

ARTÍCULOS ORIGINALES

Biotecnología

» MICROPROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO *CATLEYA* MICROPROPAGATION OF ORCHIDS OF THE GENUS *CATLEYA*

María de Lourdes Tapia y Figueroa¹, Andrea Carrión Elguera¹, Faustino Félix Beraún Barrantes², Rossana Falcon Ramos¹

RESUMEN

La micropropagación in vitro ha jugado un rol importante para lograr este avance, los primeros estudios fueron realizados por Knudson en 1922 y Morel en el año 1856. La micropropagación de híbridos de *Catleya* fue realizada a partir de una cápsula cerrada madura, la cual se desinfectó con hipoclorito de sodio al 1%, 3 enjuagues con agua estéril, inmersión en alcohol durante un segundo y flameado con el mechero, después de 30 días se formaron los protocormos. Se han transferido 3 veces sobre medio MS en intervalos de 30 días. Cuando las plántulas alcanzaron un tamaño de 3 a 5 cm fueron aclimatadas utilizando un sustrato de musgo blanco en un invernadero.

PALABRAS CLAVE: Orquídeas, protocolo, medio de cultivo, micropropagación, cápsula

ABSTRACT

Micropropagation in vitro has played an important role to achieve this breakthrough, the first studies were conducted by Knudson in 1922 and Morel in the year 1856. Made Micropropagation was 3 rinses with sterile water, immersion in alcohol for one second from mature closed capsule, which I desinfecto with sodium hypochlorite at 1%, and flamed with the lighter, after 30 days are they formed protocormos. Transferred 3 times on MS medium, when the seedlings reach a size of 3-5 cm were acclimated to using a substrate of White Moss in a greenhouse.

KEYWORDS: Orchids, protocol, culture medium, micro propagation, capsules.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas pertenecen a la familia más numerosa del mundo vegetal. Están distribuidas en todo el mundo, siendo el Perú, Colombia y Ecuador los que poseen el mayor número de especies. En el Perú se tiene aproximadamente 2,800 mil especies y 212 géneros (Goicochea et al, 2016).

La producción de orquídeas se extiende a lo largo de nuestro territorio, desde la Selva Alta, hasta la Sierra e inclusive la Costa. El mejor lugar para la producción de orquídeas es la Selva Alta pero lo que hace falta es la instalación de viveros para la propagación de especies nativas en peligro de extinción.

Hasta el año 1,989 se exportaban únicamente plantas de orquídeas del bosque, lo que originó la pérdida de especies. Existe aún el peligro de extracción, pero actualmente ya hay viveros y laboratorios de cultivo de tejidos donde se puede micropropagar y así evitar la pérdida de especies nativas.

La conservación de especies es muy importante, debido a que puede faltar diversidad genética para reproducirse o sobrevivir, existiendo de esta manera pérdida potencial de poblaciones o especies. Knudson (1922), citado por Chávez et al 2015, demostró que las semillas de orquídeas eran capaces de germinar asimbióticamente in vitro.

En 1793, el alemán C. K. Sprengel (1774-1780) observó la polinización de orquídeas terrestres por insectos, fenómeno que le llevó a publicar el libro "Das entdeckte Geheimnis der Natur" (El secreto de la naturaleza descubierto). Otro meticuloso observador de este proceso fue el escocés Robert Brown (1773-1858). Brown formó parte de una expedición de investigación de la flora de Australia y cuando regresó después de varios años, llevaba consigo un considerable número de orquídeas. Se dedicó al estudio de las diferentes teorías sobre la fertilización y examinó a fondo las estructuras de los tejidos celulares de las plantas con la ayuda del microscopio. En su tratado "En te Órganos and Mode of Fecundatión in Orchideae and Asclepiadeae" (Sobre los órganos y la manera de fecundación de las orchideae y asclepiadeae) manifiesta que todas las células contienen núcleos, un descubrimiento que despertó el interés de muchos botánicos en la citología, las estructuras celulares y la genética (6). Charles Darwin (1809-1882), un amante de las orquídeas, reveló el secreto de la polinización de la orquídea *Angraecum sesquipedales* del Madagascar, cuya flor tiene el néctar situado en el fondo de un espolón alargado de hasta 30 centímetros.

