

LA PROPAGACIÓN MASIVA DE ORQUÍDEAS (Orchidaceae); UNA ALTERNATIVA DE CONSERVACIÓN DE ESPECIES SILVESTRES

THE MASSIVE PROPAGATION OF ORCHIDS (Orchidaceae): AN ALTERNATIVE FOR THE CONSERVATION OF WILD SPECIES

Pedraza-Santos, M.E.^{1*}

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Avenida Francisco J. Múgica S/N Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

*Autor de correspondencia: marelpesa@yahoo.com.mx.

RESUMEN

En el presente trabajo se revisa el uso de las técnicas de cultivo *in vitro* como componente fundamental de los programas de propagación y conservación de orquídeas nativas. A través de la micropropagación ha sido posible la producción masiva de plantas, libres de patógenos, a bajo costo, en espacio reducido, en menor tiempo y bajo condiciones controladas. Los bancos de germoplasma *in vitro* son sitios para la conservación de recursos fitogenéticos en condiciones controladas de laboratorio e involucran diversas técnicas de cultivo y preservación, además, se analizan las ventajas de dicha técnica como herramienta para el estudio de los factores ambientales que influyen en el desarrollo y la floración de las orquídeas.

Palabras clave: Multiplicación *in vitro*, conservación de especies.

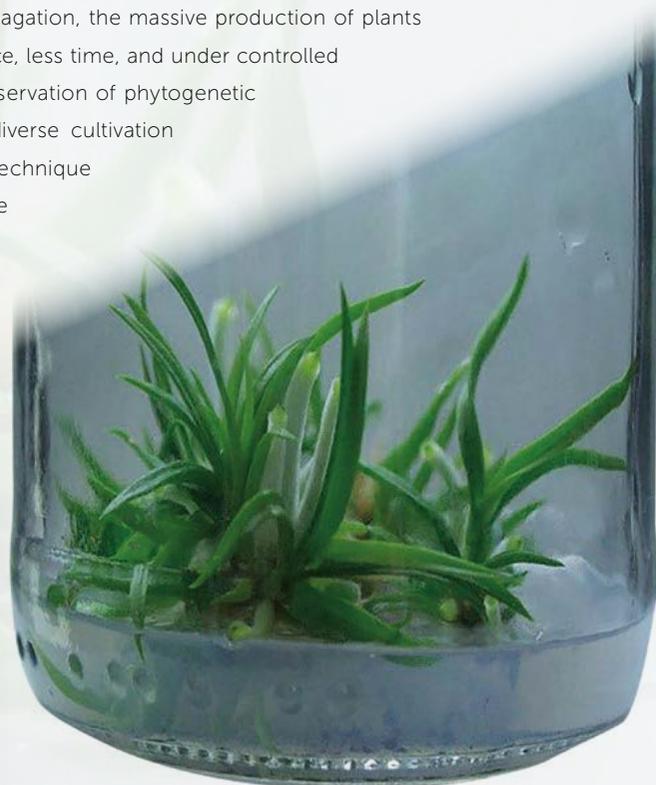
ABSTRACT

In this work the use of *in vitro* cultivation techniques is reviewed as a fundamental component of the propagation and conservation programs of native orchids. Through micropropagation, the massive production of plants has been possible, free of pathogens, at low cost, in reduced space, less time, and under controlled conditions. The banks of *in vitro* germplasm are sites for the conservation of phylogenetic resources under controlled laboratory conditions and involve diverse cultivation and preservation techniques; in addition, the advantages of this technique as a tool for the study of environmental factors that influence the development and flowering of orchids are analyzed.

Keywords: *In vitro* multiplication, species conservation.

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 6, junio. 2017. pp: 31-36.

Recibido: diciembre, 2016. **Aceptado:** mayo, 2017.



