

UTILIZACION DE TRES MEDIOS ORGANICOS PARA LA GERMINACION «*IN VITRO*» DE SEMILLAS DE GUARIA MORADA, *Cattleya skinneri* (BATEMAN)

José A. García y Ana T. Valerín

Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

Rafael Salazar

Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

(Recibido: noviembre 27, 1993 / Aceptado: julio 30, 1994)

RESUMEN

Con el fin de determinar diferencias en la germinación de semillas de *Cattleya skinneri*, ocasionadas por diversos medios de cultivo, en condiciones «*in vitro*», fueron evaluados cuatro medios (tratamientos): tres de origen orgánico (banano, papa y zanahoria) y uno de origen sintético formulado por Murashige y Skoog (1962) (M.S); con 20 repeticiones cada uno. Los datos fueron analizados con base en la aplicación de un diseño irrestricto al azar, previo a una transformación de los valores obtenidos ($\sqrt{y + 0.5}$). De acuerdo con los resultados de los análisis estadísticos, no se encontraron diferencias significativas entre los medios utilizados. Sin embargo, se observó que en el medio con papa las semillas germinaron y se desarrollaron en menos tiempo que en los demás tratamientos; lo que conlleva a un ahorro en los costos de producción.

ABSTRACT

Twenty replications of four treatments (Murashige and Skoog, banana, potato and carrot) were used. A complet randomized experimental design was established and the data are expressed using the square root of ($\sqrt{y + 0.5}$). The objective of this experiment was to determine seed germination differences from the medium effects under *in vitro* conditions. The results showed no significant differences among treatments, but it was observed that seeds were germinated and grew shorter in potato medium than the other treatments. This result indicates a saving in cost production.

INTRODUCCION

La gran mayoría de especies de orquídeas

poseen semillas indiferenciadas (carecen de cotiledones y endosperma), son de tamaño diminuto, y además necesitan de la asociación con un hongo para poder germinar. A pesar de que son producidas en gran número, por lo general sólo unas pocas germinan y de esas quizás solamente una sea capaz de llegar a constituir una planta adulta. Es por ello que estas semillas necesitan requerimientos específicos para su germinación y desarrollo.

Estas características propias de las semillas de orquídeas para una producción controlada han obligado al uso de medios de cultivo que contienen minerales, carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento y otros aditivos de origen orgánico, con el fin de aumentar las poblaciones de estas plantas (Ernest *et al.*, 1970).

Diversos investigadores han tratado este problema, entre ellos Knudson (1922), el cual en sus estudios logró obtener 90% de semillas germinadas del híbrido *Laelocattleya* al utilizar fructosa con extracto de papa. Otros investigadores, como Vacin y Went (1949), utilizando jugo de tomate en una concentración de 750 ml/l y 1% de proteína hidrolizable, obtuvieron buenos resultados en la germinación de semillas de *Epidendrum sp* y *Cymbidium sp*.

Posteriormente fue usado el jugo de banano (30 g/l) por Graeflinger (1950) como medio de cultivo, para la propagación de semillas de orquídeas, obteniendo excelentes resultados. Más recientemente, Arditti (1965) logró la germinación y

crecimiento de semillas de *Cattleya*, usando 750 ml/l de jugo de tomate con maltosa, con un pH de 5.0.

Se sabe así que sustancias de origen orgánico, utilizadas como medios de cultivo para algunas especies de orquídeas, han dado resultados sorprendentes.

Además, el bajo costo y disponibilidad de los componentes de estos medios y su fácil preparación, los convierte en una alternativa viable a disposición de los coleccionistas y productores de orquídeas.

El propósito del presente trabajo fue determinar el porcentaje de germinación de semillas de *Cattleya skinneri* en medios de cultivo de origen orgánico obtenidos a partir de productos comunes en el mercado nacional, tales como papa, banano y zanahoria.

MATERIALES Y METODOS

Para el presente estudio fueron utilizados el medio formulado por Murashige y Skoog (1962), conocido como (M.S.) y tres medios de origen orgánico (de preparación casera). La composición química de los medios se presenta en el Cuadro 1.

Los medios de origen orgánico se elaboraron de la siguiente manera: se pesaron 400 g del sustrato básico (papa, banano o zanahoria), luego se licuó y filtró. Posteriormente se le adicionó 30 g de sacarosa y 12 g de yema de trigo como agente gelificante a cada uno. La sustancia resultante se diluyó con agua destilada hasta completar un litro y su pH se ajustó a 5.8.

Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave durante 15 minutos a $1,07 \text{ kg/cm}^2$ de presión y a una temperatura de 120°C .