En consecuencia, la semilla de orquídea germina de igual manera sin presencia del hongo, si se le proporcionaban suficientes azúcares y nutrientes. En 1922, Knudson elaboró un medio de cultivo a base de sales minerales esenciales para la germinación,

¹ Instituto de Biotecnología UNALM, ² Universidad Nacional del Callao

azúcares en forma de glucosa y levulosa (que componen la mayor parte de la solución) y agar, una gelatina extraída de algas marinas. Este método de germinación asimbiótico (sin presencia de hongo) hace necesario un riguroso proceso de esterilización de las semillas, de los contenedores y del medio de cultivo. El método asimbiótico también ha sido provechoso para la conservación de las orquídeas botánicas que, sea por su atractivo estético o por la reducción de sus hábitats, se encuentran en un estado crítico en la naturaleza. Actualmente existen muchas variaciones de la fórmula Knudson e incluso un aficionado puede emplearlos con éxito, siempre y cuando sea capaz de llevar a cabo la siembra de manera absolutamente estéril.

En 1956, el francés Georges M. Morel interesado en el estudio de la transmisión de un virus en *Cymbidium*, descubrió una manera de obtener plantas de orquídeas a partir del meristemo apical. Por este método se garantizan descendientes de calidad, libres de virus e idénticos a la planta madre en infinitas copias (clones), aumentando el beneficio en la comercialización de un híbrido élite, citado por Ávila et al. (2006). Las semillas de las orquídeas son pequeñísimas, encontrándose millones de semillas en sus cápsulas, siendo extremadamente especializadas porque han evolucionado para ser fecundadas por insectos específicos y necesitan de un hongo llamado micorriza para su germinación simbiótica (Chávez et al. 2014). La investigación desarrollada por Knudson (1922) demostró que dichas semillas eran capaces de germinar asimbióticamente in vitro, incrementando enormemente las posibilidades de aumentar la población. El cultivo de tejidos vegetales permite la conservación de material vegetal en condiciones in vitro como una alternativa útil de conservación ex situ (2).

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado consistió en cápsulas provenientes de híbridos de especies del género *Cattleya*. El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

a) Fase I: Desinfección y establecimiento

El medio de cultivo de Murashigue & Skoog (MS 1962), adicionando compuestos orgánicos (Tiamina 0,4 mg/l y Ácido nicotínico 0,5 mg/l) y utilizando como solidificante el agar a 6 g/l. El medio cultivo se esterilizó en la autoclave a 121°C de temperatura y 15 psi. (1,1 kg/cm²) de presión durante 20 minutos.

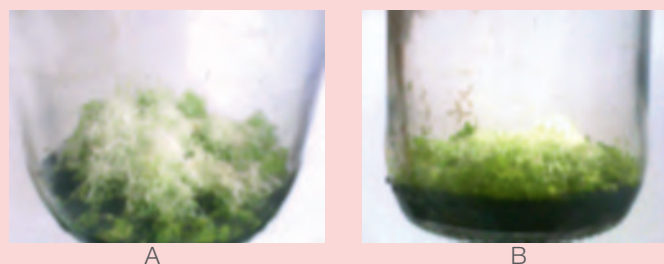
Desinfección de semillas provenientes de cápsulas verdes.

Con la ayuda del bisturí, se remueve cuidadosamente la flor muerta de la cápsula; se lava con detergente, luego se

colocan las cápsulas por 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (enjuagándose con agua destilada por lo menos tres veces). Luego se llevan las cápsulas a la cámara de flujo laminar, se sumergen en alcohol al 96% y se pasa rápidamente por el fuego. La cápsula desinfectada se transfiere a una caja Petri, cortando longitudinalmente. Las semillas se esparcen sobre el medio de cultivo preparado para esta fase y contenido en frascos de vidrio. Por último, los frascos son sellados y llevados a incubación a 26°C de temperatura con un fotoperíodo 16 horas de luz y 8 de oscuridad hasta la formación de los protocormos.

Fase II y III. Siembra y multiplicación del ex plante.

En esta fase se evalúan los frascos sembrados y que contienen los protocormos. Luego se descartan los frascos contaminados, mientras que los frascos que se encuentran en buen estado siguen en el área de incubación con temperatura de 26°C y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.



A y B: Semillas después de un mes y medio de la siembra.

Durante la fase de multiplicación se han transferido 3 veces hasta que la planta tiene un tamaño de 3 a 5 cm. Después pasa a la etapa de aclimatación.

Fase IV. Aclimatación de plántulas.

Para la fase de aclimatación se utilizó musgo blanco.

Las plantas con tamaño de 3 a 5 cm, se extraen para la aclimatación. Se retiró el agar de las raíces con agua y se procedió al trasplante en el musgo blanco. Las plantas se evaluaron en el mismo ambiente de tres a cuatro meses. Finalmente, se aplicó fertilizante foliar, insecticidas y fungicidas para prevenir problemas nutricionales, fitosanitarios y de plagas.