INTRODUCCIÓN

México es un país rico en orquídeas, se estima que existen 1,250 especies y 168 géneros (Salazar, 2013), sin embargo, es uno de los grupos de plantas más vulnerables por razones antropogénicas, tales como el cambio de uso de suelo, destrucción de hábitats de mayor diversidad, endemismo y extracción selectiva de individuos de las poblaciones silvestres. Estos disturbios han ocasionado que varias orquídeas principalmente aquellas de flores vistosas y confinadas a áreas geográficas limitadas se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, por ejemplo, *Phragmipedium exstaminodium* y *Mexipedium xerophyticum* que se localizan en Chiapas y Oaxaca, respectivamente. El aumento de la tasa de pérdida de la biodiversidad ha estimulado el desarrollo de diferentes estrategias de conservación. La más efectiva es la protección del hábitat natural de las orquídeas (Tsiftsis *et al.*, 2009). La conservación *in situ* no es una opción viable cuando el medio físico o geográfico se ha deteriorado de manera drástica, y es necesario implementar diversos mecanismos para la conservación *ex situ*, entre los que se incluye a la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* (Irawati, 2013). Las técnicas de micropropagación son valiosas ya que permiten la propagación clonal o sexual masiva de orquídeas en ambientes asépticos libres de hongos y bacterias y pueden obtenerse plantas libres de virus a través del cultivo de meristemos. Además, el tamaño pequeño de las plántulas reduce los requerimientos de espacio y los costos de mantenimiento en los bancos de germoplasma; sin embargo, durante la preservación de germoplasma *in vitro* se deben establecer metodologías que garanticen la estabilidad genética del material cultivado.

Bancos de semilla

La conservación mediante bancos de semillas es uno de los métodos más exitosos de conservación de orquídeas (Neto y Custódio, 2005), porque una planta puede producir varios frutos (cápsulas), cada uno con cientos a millones de semillas, de 0.05 a 6.0 mm de longitud y

0.31 a 24 μg de peso (Arditti y Ghani, 2000). Las semillas de las orquídeas se clasifican como ortodoxas, porque su longevidad mejora cuando se reduce el contenido de humedad de 20% a 5%, y se almacenan entre 5 °C y 0 °C. Bajo estas condiciones algunas especies mantienen 50% de semillas viables durante 8 a 14 años (Pritchard y Seaton, 1993). Sin embargo, las condiciones de almacenamiento deben definirse para cada especie. Además, son comunes los lotes de semillas sin embriones o semillas con viabilidad baja; por esto es importante determinar la calidad fisiológica de las semillas antes de su conservación, especialmente en semillas de especies raras o amenazadas. La prueba de tetrazolio es un método confiable para la evaluación de la calidad y el vigor de las semillas; y a partir de esta prueba se obtiene el porcentaje de semillas viables de una muestra (Figura 1). La evaluación de la calidad fisiológica de la semilla con tetrazolio es un procedimiento de rutina, fácil, rápido y de bajo costo que permite decidir que lotes se destinan para su conservación.

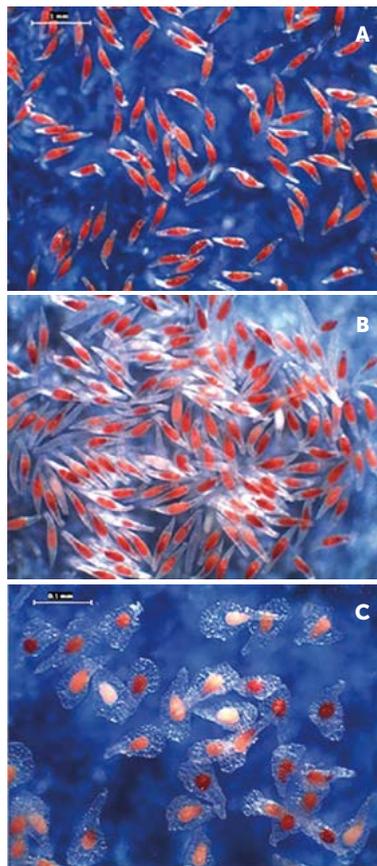


Figura 1. Prueba para evaluar la calidad fisiológica de semillas de orquídea. Embriones viables teñidos de rojo de A) *Guarianthe aurantiaca*, B) *Laelia autumnalis* y C) *Stanhopea intermedia*.