El material biológico utilizado correspondió a una cápsula de cinco meses de edad y su esterilización se llevó a cabo de la siguiente manera: la superficie externa de la cápsula fue lavada con agua del tubo, luego se colocó en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5% v/v durante 15 minutos. Por último, se lavó tres veces con agua

destilada estéril en la cámara de flujo laminar. La cápsula fue abierta longitudinalmente y las semillas se depositaron en cantidades similares, empleando para ello 0.068 gramos de semillas en cada frasco de 7 cm de alto y 5 cm de ancho, con 15 ml de cada uno de los medios respectivos previamente elaborados y esterilizados. Posteriormente, los frascos se trasladaron a un cuarto de crecimiento con períodos de luz de 16 horas y de oscuridad 8 horas, la intensidad lumínica fue de 80 watts y la temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Después de tres meses de la inoculación de las semillas, se evaluó en cada uno de los medios de cultivo el porcentaje de germinación, con base en lo establecido por Hartman y Hudson (1982), quienes afirman que cada cápsula de *C. skinneri* contiene alrededor de 30.000 semillas, donde el 60% son viables.

Se escogió como unidad experimental un frasco y la variable en estudio fue el número de semillas germinadas por tratamiento.

Para el análisis de los datos fue necesario realizar la siguiente transformación: $\sqrt{y + 0.5}$; luego se utilizó un diseño irrestricto al azar con cuatro repeticiones e igual número de tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los porcentajes de germinación de semillas de *C. skinneri*, obtenidos en los ensayos con los medios de banano, papa, zanahoria y M.S. fueron de 3,0, 5,8, 2,8, y 3,5, respectivamente (Cuadro 2).

La germinación de las semillas de *C. skinneri* en el medio con papa se produjo a los 15 días de sembradas. En el medio M.S., las semillas germinaron a los 75 días y su desarrollo fue lento comparado con el medio elaborado a base de papa. Estas diferencias en la germinación y desarrollo podrán ser atribuidas a las siguientes causas:

1. La consistencia de los medios de cultivo de origen orgánico.
2. La esterilización de los medios de cultivo de origen orgánico.

Cuadro 1.

Contenido químico de los medios de origen orgánico y del medio Murashige y Skoog.

Medios orgánicos	Puré (mg/100g)			Murashige y Skoog	(mg/l)
	banano	zanahoria	papa		
<i>Componentes</i>					
Proteína	1,19	1,19	2,19	MH ₄ NO ₃	1.650,0
CHOS	22,2	9,7	17,1	KN ₀ ₃	900,0
Ca	8,0	37	7,0	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370,0
P	28	36	53,0	MnSO ₄ · 7H ₂ O	22,3
Fe	0,7	0,7	0,6	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10,6
K	370	341	407,0	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
Na	1,0	4	3,0	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
				KI	0,83
Vitamina A	190U	11.000U	—	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
Tiamina	0,025	0,06	0,09	KH ₂ PO ₄	170,0
Riboflavina	0,06	0,05	0,06	K ₃ B ₀ ₃	6,2
				NaMoO ₄ · 7H ₂ O	0,7
Niacina	1,5	15,0	0,6	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,85
Vitamina C	10,0	8,0	16,0	Na ₂ EDTA	37,2
				Acido nicotínico	0,5
Yema de trigo*	12,0	12,0	12,0		
Sacarosa	30,0g	30,0g	30,0g	Sacarosa	30,00g
				Tiamina	0,1
				Glicina	2,0
				Mioinositol	100,0
				Piridoxina	0,5
				Agar	8,0

* 100 g de yema de trigo contienen 20 mg de Ca, 9 mg de P, 12 mg de Fe y 15 mg de niacina.
Fuente: Fisher, B. (1972).

3. El efecto de las vitaminas presentes en los medios de origen orgánico.

En los medios orgánicos utilizados, se observó un mayor desarrollo de los embriones, al compararlos con los desarrollados en el medio sintético (M.S.). Resultados similares fueron obtenidos por Kerbauy y Handro (1981), al evaluar medios líquidos y otros de consistencia sólida. Esto se explica por la dilución de los eventuales inhibidores del crecimiento formados durante el proceso de desarrollo.

Investigadores como Steward *et al.* (1952) justifican este aumento en el crecimiento de los embriones cultivados en los medios líquidos, debido a que la disponibilidad de los nutrientes en ellos es ideal, gracias a que el tejido interacciona fuertemente con los nutrientes. Esto es facilitado cuando la gradiente de concentración es grande, haciendo que la difusión sea un modo de traslocación de nutrientes rápido y eficiente.

Otro aspecto que está relacionado con la germinación y crecimiento de las plántulas de *C.*

Cuadro 2

Total de semillas de *C. skinneri* germinadas por tratamiento, promedio por frasco y porcentajes de germinación por tratamientos.

