

MICROPROPAGACIÓN DE *Encyclia phoenicea* (Lindl.) Neum, ORQUÍDEA EPÍFITA ENDEMICA DE CUBA.

Loexis Rodríguez¹, María C. González² y Roberto González¹.

1. Centro de Desarrollo de la Montaña, Limonar, El Salvador, Guantánamo.
2. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, (INCA), San José de las Lajas, La Habana.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas cubanas poseen alrededor de un 32 % de endemismo (1), el más alto de la familia dentro de las antillas mayores (2). Sobresalen además por sus características como ornato, por lo cual están sujetas a la recolección inmoderada por los altos precios que alcanzan aún siendo silvestres.

El cultivo de tejido es usado para la propagación rápida de orquídeas (3, 4). Sin embargo, los procesos de micropropagación de la familia continúan demandando de mayor eficiencia, fundamentalmente en la disminución del período de germinación de semillas y de acelerar el crecimiento de las vitroplantas.

Dentro de las orquídeas cubanas *Encyclia phoenicea* (Lindley) Neum, conocida como orquídea de chocolate, es una especie silvestre que ocupa un lugar preferencial dentro de la orquideoflora cubana. Esta especie hace honor a su nombre (*phoenicea* proviene de *phoenix* que significa prodigio), no solo por la belleza de sus flores sino también porque estas tienen una fuerte y agradable fragancia a vainilla o a chocolate según el clon. Es una especie muy buena para la hibridación, ya que aumenta la resistencia al calor, a la falta de humedad en las flores, aporta buena fragancia, intensifica el color en los pétalos y sépalos y contribuye a formar labelos bien amplio (5).

Para *E. phoenicea* no existe un procedimiento que garantice su micropropagación a gran escala para satisfacer las demandas existentes relacionadas con la comercialización y la conservación. Sin esa posibilidad las poblaciones naturales de la especie corren el riesgo de ser dañadas de modo drástico. Sin embargo, existe un creciente interés en insertar programas de conservación de orquídeas epifitas silvestres (6), para lo cual contar con procesos eficientes de micropropagación constituye un paso importante (7).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto se concibió esta investigación con el objetivo de evaluar la influencia de diferentes factores en lograr y acelerar los principales procesos que determinan la micropropagación de *Encyclia phoenicea* y a partir de ello disponer del procedimiento para aumentar el número y la disponibilidad de plantas por su importancia dentro de la flora orquideológica de Cuba y que demandan la atención por todo lo que desde el punto de vista ecológico, económico y social representa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la investigación se utilizaron como material vegetal de partida para el cultivo *in Vitro* semillas de *Encyclia phoenicea* (Lindl.) Neum provenientes de plantas seleccionadas en condiciones silvestres.

Procedimientos generales

Para evaluar la germinación se utilizaron semillas procedentes de cápsulas verdes (entre 60 y 80 días después de la polinización) y de cápsulas maduras (dehiscentes).

Desinfección

Las cápsulas verdes se sumergieron cinco minutos en solución de Hipoclorito de sodio al 1 % de cloro activo y posteriormente en la cabina de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Antes de ser seccionadas las cápsulas fueron pasadas por alcohol al 70 % y flameadas. Las semillas procedentes de cápsulas maduras se sumergieron en solución de Hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 10 minutos en agitación constante. En condiciones de cabina de flujo laminar se filtraron.

Las semillas se distribuyeron de forma homogénea en los medios de cultivo, empleando 10 recipientes para cada tratamiento en diseños completamente aleatorizado.

La incubación de las semillas se realizó en la oscuridad durante siete días y luego a 16 horas luz de fotoperíodo a intensidad de $27 \text{ uMol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Para los medios de cultivo líquidos se utilizó una zaranda orbital a 100 rpm (revoluciones por minutos). En los experimentos que no se cumplen algunas de estas condiciones se especifica. Las variables evaluadas y los procedimientos estadísticos empleados se citan en cada caso.

Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica in vitro de las semillas.

Para la realización de este estudio se utilizaron semillas procedentes de cápsulas verdes y de cápsulas maduras. Los medios de cultivos se emplearon en estados semisólido y líquido y estuvieron compuestos por los siguientes requerimientos: A- sales totales Knudson C (K), B- sales macroelementos K y microelementos MS al 50 %, C- sales totales MS al 50 %. Todos los medios fueron suplementados con 10 % de agua de coco, 2 % de sacarosa y para los medios semisólidos 0.15 % de carbón activado. Se evaluó la germinación y su resultado fue expresado en días.

Comparación de dos métodos de cultivo en la multiplicación de protocormos.

