

University of Nebraska - Lincoln

DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln

Estudios científicos en el estado de Hidalgo y
zonas aledañas

Parasitology, Harold W. Manter Laboratory of

2013

Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*

María Ascención Aguilar-Morales
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Ana Laura López-Escamilla
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, lopeza@uaeh.edu.mx

Follow this and additional works at: <https://digitalcommons.unl.edu/hidalgo>



Part of the [Plant Biology Commons](#), and the [Plant Breeding and Genetics Commons](#)

Aguilar-Morales, María Ascención and López-Escamilla, Ana Laura, "Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*" (2013). *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*. 5.
<https://digitalcommons.unl.edu/hidalgo/5>

This Article is brought to you for free and open access by the Parasitology, Harold W. Manter Laboratory of at DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln. It has been accepted for inclusion in Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas by an authorized administrator of DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln.

Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*

María Ascensión Aguilar-Morales y Ana Laura López-Escamilla

Resumen

Dentro de la familia Orchideaceae, *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. es probablemente la orquídea más explotada en México, por lo que es importante establecer estrategias de conservación. El objetivo del presente trabajo fue determinar el mejor medio de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas. Cápsulas maduras e inmaduras de *L. speciosa*, fueron colectadas en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México y las semillas se sembraron en condiciones *in vitro* en cuatro tratamientos: Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100%; MS al 50%; Knudson C (KC) (1946) al 50% y KC al 100%. A los cuatro medios se les adicionó 1 gL⁻¹ de carbón activado. De la cápsula madura no se obtuvo germinación y en la inmadura el mejor tratamiento para la germinación fue MS al 50% a los 10 días. Sin embargo, con MS 100% se obtuvo la germinación a los 16 días y favoreció el desarrollo de las plántulas a comparación de MS 50%.

Palabras clave: *Laelia speciosa*, cultivo *in vitro*, germinación, conservación *ex situ*

Introducción

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae, con aproximadamente 35,000 especies agrupadas dentro de 650 a 900 géneros en el mundo (Hágsater *et al.*, 2005; Murguía y Lee, 2007; Menchaca y Moreno, 2011). Este grupo de plantas es altamente específico en sus requerimientos ecológicos, y muy vulnerable a las alteraciones humanas (Dixon *et al.*, 2003; Murguía y Lee, 2007). Por su belleza, las poblaciones silvestres son objeto de la extracción de ejemplares de manera ilegal para satisfacer la demanda de los mercados, lo anterior aunado al aumento gradual de cambios en el uso de suelo, así como la deforestación de su hábitat, son las principales causas de la disminución de poblaciones silvestres de orquídeas (Barrera *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; Ávila-Díaz y Oyama, 2007; Flores-Escobar *et al.*, 2008).

México cuenta con alrededor del 4% del total de especies de orquídeas conocidas del mundo; de

ellas, el género *Laelia* es endémico del territorio nacional por lo que se han tomado algunas estrategias para su conservación (Hágsater *et al.*, 2005; Menchaca y Moreno, 2011; Téllez-Velasco, 2011; Campos-Rojas y Muñoz-Pérez, 2012). A pesar de estas estrategias, la especie de orquídea más explotada en México es *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., por lo que está bajo la categoría de protección especial en la Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2010; Menchaca y Moreno, 2011; Téllez-Velasco, 2011; Campos-Rojas y Muñoz-Pérez, 2012). Investigadores mexicanos han propuesto un programa nacional para la conservación de esta especie (Menchaca y Moreno, 2011).

