



Propagación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula* la llave & lex. (*Orchidaceae*) como una alternativa para su conservación

Verónica Adriana Pérez-Decelis, Irene Ávila-Díaz

Facultad de Biología | UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Rafael Salgado-Garciglia

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas | UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

correo-e: iaviladiazs@gmail.com

Resumen

Se determinaron los medios de cultivo más eficientes para la germinación, desarrollo de protocormos, formación de plántulas y multiplicación de PLBs en *Cuitlauzina pendula*. Para el establecimiento del cultivo *in vitro* se probaron los medios: MS al 50% y 100%; MS con BA 0.05 mg/l⁻¹; Phytamax al 50% y 100% y fertilizante comercial N-P-K 17-17-17 al 50% y 100% de la concentración de sus sales basales. Los mayores valores de germinación se obtuvieron en los medios Phy 50% y Phy 100%, con un promedio de 31 y 32 protocormos fuera de la testa de doscientos observados. La transferencia se realizó en medio Phy al 50% con una combinación de ácido nftalenacético y benciladenina en concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l⁻¹ para ambos reguladores de crecimiento; siendo el T₁₈ (0.1/0.5 mg/l⁻¹ de ANA/BA) con respecto a los demás tratamientos, en el que se registró mayor crecimiento, desarrollo y producción de PLBs (6.94 PLBs). Los resultados de la investigación son útiles para implementar la propagación masiva de esta especie amenazada, como una alternativa para colaborar a su manejo sustentable.

Palabras clave: *Cuitlauzina pendula*, germinación *in vitro*, conservación *Orchidaceae*.

Introducción

La propagación de las orquídeas se dificulta porque sus semillas son diminutas, carecen de endospermo y requieren de hongos en condiciones naturales para su germinación a fin de abastecer azúcares y nutrientes (Arditti, 1992). El uso de medios de cultivo en la propagación *in vitro* es de particular importancia en estas plantas, ya que éstos suministran los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo (Lo *et al.*, 2004; Santos-Hernández *et al.*, 2005).

Una alternativa de propagación para especies endémicas o en alguna categoría de riesgo es la propagación *in vitro*, que contribuye indirectamente en la disminución de la presión que se ejerce sobre las poblaciones naturales (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 incluye a 181 especies de la familia *Orchidaceae* en alguna categoría de riesgo. *Cuillauzina pendula* es una de ellas y se encuentra catalogada como amenazada y endémica de México (SEMARNAT, 2010). Presenta la grave problemática de la destrucción de su hábitat y la extracción ilegal; eso ha ocasionando una severa reducción o extinción local de sus poblaciones silvestres, por lo que quedan muy pocas remanentes.

Existen pocos trabajos enfocados a la propagación y conservación de especies de orquídeas epifitas mexicanas. Los objetivos de este estudio fueron: 1. Establecer un medio de cultivo eficiente para la germinación *in vitro* de *C. pendula*. 2. Determinar los medios de cultivo óptimos para el desarrollo de plántulas y la proliferación de PLBs a fin de conseguir la propagación sexual a través de semillas; esto, con la posibilidad de mantener niveles de variación genética aceptables para un manejo *in situ* de *C. pendula* y la propagación vegetativa para coadyuvar en su preservación de manera indirecta, al abrir la posibilidad de la obtención a gran escala de plantas de calidad en invernaderos para disminuir la extracción de *C. pendula*.

Cabe mencionar que la investigación es parte de un proyecto más amplio (Pérez-Decelis *et al.*, en proceso) que incluye el estudio de algunos factores del sistema reproductivo de *C. pendula*, así como diversos aspectos de su ecología, con cuyos resultados se espera proponer alternativas de manejo integral de la especie.

Metodología

Germinación de las semillas

Dos cápsulas cerradas y maduras de *C. pendula* (desarrolladas en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán, México) fueron desinfectadas de acuerdo con Ávila-Díaz *et al.* (2009). Cada cápsula fue disectada en condiciones de asepsia en campana de flujo laminares. Se tomó alrededor de 5 mg de las semillas, se distribuyó uniformemente sobre la superficie de los siguientes medios de cultivo: MS1 (MS 50%), MS2 (MS 100%), MS3 (MS 50% con BA 0.05 mg l⁻¹) y MS4 (MS 100% con BA 0.05 mg l⁻¹) (MS es medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962); el medio de cultivo Phytamax (Phytamax Orchid Maintenance Medium SIGMA®): Phy1 (Phytamax 50%) y Phy2 (Phytamax 100%) y medios con fertilizante comercial triple 17: T1 (100%: 1000mg l⁻¹) y T2 (50%: 500 mg l⁻¹). Las condiciones de crecimiento *in vitro*, fueron a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz (2000 lux).