Se utilizaron protocormos procedentes de semillas germinadas y las sales del medio de cultivo MS en estado líquido y semisólido con los suplementos 3 % de sacarosa, 15 % de agua de coco, $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ de tiamina. Para el estado semisólido se empleó 0.15 % de carbón activado. En los dos métodos de cultivo se inició con 50 protocormos los cuales se contabilizaron a los 10, 20 y 30 días posterior a la incubación que fue realizada en zaranda orbital (100 rpm) para el método de cultivo en estado líquido y 16 horas luz de fotoperíodo a intensidad de $27 \text{ uMol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para los dos métodos de cultivo.

Influencia de la sacarosa en el crecimiento de las vitroplantas.

En medio de cultivo semisólido que contenía las sales MS suplementado con 15 % de agua de coco, $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ de tiamina y 0.15 % de carbón activado se evaluó la influencia de la sacarosa (0, 10, 20 y 40 %) en el crecimiento de las vitroplantas, las cuales tenían una altura inicial que oscilaba entre 1 – 1.5 cm y fueron mantenidas en cultivo durante 60 días bajo las mismas condiciones de fotoperíodo expuestas en el experimento anterior. Los tubos de ensayos de 1.5 x 20 cm con 10 ml del medio de cultivo los cuales contenían una vitroplanta cada uno y en números de 15 por tratamiento se distribuyeron bajo un diseño completamente aleatorizado. Al concluir el período de incubación de las vitroplantas, se determinó la altura (cm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica in vitro de las semillas.

Las respuestas de la especie a los diferentes tratamientos mostraron de manera general amplia diversidad en los periodos que se requieren para la germinación, influenciada por los factores involucrados en la investigación (Tabla I).

Tabla I. Germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas bajo la influencia de los factores analizados*.

Estado de agregación del medio de cultivo	Cápsulas verdes			Cápsulas maduras		
	Sales del medio de cultivo			Sales del medio de cultivo		
	A	B	C	A	B	C
Semisólido	105	96	78	26	26	22
Líquido	66	61	53	24	20	14

* Los valores se expresan en días.

Leyenda

A: Knudson C (1946); B: Micro Knudson C (1946) y Macro ½ MS; C: ½ MS

El análisis estadístico realizado a los datos demostró que los niveles de los factores evaluados tuvieron diferencias altamente significativas en el periodo para la germinación de las semillas (Tabla II).

Tabla II. Comparación entre los niveles de los factores evaluados en la germinación.

Comparación	Contraste (días)	Significación
Medio semisólido vs Medio líquido	58.9 vs 39.7	**
Cápsulas verdes vs Cápsulas maduras	76.4 vs 22.2	**
A vs B,C	55.4 vs 46.3	**
B vs C	50.9 vs 41.7	**

Error Estándar ±	0.14	

** Significativo para $P \leq 0.01$ según Contrastes definidos a Priori.

Se puso de manifiesto el efecto positivo del medio líquido en la germinación. La aceleración del proceso se logra porque intervienen factores físicos y químicos que propician condiciones favorables para la respiración, síntesis de proteínas, toma de nutrientes y facilita la dilución de algunos inhibidores específicos o movimientos de productos creados en los procesos metabólicos (8, 9).

La respuesta a la germinación teniendo en cuenta la madures de las cápsulas puede ser diferente según las especies con que se trabaje. Se debe garantizar que el embrión haya alcanzado un grado de diferenciación tal que le permita germinar, por lo que el estado de madures de las semillas en el momento de cosechar la cápsula es fundamental (7). Otras investigaciones en la que también se ha evaluado la germinación *in vitro* de semillas a partir de diferentes estados de madures de las cápsulas han demostrado que se acelera el proceso de germinación de las semillas con el empleo de las cápsulas de mayor edad (10).

La habilidad para sintetizar la nitrato reductasa en *Cattleya* fue observada solamente en estados de desarrollo tardíos. La constitución hereditaria tan disímil en cada una de las especies de orquídeas propicia diferencias en el metabolismo del nitrógeno especialmente en el de los aminoácidos que durante el proceso de germinación puede ser determinante para las diferentes respuestas de las semillas de orquídeas en el medio. La aceleración en la germinación depende en buena medida de las preferencias por las fuentes apropiadas de nitrógeno, afinidad que varía en especies de un mismo género (11).

El medio MS ha sido muy efectivo como sustrato nutritivo para muchas especies de orquídeas (12, 13). El mismo presenta altos niveles de nitrógeno y potasio, en concentraciones superiores a los restantes medios utilizados además de ser el único de ellos en aportar nitrógeno en forma de nitrato de amonio. El nitrato de amonio es la mejor fuente de nitrógeno para garantizar el crecimiento y desarrollo de un gran número de especies de orquídeas (14).