El cultivo de tejidos vegetales es una excelente herramienta de conservación *ex situ*, siendo las semillas el material de propagación adecuado cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética de una población (Flores-Escobar *et al.*, 2008). Sin embargo, las semillas de orquídeas se caracterizan por ser diminutas y carecer de endospermo, por tal

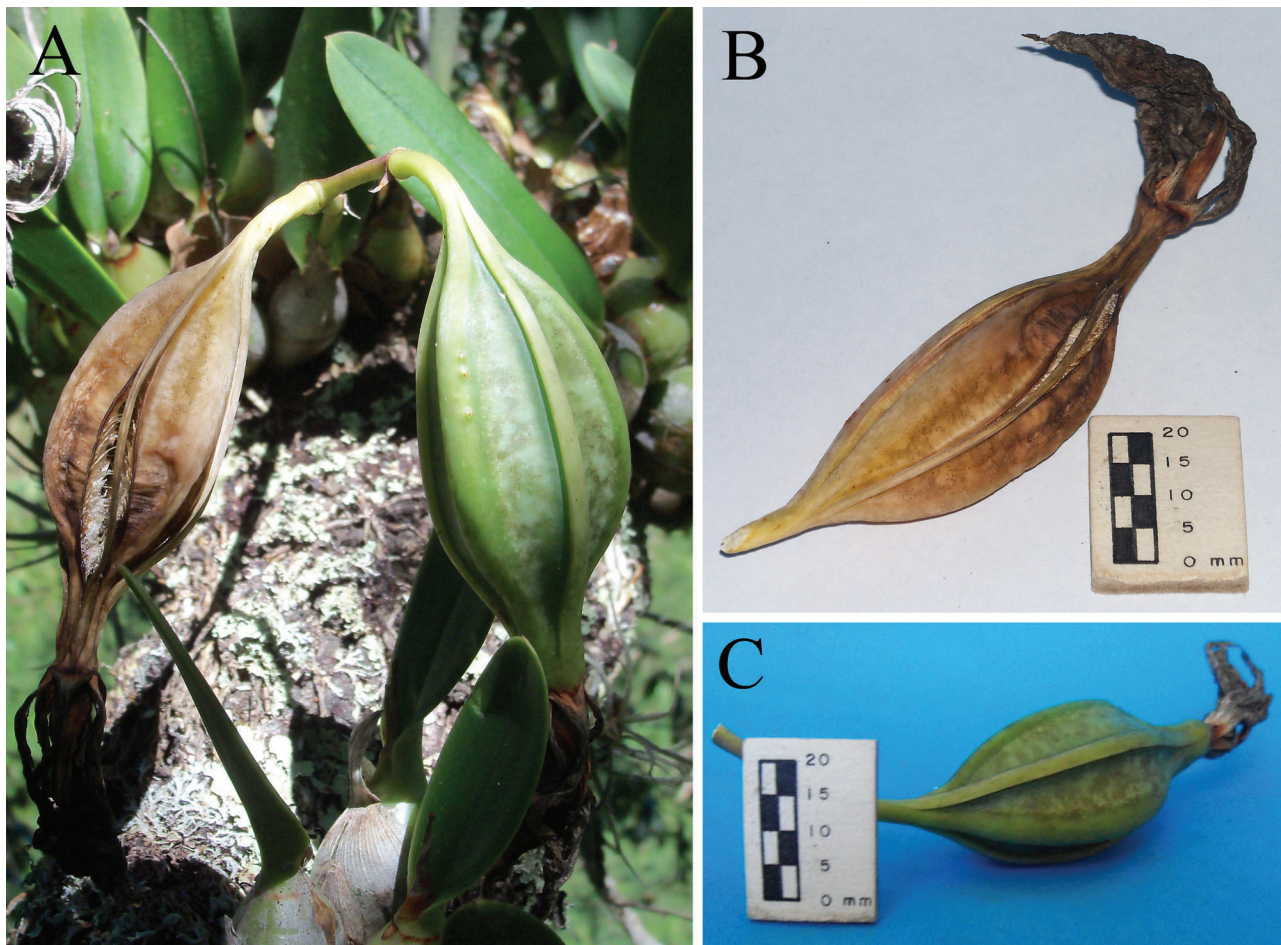


Figura 1. *Laelia speciosa*. A. Cápsula madura e inmadura en la planta. B. Cápsula madura. C. Cápsula inmadura.

razón existen numerosos trabajos sobre la germinación de semillas de orquídeas en cultivo *in vitro* (Barrera *et al.*, 2005; Ávila-Díaz y Salgado, 2006; Suarez-Quijada *et al.*, 2007; Flores-Escobar, 2008; Ruíz *et al.*, 2008; Ávila-Díaz *et al.*, 2009).