A los 60 y 90 días del cultivo se hicieron observaciones en un microscopio óptico (Carl Zeiss modelo Primo Star, 10X (60d) y 4X (90d), considerando los estadios de desarrollo que a continuación se enuncian: *a*) deformes (semillas con el embrión reducido a un 50% o menos dentro de la testa); *b*) protocormo 1 (aquellas semillas que tenían el embrión en forma globular completo o más del 50% dentro de la testa); *c*) protocormo 2 (aquellas semillas que tenían más del 50% o todo el embrión, fuera de la testa); *d*) plántula 1 (plántula con una o dos hojas) y *e*) plántula 2 (plántula con más de dos hojas).

Transferencia de protocormos *in vitro* con adición de reguladores de crecimiento

Para la transferencia de protocormos en estadio 2 de *C. pendula* se utilizó el medio Phy 1 (medio Phytamax con 50% de sus sales basales), suplementado con distintas concentraciones de una combinación de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) (0, 0.05, 0.1 y 0.5 mg l⁻¹ para ambos reguladores de crecimiento).

La evaluación del desarrollo de los protocormos transferidos se realizó a los 125 días; se determinó la longitud del vástago, el número de hojas, largo y ancho de las hojas, número y longitud de raíces y el vigor de las plántulas. Este último parámetro fue determinado en categorías (Pérez-Decelis *et al.*, en proceso). También se evaluó el número de PLBs.

Se efectuó un análisis ANOVA y una prueba de Tukey y Kramer con un 95% de confiabilidad cuando hubo diferencias significativas; para las variables categóricas cualitativas (vigor) se llevó a cabo una prueba de Chi-cuadrada con el programa JMP 8 (JMP8, 2009).

Resultados y discusión

Germinación de las semillas

A los 60 días ($F=104.78$, $gl=7$, $P<0.0004$) se obtuvo la germinación más alta con promedios de 31 y 32 «protocormos en estadio 2» en los medios Phytamax al 50% y 100% y a los 90 días ($F=3.23$, $gl=7$, $P<0.0446$); se registraron valores promedios de 48 y 20.25 de protocormos 2 para esos mismos medios. Hasta los 90 días sólo los medios Phy1 y Phy2 registraron desarrollo de plántulas de *C. pendula*. Los medios Phytamax (50% y 100%) fueron los mejores para la germinación *in vitro* de *C. pendula*, como en *Encyclia adenocaula* (Ruíz *et al.* 2008), con la que se logró el 69.46% de germinación en este medio.

Transferencia de protocormos *in vitro* con adición de reguladores de crecimiento

A los 125 días de la transferencia de protocormos en estadio 2, se registraron los valores más altos de las variables longitud de hojas, número y longitud de raíces en aquellas plántulas sometidas al tratamiento T20 (1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA); en los tratamientos T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA) y T19 (0.5/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA) se observaron las mayores longitudes del vástago. El valor más alto del ancho de las hojas fue mostrado por los tratamientos T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA) y T20 (1/0.5 mg l⁻¹).

En cuanto al número de hojas los tratamientos T5 (1/0 mg l⁻¹ de ANA/BA), T7 (0.05/0.05 mg l⁻¹), T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA), T19 (0.5/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA) y T20 (1/0.5 mg l⁻¹) presentaron los valores mayores. Como puede observarse, para *C. pendula* se exhibe en general una respuesta favorable a moderadas y altas concentraciones de ANA.

Otro estudio hecho en *C. pendula* reportó una alta formación de plántulas en el medio MS adicionado con BA (0.5 mg l⁻¹) o sin reguladores de crecimiento (Mata-Rosas y Salazar-Rojas 2009), similar a lo que ocurre en el T18 ANA/BA (0.1 mg l⁻¹/0.5 mg l⁻¹), T19 ANA/BA (0.5 mg l⁻¹/ 0.5 mg l⁻¹) y T20 ANA/BA (1 mg l⁻¹/ 0.5 mg l⁻¹) percibido en esta investigación. Se hallaron diferencias significativas ($X^2=256.05$, $gl=144$ $P<0.000$) con respecto a las categorías de vigor de las plántulas de *C. pendula*, a los 125 días de haberse efectuado la transferencia de protocormos en los distintos tratamientos (ANA/BA).