La disminución del periodo para la micropropagación de las orquídeas constituye uno de los principales problemas del cultivo de esta familia de plantas, es por ello que resulta importante haber alcanzado valores importantes de reducción del periodo de germinación de las semillas (Figura 1).

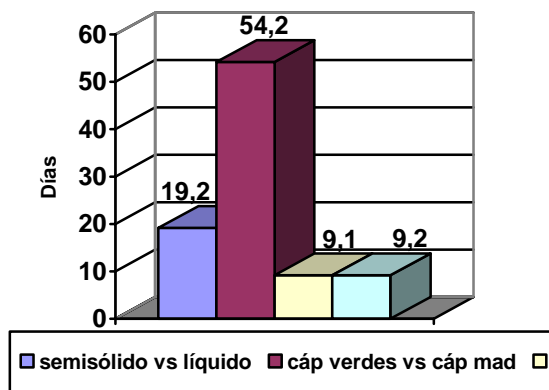


Figura 1. Cantidad de días en que se reduce el período para la germinación de las semillas de *Encyclia phoenicea*. Los valores son el resultado de las diferencias entre los niveles de los factores.

Diferentes respuestas en cuanto a la germinación han tenido lugar en experimentos realizados con otras especies de orquídeas. *Laelia speciosa* (7) y *Epidendrum ibaguense* (15) lograron buena germinación de semillas en medio $\frac{1}{2}$ MS y MS respectivamente, en tanto *Habenaria macroceratitis* no germinó en MS (16), por lo que en estos casos el genotipo ejerce gran influencia, lo que obliga a un estudio detallado para cada una de ellas (17, 18).

Comparación de dos métodos de cultivo en la multiplicación de protocormos.

Los resultados alcanzados en el proceso de multiplicación de los protocormos (Tabla III) reafirman todas las bondades referidas en experimentos anteriores sobre el empleo del medio líquido en la germinación de las semillas.

Tabla III. Resultados del proceso de multiplicación *in vitro* de protocormos.

Días	<u>Medias del número de protocormos</u> ^x	
	Cultivo Líquido	Cultivo Semisólido
0	50 (1.0)	50 (1.0)
10	117 (2.30±1.69; 4.57)	96 (1.92 ± 0.81) **
20	297 (5.94±0.56; 0.60)	216 (4.34 ± 0.82) **
30	511 (10.22±0.84; 0.51)	341 (6.82 ± 0.81) **

** Las medias en una misma fila poseen diferencias significativas para $P \leq 0.01$ según contraste t de comparación de medias.

^x Los números dentro del paréntesis representan el coeficiente de multiplicación \pm Error Estandar. El coeficiente de multiplicación es resultado de la división del número total de protocormos entre el valor inicial de 50.

En todos los periodos evaluados el cultivo líquido superó estadísticamente al cultivo sólido. A pesar de las diferencias encontradas, los valores de multiplicación de los protocormos en los dos métodos de cultivo fueron elevados, lo que puede considerarse como una respuesta genética de la especie al proceso. No obstante es importante resaltar que se multiplicó 10 veces el número de protocormos a los 30 días de cultivo en medio líquido. En la Figura 2 se ilustran los protocormos en fase de multiplicación en ambos medios de cultivos.



(Foto, L. Rodríguez)

Figura 2. Multiplicación de protocormos. Izquierda: medio líquido. Derecha: medio semisólido

Es importante el hecho de que el proceso ocurre sin la adición al medio de cultivo de reguladores del crecimiento lo que unido a los altos índices de multiplicación alcanzados permite disminuir los costos de micropropagación de la especie.

La efectividad del uso del medio de cultivo líquido en la proliferación y desarrollo de otras especies de orquídeas, es atribuida fundamentalmente al incremento del área de superficie, lo que permite mayor toma de nutriente y por tanto mejor crecimiento. Además de que, debido a la agitación constante a que es sometido el cultivo, aumenta la aireación del medio y favorece las condiciones para la respiración y síntesis de proteínas (19).

Influencia de la sacarosa en el crecimiento de las vitroplantas.

Con el incremento de las dosis de sacarosa aumentó también la altura de las vitroplantas con diferencias altamente significativas entre las dosis empleadas (Tabla IV).

Tabla IV. Altura de las vitroplantas después de 60 días de cultivo en medios con diferentes dosis de sacarosa.

	Dosis Sacarosa (g.litro ⁻¹)			
	0	10	20	40
Altura (cm)^a	0.67d	2.39c	3.03b	3.33a
Error Estandar	0.005	0.007	0.005	0.007

^aMedias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $P \leq 0.01$.