El objetivo de este trabajo fue determinar el mejor medio de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas de *L. speciosa*, que permita regenerar plántulas vigorosas en tiempos de incubación cortos con el fin de lograr su conservación *ex situ*.

Materiales y Métodos

Se realizó la colecta de cápsulas maduras e inmaduras de *L. speciosa* (Fig. 1) en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México; donde se obtuvieron semillas para establecerlas *in vitro*.

Desinfección del material

Cápsula madura: Las semillas extraídas de la cápsula se colocaron en paquetes de papel filtro y se aseguraron con grapas, el paquete se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo) al 15% por 15 min. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada de un minuto cada uno. Al paquete se le quitaron las grapas y se transfirieron por contacto a la superficie del medio, todo dentro de la campana de flujo laminar.

Cápsula inmadura: La cápsula se limpió con un algodón y solución de hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo), posteriormente en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar, la cápsula se sumergió en alcohol etílico al 75% e inmediatamente se flameó hasta consumirse el alcohol impregnado en ella, este procedimiento se repitió tres veces y posteriormente la cápsula se dejó enfriar. Se cortaron los extremos de la cápsula, y se le realizó un

corte longitudinal procurando introducir el bisturí en una de las hendiduras de la misma, una vez abierta se esparció una delgada capa de las mismas en la superficie del medio de cultivo (Ruíz *et al.*, 2008).

Establecimiento in vitro: Las semillas se establecieron en cuatro medios diferentes: el medio Murashige y Skoog (MS) al 50 y 100% de sus componentes (Murashige y Skoog, 1962) y el medio Knudson C (KC) al 50 y 100% de sus componentes (Knudson, 1946). A los cuatro medios se les adicionaron 1 gL⁻¹ de carbón activado con un total de 10 frascos por tratamiento. Se consideró que la germinación inició cuando se presentó la formación del protocormo tardío (protocormo con primordio foliar diferenciado) aunque no hubieran germinado todas las semillas (Flores-Escobar *et al.*, 2008). Los cultivos se mantuvieron a 24±2°C en un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y una intensidad luminosa de 43 µmol m⁻²s⁻¹. Los resultados se analizaron con la prueba estadística de ANOVA en el programa SAS Windows 8.0®.

Resultados y Discusión

Las semillas de *L. speciosa* procedentes de la cápsula madura no germinaron y al realizar la observación usando un microscopio, se detectó que estas carecían de embrión (Fig. 2B). Santos *et al.* (2006) reportaron frutos de *L. albida* con semillas sin embrión, atribuyéndole este fenómeno al efecto de diversos factores ecofisiológicos y de la variabilidad genética. Maya (2010) señala que en frutos verdes de *L. speciosa*, en su mayoría, las semillas contenían embriones viables y en frutos amarillentos y dehiscentes carecían de embrión; lo anterior lo atribuye a que esta planta requiere de un agente polinizador externo para su reproducción sexual. Además, es una especie con un sistema de apareamiento mixto, que tiende a la exogamia como lo establece Ávila-Díaz (2007). En el presente trabajo, no se analizaron las posibles causas de la presencia de semillas no viables; sin embargo, se pueden atribuir a este mismo fenómeno pues los índices demográficos de la población son afectados por la disminución de individuos y el cambio de uso de suelo, lo que podría causar problemas de endogamia. También, es importante señalar que en el año de la colecta, durante la fecundación y maduración de los frutos de las orquídeas, estuvieron en ambientes húmedos y cálidos, lo que provoca semillas inviables (Velasco y Beltrán, 2008). Sin embargo, se requiere de estudios más detallados para determinar las causas de la formación de semillas no viables.