Luego del tiempo transcurrido, las plántulas estuvieron aptas para ser trasladadas a envases más grandes, para su mayor desarrollo radicular y foliar en invernadero. Siendo *Dicksonia sellowiana* (helecho arbóreo) el componente del sustrato más recomendado, resaltando que es lo suficientemente poroso, ideal para que sus raíces estén en contacto con el aire ya que los extremos terminales presentan una coloración verde (velamen) y puedan realizar fotosíntesis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados obtenidos en el establecimiento y multiplicación in vitro de orquídeas del género *Cattleya* a partir de semillas.

Los protocormos que se desarrollan después de la germinación de las semillas de orquídea, adquieren un estado morfológico entre un embrión indiferenciado y un vástago.

a) Fase II: Germinación de semillas

Durante el desarrollo de la germinación in vitro, se ha evaluado la contaminación, el número de semanas con la presencia de protocolos, y el número de semanas con la presencia de plántulas.

- **Número de semanas en formar protocormos.** Durante las primeras semanas no se observaron cambios en las semillas, hasta que empezaron a hincharse adquiriendo un color amarillo intenso, que cambió de verde claro a verde oscuro, formándose los protocormos. El número de semanas que tardaron en llegar a protocormo, fue en promedio de ocho (8) semanas en medios completos MS; observándose que estas especies requieren concentraciones de sales completas para su mejor desarrollo.
- **Número de semanas en formar plántulas.** Luego de formarse el protocormo, se diferencian los órganos (el meristemo del vástago en un lado y en el lado opuesto los rizoides), comenzando un periodo de crecimiento intenso por varias semanas o meses, dependiendo de la especie, hasta producir raíces y hojas.



b) Fase III: Trasplante de plántulas

Las plántulas formadas, luego de estar en una densidad muy alta, son transferidas a un medio fresco, en un número menor por cada frasco (30 plántulas) finalmente se transfirieron 7 plantas en cada frasco.

c) Fase IV: Aclimatación de plántulas

En esta fase de aclimatación se utilizó musgo blanco en bandejas. Las plántulas de 3 a 5 cm y las raíces que mostraban un buen desarrollo fueron sembradas en bandejas y a su vez colocadas dentro de un túnel.

Las plantas fueron evaluadas en el mismo ambiente de tres a cuatro meses. Se adicionó fertilizante foliar, insecticidas y fungicidas para prevenir problemas nutricionales, fitosanitarios y de plagas.

Luego del tiempo de aclimatación las plántulas están aptas para ser trasplantadas a envases más grandes, para su mayor desarrollo radicular y foliar en invernadero.

Las especies del género *Cattleya* fueron *Cattleya aurentiaca* y *Cattleya máxima*. *Cattleya aurentiaca*, es la única “*Cattleya*” con flores en el espectro cromático amarillo-naranja-rojo, así como también por su rusticidad, lo que la ha hecho una de las especies de “*Cattleya*” de fácil cultivo, ideales tanto para orquideólogos con experiencia como para los que se inician. Actualmente, con la reubicación dentro del género *Guarianthe*, la especie sigue compartiendo parentesco muy cercano con las *Cattleyas*, debido a que sigue perteneciendo a la tribu *laeliinae*, una de las subdivisiones de la familia de las *Orchidaceae*.

CONCLUSIONES

La hibridación realizada con las especies *Cattleya aurentiaca* y *Cattleya máxima* fueron compatibles.

La micropropagación de orquídeas a partir de semillas provenientes de cápsulas maduras cerradas ha sido óptima, lográndose la aclimatación de plantas de orquídeas de las especies en estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Ávila I y Salgado –Garciglia R.(2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas para colaborar en su conservación. *Biológicas* N°8, pp.138-149.
2. Chavez H ,Mosquera-Espinoza A, Otero J. (2015). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata*. Poepp&Endl (Orchideacea) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Agronomía*. 64 (2) pp.125-133
3. Goicochea A, Gutiérrez A, Ocupa L y Ríos A. (2016). Orquídeas del bosque de las nubes. Moyobamba-Perú. pp.201
4. Mayo A, Cázares J, De la Cruz E, Flores A (2010). Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Agropecuarias. pp.9-21
4. Rittershaver B Y Rittershaver W.2014.Orquídeas-Enciclopedia práctica. San Rafael – Madrid. Libsac pp.256
5. Salazar V y Mata M.(2003).Micropropagación y conservación de orquídeas mexicanas en el jardín botánico Clavijero. Mexico. *Lankesteriana* 7:pp.151-153