Los valores más altos de vigor se registraron en las plántulas de los tratamientos T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹) y T21 (0/1 mg l⁻¹) (Pérez *et al.*, en proceso). Dichos tratamientos fueron los más adecuados para el desarrollo de plántulas de *C. pendula*.

Multiplicación de PLBs

Después de 125 días de efectuada la transferencia de protocormos se observaron diferencias significativas

($F=2.3377$, $gl= 24$, $P<0.0005$). El mayor número de PLBs (en promedio 6.94 PLBs) se registró en el tratamiento T18 (0.1/0.5 mg l^{-1} de ANA/BA).

En otro estudio también se reportó la formación de PLBs en *C. pendula*, con BA a una concentración de 0.5 mg l^{-1} y sin reguladores de crecimiento (Mata-Rosas y Salazar-Rojas, 2009); en *Cattleya aurantiaca* con 0.1 mg l^{-1} de ANA y 10 mg l^{-1} de BA (Mauro *et al.*, 1995), en *Laelia speciosa* con 0.5 mg l^{-1} de ANA y 0.1 mg l^{-1} de GA_3 (Ávila-Díaz *et al.*, 2009) y con 2.5 mg l^{-1} de ANA y 1 mg l^{-1} de BA (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010). La obtención de PLBs es una forma de reproducción asexual para *C. pendula*, lo cual permitiría obtener una gran cantidad de plantas idénticas a ejemplares con características deseadas.

Los resultados de la investigación abren la posibilidad para la propagación masiva y para la obtención de plantas de calidad de *C. pendula* en invernaderos, para disminuir en cierto grado la extracción de individuos de sus poblaciones y colaborar a un manejo adecuado de esa especie amenazada.

Conclusiones

C. pendula presentó la mayor geminación en los medios de Phytamax al 100% y al 50% de la concentración de sus sales basales, a los 60 y 90 días de realizada la siembra. Los medios Phy 50% adicionados con 0.1 y 0.5 mg l^{-1} de ANA y BA (T18) y con 1 y 0.5 mg l^{-1} de ANA y BA (T20), respectivamente, fueron los más eficientes para el crecimiento y desarrollo de plántulas de *C. pendula*; se obtuvieron plántulas sanas, con pseudobulbo y raíz desarrollada en los tratamientos T18 y T21 (0/1 mg l^{-1}). El medio T18 fue también el mejor para producir la mayor cantidad de PLBs.

Agradecimientos

Al Conacyt por la beca otorgada dentro del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

(2011-2013) para la realización de esta investigación. Asimismo, a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, a través del Proyecto Biología de la Conservación de Orquídeas Michoacanas, a cargo de Irene Ávila D.

Referencias

- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of orchid biology. Department of Developmental and Cell Biology*. USA: John Wiley and Sons.
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C., Salgado-Garciglia, R. (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99:335-343.
- Baltazar, R. (2004). *Micropropagación de Oncidium tigrinum Llave & Lex (Orchidaceae) a partir de protocormos* (Tesis de Licenciatura). Universidad Veracruzana, Xalapa.
- Lo, S.F., Nalawade, S.M, Kuo C.L, Chen C.L., Tsay, H.S. (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino-a medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(5):528-535.
- Mata-Rosas, M., Salazar-Rojas, V.M. (2009). Propagation and Establishment of Three Endangered Mexican Orchids from Protocorms. *Hortscience*, 44(5):1395-1399.
- Mauro, M., Sabapathi, D., Smith, R.A. (1995). Influence of benzylaminopurine and alpha naphthalenacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. *Lindleyana*, 9(3):169-173.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Ruíz, B.C., Laguna, C.A., Iglesias, A.L., Damon, A., Marín, T.N., Azpíroz, R.H., Moreno, M.J. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 77:203-215.

- Santos-Hernández, L., Martínez-García, M., Campos, J.E., Aguirre, L.E. (2005). *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in México. *Hortscience*, 40(2):439-442.
- Sarabia-Ochoa, M.E., Ávila-Díaz, I., Carlos-Gómez, A., Salgado-Garciglia, R. (2010). Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 10(1):13-18.
- SAS Institute Inc. (2009). JMP (version 8) *Design of Experiments Guide*. Cary NC: Autor.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2010). NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010. Recuperado de <http://www.profepa.gob.mx/NR/rdonlyres/841442613-CF26-4223-BFE9-38BE4AEB0C96/1426/NOM-ECOL0592010.pdf>
- Soto-Arenas, M.A., Solano-Gómez, A.R. (2007). Ficha técnica de *Cuillauzina pendula*. En: Soto-Arenas, M.A. (comp.), *Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000*. México, D.F: Instituto Chinoín A.C./ Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C.