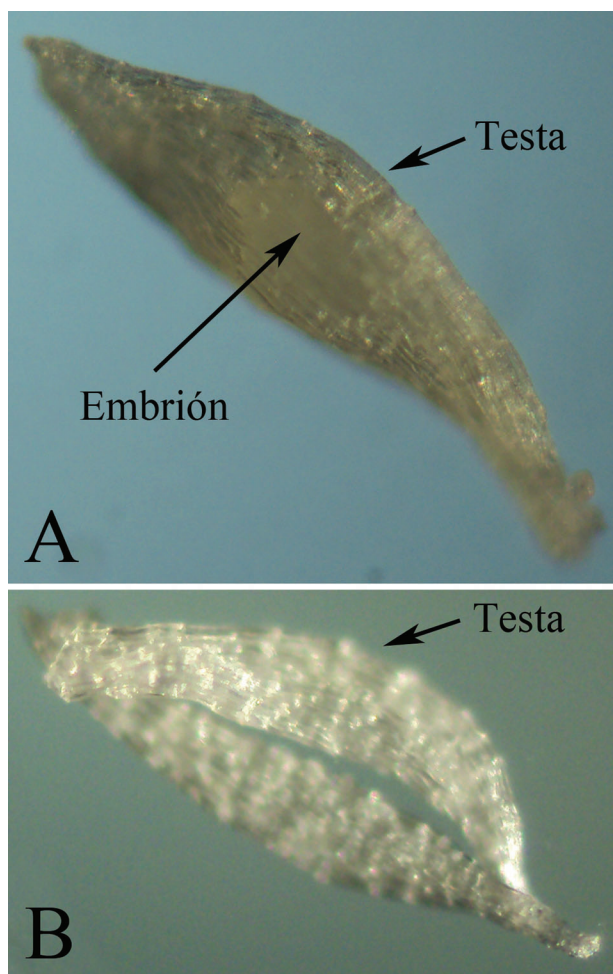


Figura 2. Microfotografía de la semilla de *L. speciosa* tomada con microscopio óptico modelo CX31 en aumento 300×. **A.** Semilla con embrión procedente de cápsula inmadura. **B.** Semilla inviable procedente de cápsula madura.

Se observó que las semillas de la cápsula inmadura presentaron semillas vacías y otras con un embrión. La longitud de las semillas en promedio fue de 0.61 ± 0.04 mm de largo por 0.11±0.01 mm de ancho (Fig. 2A). La germinación *in vitro* de semillas de *L. speciosa* procedentes de cápsulas inmaduras (Fig. 3) en medio MS y KC al 50% y 100% de todos sus componentes, respectivamente. Se registraron diferencias estadísticas altamente significativas ($P \leq 0.05 < 0.000$) entre los medios de cultivo establecidos en cuando a los días de inicio de germinación (Fig. 3).

En las semillas sembradas en medio MS 50% inició la germinación a los 10 días de su siembra, en medio MS 100% a los 16 días; en el medio KC 50% a los 114 días, y en KC 100% a los 178 días. En todos los casos se observó que en la totalidad de los frascos

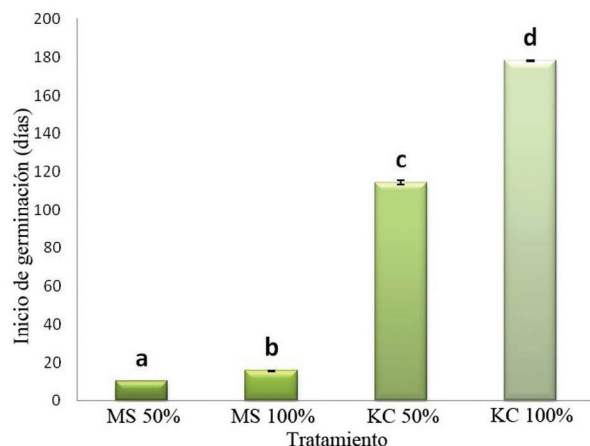


Figura 3. Índice de germinación de semillas en los cuatro medios. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

sembrados de cada tratamiento las semillas germinaron (100%) (Fig. 4).