Es posible que la dosis de 40 g.litro⁻¹ no sea el límite para estimular el mayor crecimiento posible de las plantas, hecho que requiere ser demostrado por un experimento donde se evalúen dosis alrededor de este valor. No obstante con 40 g.l⁻¹ se alcanza el máximo valor de las medias de altura para el periodo evaluado (60 días), lo que puede considerarse bueno si se tiene en cuenta que las especies silvestres de orquídeas crecen de modo lento y en ocasiones necesitan más de un año en condiciones *in vitro* para alcanzar entre 3 – 5 cm de altura, a partir de la cual se puede evaluar la transferencia a las condiciones *ex vitro* de las plántulas.

El uso más común de la sacarosa en el cultivo *in vitro* de orquídeas es en dosis de 2 % (10,11), sin embargo, las dosis óptimas de sacarosa para el crecimiento de *Brassolaeliocattleya* y *Dendrobium* fueron diferentes al favorecer la altura de las plantas con 2 % y 4 % respectivamente, y en ambos casos se favoreció el enraizamiento al elevar los niveles de sacarosa (8). Sin embargo, *Oncidium stramineum* respondió al cultivo *in vitro* con 3 % (19). Lo que pone de manifiesto que la variabilidad genética determina en alguna medida la respuesta sobre las variables en estudio.

Las fases iniciales en las cuales se involucra del crecimiento de vitroplantas de *Encyclia phoenicea* se muestra en la Figura 3.



(Foto, L. Rodríguez)

Figura 3: Proceso de micropropagación de orquídeas. De izquierda a derecha: formación de protocormo a partir de la semilla, formación de protocormos secundarios, diferenciación del protocormo y crecimiento de la vitroplanta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Díaz, M. A. Las orquídeas nativas de Cuba. La Habana: Científico Técnica, 1988. 63 p.
2. Llamacho, J. A. y Larramendi, J. A. Las orquídeas de Cuba. Greta Editores, 2005, España.
3. Arditti, J. y Ernst, R. Micropropagation of Orchids. John Wiley-Sons, INC. New York, 1993.
4. Hilda, E.; Murguía, J.; García, B.; Córdova, A.; Laguna, A.; Mijangos, J.; Barahona, L.; Iglesias, L.; y Santana, N. In Vitro Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *HortScience*, April 2008, 43: 454 - 458.
5. George, E. F. Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd. Edington, Wilts. England. Second Edition, 1996, pp. 575.
6. Avila, D. y Oyama, K. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 2007, 94(2): 184-193.
7. Avila, D.; Oyama, K. y Salgado, R. In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2009, 99:335-343.
8. Kano, K. Memoirs of faculty of Agriculture Kagawa University. Studies on the medio for Orchid Seed Germination. Mikityo, Kagawa, Japan. 1965.
9. Santos, L.; Martínez, M.; Campos, J. y Aguirre, E. In vitro Propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for Conservation and Ornamental Purposes in Mexico. *HortScience*, 2005, 40: 277-500.
10. Raghavan, V. y Torrey, J. G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. *Amer. Jour. Bot*, 1964, 51: 264-274.
11. Chettri, M.; Kumaria, S. y Tandon, P. Protocorm Regeneration, Multiple Shoot Induction and *ex vitro* Establishment of *Cymbidium devonianum* Paxt. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2007, 6 (2): 349-353.
12. Mitra, G. C. Some aspects of asymbiotic nutrition of orchid embryos. *J. Orch. Soc. Ind.*, 1987, 1: 91-108
13. Jain, R.; Shashi, B. Xanthan gum: an economical substitute of agar for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. *CURRENT SCIENCE*, 2006, VOL. 91, NO. 1, 10 JULY.
14. Arditti, J. Aspects of the physiology of orchids. In: Woohouse (ed.). *Advances in Botanical Research*, 1979, Vol. 7, pp. 422 - 638 Academic Press, New York.
15. Hossain, M. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. *African Journal of Biotechnology*, 2008, Vol 7 (20) pp 3616 - 3619
16. Stewart, S. y Kane, M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2006, 86:147-158
17. Mckendrick, S. Manual para la Germinación *in vitro* de Orquídeas. Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito, 2000.
18. Rodríguez, L.; González, R.; Alvarado K. y Telles E. Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres. *Biotecnología Vegetal*, 2007, Vol. 7, No. 3: 139 - 142.
19. Flores, G.; Legania, J.; Gil, I. y Colinas, M. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 2008, 14(3): 347 - 353.