig. 2), ya que fue el doble del obtenido en el MS 50%. El medio MS, rico en sales minerales, favoreció el desarrollo de las plántulas de esta orquídea, incluso cuando se utilizó a la mitad de su concentración; a diferencia del medio KC, formulado especialmente para la germinación de orquídeas (Arditti & Ernst 1993). El desarrollo de plántulas vigorosas de *L. anceps* subsp. *anceps* durante su germinación en MS, aunque lento, coincide con lo reportado por Stenberg y Kane (1998) para *E. boothiana*.

DESARROLLO DE PLÁNTULAS CON SUSTITUTOS DE SALES BASALES. Los medios de cultivo con fertilizantes que indujeron la mayor altura en las plantas, después de 100 días en cultivo, fueron P y Fl al 25% (Fig. 3), sin existir diferencias significativas entre ellos; mientras

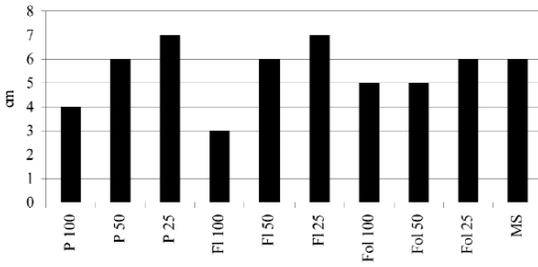


FIGURA 3. Longitud promedio de las plantas a los 100 días de cultivo en medio con sales basales o fertilizantes.

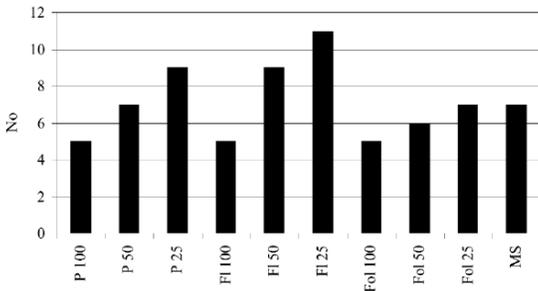


FIGURA 4. Raíces promedio por planta a los 100 días en medio con sales basales o fertilizantes.

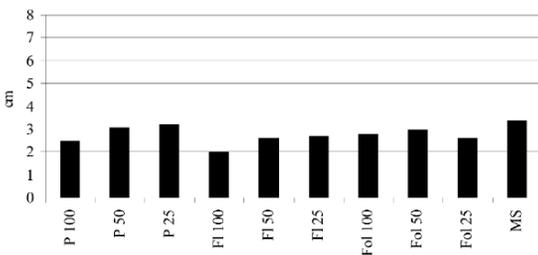


FIGURA 5. Longitud promedio de raíces a los 100 días en medio con sales basales o fertilizantes.

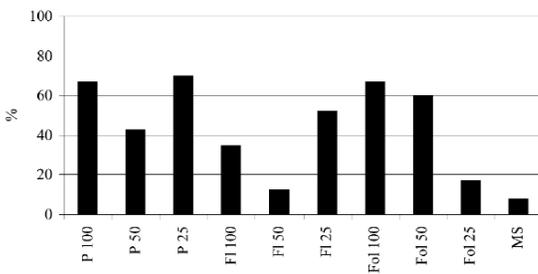


FIGURA 6. Plantas con pseudobulbos en medio con sales basales o fertilizantes a los 100 días de cultivo.

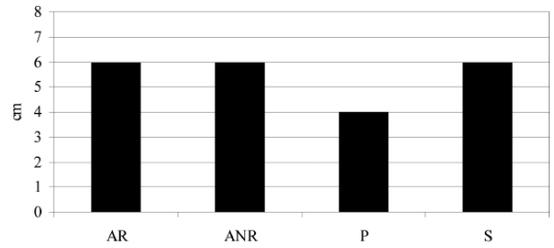


FIGURA 7. Longitud promedio de plantas en medio MS con sacarosa o sustitutos de carbohidratos a los 100 días de cultivo.

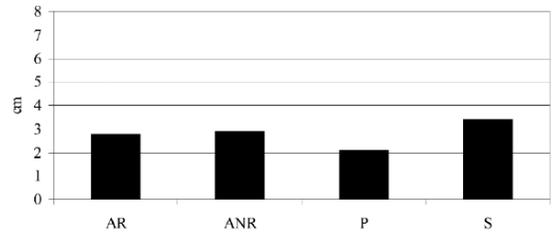


FIGURA 8. Longitud promedio de raíces en medio MS con sacarosa o sustitutos de carbohidratos a los 100 días de cultivo.