En un mismo tratamiento, las semillas germina-

ron de manera asincrónica. Es importante mencionar que después de los 202 días de su establecimiento en los diferentes tratamientos se observaron diferentes etapas de germinación *in vitro*. Durante la imbibición, se presentó un hinchamiento y una coloración verde pálido del embrión ocasionado por la absorción de agua (algunos autores consideran a esta etapa como germinación) (Fig. 5A). Otras semillas presentaron una coloración verde muy acentuada y el tamaño del embrión aumentó considerablemente (Fig. 5B). En la germinación el embrión rompió la testa (Fig. 5C y D). En el protocormo inicial, se formó un complejo de células de color verde muy tenue, y apareció el primordio foliar (Fig. 5E). En el protocormo tardío, el protocormo siguió su crecimiento, apareciendo en el ápice un primordio foliar (Fig. 5F). El desarrollo de hojas continuó creciendo durante el primordio foliar y el cuerpo del protocormo comenzó a disminuir y a diferenciarse las hojas (Fig. 5G). En la siguiente etapa, se desarrollaron las raíces; el primordio de la raíz se desarrolló cerca de la base de

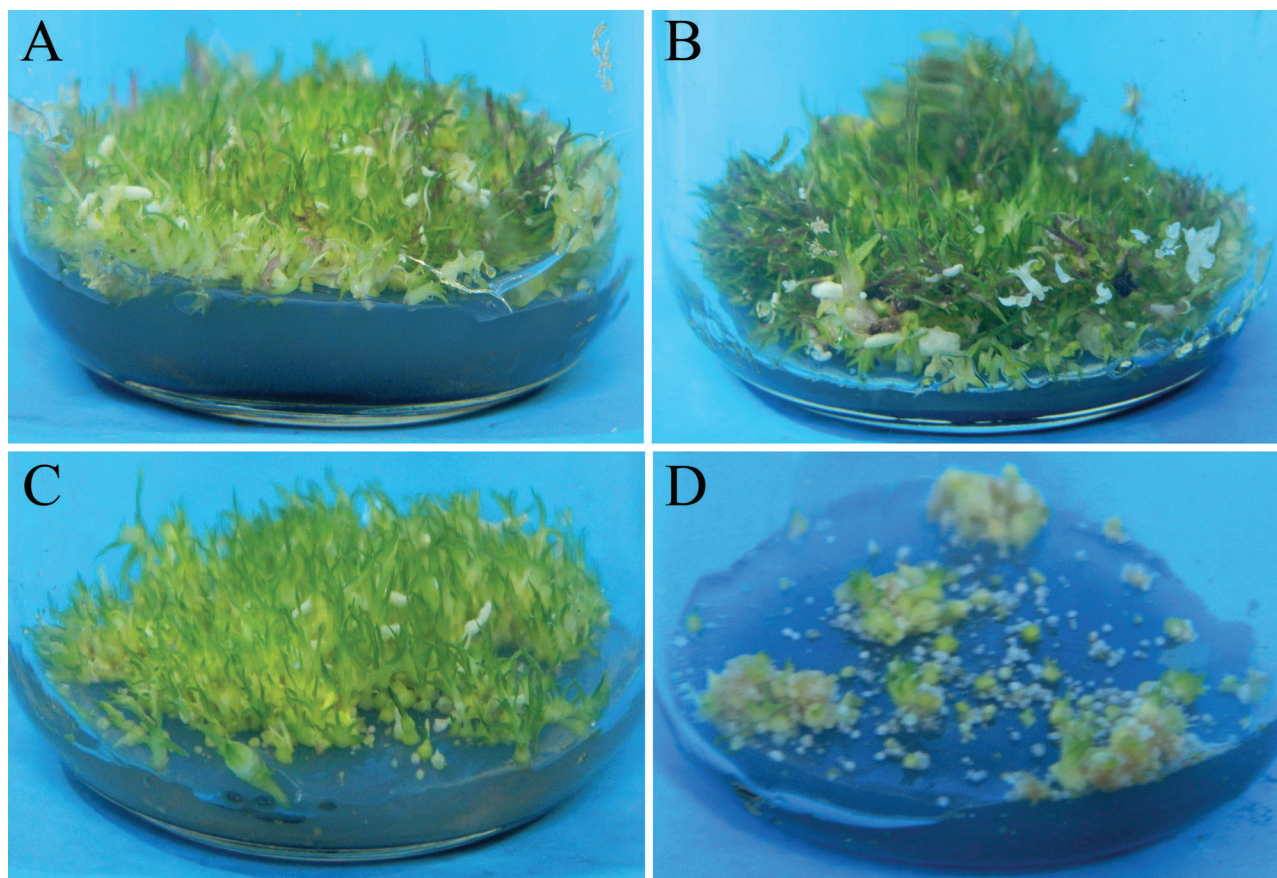


Figura 4. Germinación *in vitro* de *L. speciosa* en los diferentes tratamientos. **A.** Medio MS al 50%. **B.** Medio MS al 100%. **C.** Medio KC al 50%. **D.** Medio KC al 100%; a los cuatro medios se les adicionó 1 gL^{-1} de carbón activado.