MEDIOS	SEMILLA GERMINADA POR TRATAMIENTO	PROMEDIO POR FRASCO	PORCENTAJE (%)
Banano	590	29,50	3,0
Papa	1.051	52,55	5,8
Zanahoria	475	23,75	2,8
M.S.	627	31,35	3,5

Cuadro 3.

Análisis de varianza para el número de semillas germinadas de *C. skinneri* en los diferentes medios.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Tratamientos	3	51,9465	17,3155	1,69 NS
Error	76	777,9218	10,2358	
Total	79	929,8683		

NS: No significativo.

skinneri en los medios de cultivo de origen orgánico, son los cambios químicos que sufren los almidones durante el proceso de esterilización. Así los almidones presentes en el medio con papa sufren hidrólisis, formando azúcares, los cuales son asimilados más fácilmente por las semillas (Navarro, 1993). En el caso de los medios de zanahoria y de banano los azúcares complejos que contienen son disociados en otros más simples, los cuales son aprovechados más fácilmente por las semillas, manifestándose con una buena germinación.

Resultados semejantes a los observados en esta investigación fueron reportados por Quednow (1930) con el híbrido *Laeliocattheya*.

Vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina y la vitamina C presentes en los medios de origen

orgánico (Cuadro 1), podrían involucrarse con una mayor germinación y crecimiento de *Cattleya skinneri*. Resultados obtenidos por Noggle (1943) y Arditti (1985) en *Cattleya labiata* y *Oncidium pulvinatum*, coinciden con los resultados encontrados en nuestro estudio.

El análisis de varianza indica que no existen diferencias ($P < 0.05$) entre los medios utilizados (Cuadro 3); aunque el medio con papa presentó el mayor número promedio de semillas germinadas (5,8), seguido por los medios M.S. (3,5), banano (3,0) y por último el de zanahoria (2,8) (Cuadro 2).

Este mayor número promedio de semillas germinadas de *C. skinneri* puede estar relacionado tanto con la disposición de los compuestos orgánicos, en los medios estudiados, como con las dife-

rencias anatómicas, fisiológicas y genéticas de las semillas.

El presente estudio demuestra que el medio con papa, comparado con el medio M.S., acortó el proceso de germinación en 60 días, lo que provocaría una disminución en los costos de producción al disminuir el tiempo necesario para la germinación

y desarrollo. Además, el porcentaje de germinación fue mayor que en los demás tratamientos.

Es necesario destacar que el precio de los medios de cultivo de origen orgánico es actualmente la centésima parte del valor del medio M.S., gracias a que en su elaboración no se utilizan gelificantes, que es lo que encarece los medios de origen sintético.

LITERATURA CITADA

- Arditti, J. 1965. How good are tomato juice media for orchid seedling culture. *Orchid Digest*. 29: 382-383.
- _____. 1967. Niacin biosynthesis is germinating Amer. *Orch. Laeliocattleya* orchid embryos and young seedlings. *Amer. J. Bot.* 54(3).
- Ernest, R.; Arditti and Healey. 1970. The nutrition of orchid seedlings. *American Orchids Society*. 599-604.
- Fisher, B. 1972. Valor nutritivo de los alimentos. Ed. Limusa. Wiley S. A. México. 250 pp.
- Graeflinger, B. 1950. «Repicagen precoce de orquídeas sobre Muscenas». *Orquídeas*. 12: 131-134.
- Hartman, D. y J. Hudson. 1982. Propagación de plantas: principios y prácticas. Ed. CECOSA. México. 814 p.
- Ichi, T. *et al*. 1986. Effects of gelling agent on *in vitro* Culture of plant tissue. In: *Agric. Biol. Chem.* 50(9): 2397-2399.
- Kerbaux, G. B. and W. Handro. 1981. Culture of orchid embryos in liquid medium. *The Orchid Revied*. 1056(89): 316-318.
- Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seed. *Gaz.* 73: 1-25.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-474.
- Navarro, W. 1993. Efecto del proceso de esterilización en los medios de origen vegetal. Comunicación personal.
- Noggle, G. R. 1943. Effects of vitamins on germination and growth of orchids. *Botanical Gazette*. 104.
- Quednow, Klaus G. 1930. «Beitrag Zur Frager der Aufnahme geloster Kohlenstoffverbindungen durch Orchideen und anderen Pflanzen». *Bot. Archiev*. 30: 51-108.
- Romberger, J. and C. Tabor. 1971. The *Apicea abies* shoot apical meristem in culture. I Agar and autoclaving effects In: *Amer. J. Bot.* 58(2): 131-140.
- Steward, F.C. and S.M. Caplin. 1952. Investigations on growth and metabolism of plant cell. In: *Ann of Bot. (N.S.)*, 16(64): 478.
- Vacin, E. F. and F. Went. 1949. «Use of tomato juice on the asymbiotic germination of orchid seed». *Bot. Gaz.* 111: 1175-1183.