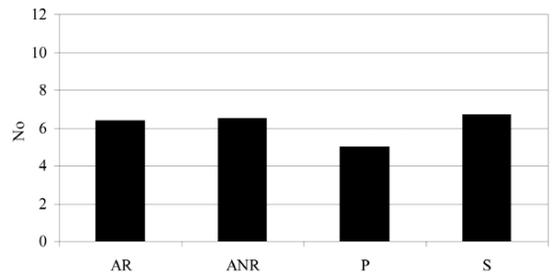


FIGURA 9. Raíces promedio por planta en medio MS con sacarosa o sustitutos de carbohidratos a los 100 días de cultivo.

que con FI al 25% se generaron un mayor número promedio de raíces por planta (Fig. 4) y la longitud promedio de las raíces en todos los tratamientos osciló entre los 2 y 3.5 cm (Fig. 5). Una característica relevante del desarrollo de las plantas fue la diferenciación de los pseudobulbos, ésta varió significativamente entre los tratamientos, ya que al considerar el porcentaje de plantas que generaron pseudobulbos se obtuvo que 70% las desarrollaron con P al 25% de su concentración, disminuyendo un 3% de las plantas en P y Fol al 100%, 10% en Fol al 50% y 18% en FI al 25%; lo que significa que en los tratamientos restantes se desarrollaron estas estructuras en menos del 50% de las plantas, resultando el menor porcentaje en

el medio MS (Figura 6). El fertilizante Peters es el único que contiene urea en su fórmula y posiblemente este elemento incrementó el contenido de nitrógeno total mejorando el desarrollo de las plantas.

DESARROLLO DE PLÁNTULAS CON SUSTITUTOS DE CARBOHIDRATOS. El medio de cultivo adicionado con P, como carbohidrato, resultó estadísticamente diferente ya que las plantas después de 100 días de cultivo se desarrollaron con una menor talla (Figura 7). En el medio con S las plantas desarrollaron raíces con mayor longitud (Figura 8), aun cuando no existieron diferencias significativas con los medios con AR y ANR; mientras que para la generación de raíces por planta (Figura 9) no existieron diferencias significativas, presentando un promedio de 5 a 7 por planta. El desarrollo de pseudobulbos fue despreciable estadísticamente, pues solo se desarrollaron en dos plantas de un total de 25, en el medio con S.

Conclusiones

El medio MS al 100 % favorece el desarrollo de plántulas vigorosas, con dos ó más raíces y mayor biomasa para la germinación. El uso de fertilizantes comerciales como sustitutos de las sales inorgánicas en el medio de cultivo favorece el desarrollo de plantas de *L. anceps* subsp. *anceps*. El fertilizante Peters al 25% promueve la generación de pseudobulbos y plantas con mayor tamaño. El uso de azúcar refinada o no refinada, como sustitutos de carbohidratos en el medio de cultivo, o de sacarosa grado analítico induce los mismos efectos en el desarrollo de las plantas. El uso del fertilizante Peters al 25% y azúcar no refinada como sustitutos de componentes del medio de cultivo favorecen el desarrollo vigoroso de plantas de *L. anceps* subsp. *anceps* en un periodo de 100 días. Estos sustitutos de medio de cultivo son económicos y de fácil adquisición.

LITERATURA CITADA

- Arditti, J.M & R.E.Arditti. 1986. Some structural and physiological features which facilitate the survival orchids. *In: Proceedings of the 11th World Orchid Conference: 102-105.*
- Arditti J. & R.Ernst. 1993. Micropropagation of Orchids. Wiley Interscience. USA. 682 pp
- Benzing, D. 1981. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycomorphic? *Selbyana* 5(3-4):241-242
- Dressler, R. 1981. The Orchids: Natural History and classification. Smithsonian Institution. USA. 332 pp.
- Halbinger, F. & M.Soto 1997. Laelias of Mexico. Orquídea (Méx.) Vol. 15 México. 160 pp.
- Hicks, A. 2005. Propagation of orchids from seeds. *Orchid Rev.* 113(1264):200-203
- Madison, M. 1977. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. *Selbyana* 2(1): 1-13
- Moraes, L.M., R.T.Faria & F.L.Cuquel. 2005. Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian Orchids. *ISHS Acta Horticulturae* 683: V International Symposium on New Floricultural Crops.
- Pateli, P.2003. Influence of *in vitro* culture medium on *Epidendrum radicans* seed germination, seedlings growth and *ex vitro* establishment. *ISHS Acta Horticulturae* 616: I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants.
- Santos, L., M.Martínez, J.Campos & E.Aguirre. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *Hortscience* 40(2):439-442
- Sigma. 2006. Bioquímicos, reactivos y kits para investigación en ciencias de la vida. Catálogo 2006-2007. Sigma-Aldrich Co. USA
- Stancato, G., E. Pereira & P.Mazzafera. 1998. Development and Germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae). *Lindleyana* 13(2): 97-100.
- Stenberg, M. & M.Kane. 1998. In vitro Germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida Orchid. *Lindleyana* 13(2): 101-112.

Rodrigo Romero Tirado nació en la ciudad de Tapachula en el estado de Chiapas, México. Es pasante de la carrera de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se interesa por la conservación y el manejo sustentable de orquídeas mexicanas, principalmente del estado de Chiapas. Realiza su tesis de licenciatura en la Unidad de Investigación en Biología Vegetal en la Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza.7