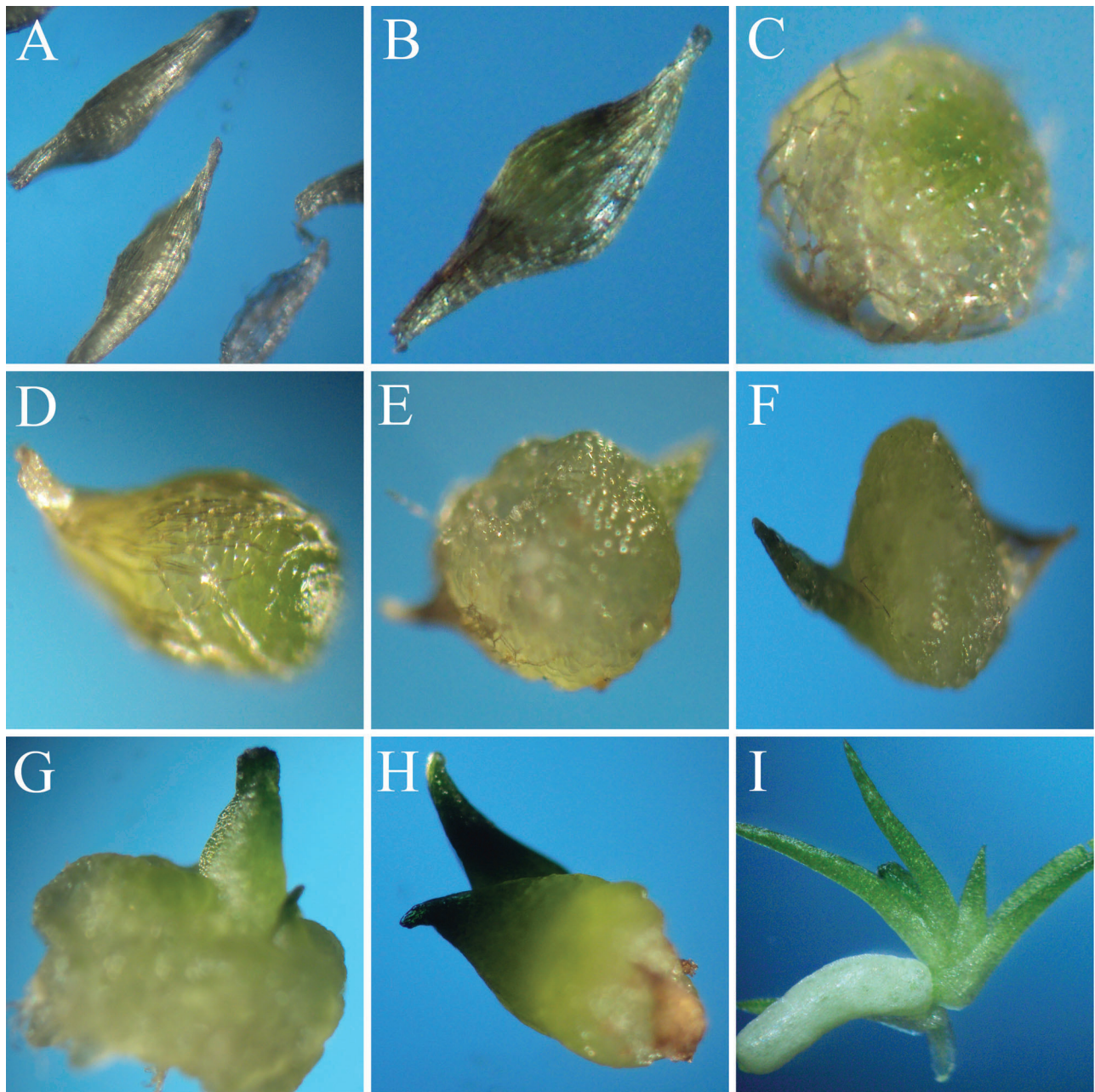


Figura 5. Microfotografías de la germinación y desarrollo de protocormos a plántulas de *L. speciosa* en microscopio óptico modelo CX31 **A.** Imbibición de semillas (200x); **B** Semilla verde (300x); **C** (80x) y **D** (100x). Germinación; **E.** Protocormo inicial (100x); **F.** Protocormo tardío (100x); **G.** Desarrollo de las hojas (100x); **H.** Desarrollo de raíces (72x); **I.** Plántula (Microscopio estereoscópico con zoom Leica Zoom™ 2000. 36x).

las hojas de color blanco (Fig. 5H). Finalmente, la plántula continuó su crecimiento, aumento de hojas y raíces, y el cuerpo del protocormo desapareció (Fig. 5I). Las observaciones sobre este proceso coincidieron con las de Damon *et al.* (2004) y de Flores-Escobar *et al.* (2008).

Estos resultados son alentadores para promover la germinación *in vitro* de cápsulas inmaduras de *L. speciosa*. En comparación con los resultados obtenidos en trabajos con semillas inmaduras, Barrera *et al.* (2005) reportaron la germinación a partir de cinco semanas en medio MS 100% adicionado con auxi-

nas/citocininas. Ávila-Díaz y Salgado (2006) reportaron 100 % de germinación a los 30 y 45 días en medio MS adicionado con 0.05 mgL⁻¹ de N6-benciladenina (BA) en diferentes especies de orquídeas y Ávila-Díaz *et al.* (2009) reportaron la germinación de semillas 90 días posterior a su siembra en medio MS 100% adicionado con citocininas y en condiciones de luz.

Suárez-Quijada *et al.* (2007) estudiaron otra especie, *Euchile mariae*, y reportaron la germinación de semillas procedentes de cápsulas inmaduras a los 15 días después de la siembra en medio MS 100%. Ruíz *et al.* (2008) reportaron la germinación de semillas de *Encyclia adenocaula* a los 27 días en medio MS. Germinación de semillas de *Oncidium stramineum* en medio de cultivo MS suplementado con extractos naturales ocurrió a los 17 días (Flores *et al.*, 2008).

Conclusiones

Con base en los resultados del presente trabajo, para la germinación *in vitro* de semillas de *L. speciosa* fue procedente de cápsulas inmaduras, se recomienda utilizar el medio de cultivo MS al 50% de sus componentes, debido a que los tiempos de germinación en comparación de otras especies es relativamente más corto y resultó ser eficiente. Así mismo, otra alternativa de conservación del germoplasma *in vitro* para *L. speciosa* es mediante la conformación de un banco de germoplasma utilizando medios mínimos. Adicionalmente, si se requiere de realizar propagación masiva de las plantas, su crecimiento y desarrollo será favorecido al subcultivar los protocormos a medio MS al 100% de sus componentes.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 247530 otorgada a AMMA para realizar estudios de Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Literatura citada

- Ávila-Díaz, I. 2007. Biología de poblaciones *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) para su manejo y conservación. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones en ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. 162 p.
- Ávila-Díaz, I. y K. Oyama. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). American Journal of Botany 94:184-193.
- Ávila-Díaz, I. y G. R. Salgado. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Biológicas 8:138-149.
- Ávila-Díaz, I., K. Oyama, A. C. Gómez y G. R. Salgado. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 99:335-343.
- Barrera, V. D. G., V. M. Chávez-Ávila y E. Sandoval. 2005. Propagación *in vitro* vía organogénesis indirecta de *Laelia speciosa* (orchidaceae) especie en peligro de extinción. En Memoria del XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 18 a 23 de septiembre, Mérida, Yucatán.
- Campos-Rojas, E. y R. Muñoz-Pérez. 2012. Flor de Mayo (*Laelia speciosa* (Kunth) Schltr.) la estrella de Belén. Agroproductividad 5:3-10.
- Damon, A., L. Aguilar-Guerrero y V. Nikolaeva. 2004. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del soconusco, Chiapas, México. Revista Chapingo, Serie Horticultura 10:195-203.
- Dixon, K., S. Kell, R. Borret y P. Cribb. 2003. Orchid conservation. Natural History publications (Borneo). Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia 418 p.
- Flores-Escobar, G., S. J. P. Legaria, V. I. Gil y L. M. T. Colinas. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. Chapingo, Serie Horticultura 14:347-353.
- Hágsater, E., M. A. Soto, G. A. Salazar, R. Jiménez, M. A. López y R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoin, México 303 p.
- Knudson, L. 1946. A nutrient for germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin 15:214-217.
- Maya, R. G. 2010. Sistema de apareamiento y tasa de exocruzamiento de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr (Orchidaceae) en poblaciones sujetas a diferente grado de perturbación. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán 72 p.
- Menchaca, A. R. G. y D. M. Moreno. 2011. Conservación de orquídeas una tarea de todos. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México 41 p.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Murguía, G. J. y E. H. E. Lee. 2007. Manual de producción de Orquídea. Dirección General Editorial. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México 75 p.
- Ruíz, B. C., C. A. Laguna, A. L. G. Iglesias, A. Damon, H. T. N. J. Marín, R. H. S. Azpíroz y M. J. L. Moreno. 2008. *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae). Phytion 77:203-215.

- Santos, H. L., L. E. Aguirre, C. J. E. Campos y G. M. Martínez. 2006. Conservación *in situ* de la flora mexicana: la orquídea *Laelia albida*, en una reserva de la biosfera. Revista Ciencia y desarrollo en internet. <http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/Revista/ArticulosCompletos/pdf/Orquidea.pdf>
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-2010, Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de Especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación* 30 diciembre. México.
- Suárez-Quijada, I., M. Hernández-Altamirano, V. M. Chávez-Ávila, E. Sandoval-Zapotitla y A. Martínez-Palacios. 2007. Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). *Lanksteriana* 7:388-393.
- Téllez-Velasco, M. A. A. 2011. Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México. 179 p.
- Velasco, L. O. y P. B. Beltrán. 2008. Orquídeas del Parque Natural Sierra de Grazalema. Consejería del Medio Ambiente. 2ª. Edición. Sevilla, España pp. 47-86.