Germinación asimbiótica de semillas

Las orquídeas son plantas de difícil reproducción natural porque no todas las semillas de una cápsula se forman completamente o son fértiles, además su tamaño es diminuto y tienen escasa o nula reserva de nutrientes y sólo germinan aquellas con un embrión viable (Billard *et al.*, 2014). En muchos casos el embrión es muy pequeño con relación a la testa por lo que el volumen de la semilla puede estar ocupado por 96% de aire y la humedad no llega al embrión (Arditti, 2008). En la germinación de algunas especies de orquídeas influye también la concentración de ABA en las semillas, de tal forma que si su concentración es alta, la germinación se reduce, y sumado a estas características, las semillas requieren de condiciones específicas del árbol hospedero, condiciones ambientales favorables y la simbiosis con hongos micorrícicos (Romero-Tirado *et al.*,

2007), por lo que de forma natural sólo germina 1% de las semillas producidas y de éstas un porcentaje muy pequeño alcanza la etapa adulta (Verma *et al.*, 2014). Las

técnicas de cultivo *in vitro* han contribuido a mejorar la germinación de semillas de orquídeas para incrementar y extender la población natural de especies nativas (Figura 2). Algunas variables importantes para la germi-

nación son el medio de cultivo utilizado, las condiciones de incubación y el balance de fitohormonas. Estos requerimientos varían en función de la especie vegetal. En el género *Laelia* se ha logrado la germinación *in vitro*



Figura 2. Método para la propagación *in vitro* de *Rhynchostele cervantesii* a partir de semillas. A) y B) Fecundación manual, C),D) y E) Formación y cosecha de frutos, F), G) y H) Siembra de semillas, I) y J) Protocormos, K) y L) Alargamiento de plántulas, M) y N) Toma de datos, O) Aclimatación de plántulas. Cortesía de Ing. Juan Manuel Gómez Sanabria.



de las especies *L. speciosa* (Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013), *L. anceps* ssp. *Dawsonii* en la cual se logró la formación de embriones somáticos (Lee *et al.*, 2010); *L. eyermaniana* donde se observó el desarrollo morfológico desde la germinación hasta la aclimatación *ex vitro* (Francisco-Nava *et al.*, 2011); en *Laelia autumnalis* se evaluó el efecto de diferentes colores de luz sobre el desarrollo de su germinación (Murillo, 2016). En los casos anteriores el tiempo que transcurre entre la germinación y la obtención de plantas listas para aclimatar es hasta de dos años.

Conservación *in vitro*

La elección del método de preservación *in vitro* depende del tiempo que se necesite su almacenamiento. Para el de corto y mediano plazo, el objetivo es reducir el desarrollo de las plántulas y aumentar los intervalos entre subcultivos. Para el almacenamiento a largo plazo, la criopreservación es el único método disponible para lograr este objetivo.

Técnicas de crecimiento mínimo

Se usan rutinariamente para conservación a mediano plazo de numerosas especies y la reducción del desarrollo generalmente se logra modificando las condiciones ambientales y el medio de cultivo. Los cambios en las condiciones ambientales incluyen una reducción en la temperatura, mientras que las modificaciones del medio de cultivo pueden incluir la dilución de los elementos minerales, reducción en la concentración de azúcar, cambios en la naturaleza y concentración de inhibidores del crecimiento y la adición de compuestos activos osmóticamente (Kulus y Zalewska, 2014).

Criopreservación

Este método consiste en llevar material biológico desde su temperatura fisiológica normal hasta ultra-bajas temperaturas (generalmente en nitrógeno líquido (NL) a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), ofrece la posibilidad de conservar germoplasma por tiempo indefinido; además se minimizan las pérdidas por mano de obra, se reduce el espacio y se evita la variación genética. Existen diversas técnicas para la criopreservación del germoplasma vegetal, pero es en función de la fisiología, las características de la especie y el tejido seleccionado, que se determinará el método que asegure la mayor sobrevivencia de los explantes sometidos a este tipo de conservación (Engelmann y González-Arno, 2013). Ejemplos exitosos hasta ahora se han obtenido en semillas de orquídeas del género *Oncidium* con el método de vitrificación que

logra 68% de germinación después de ser deshidratadas con solución PVS2+1% floroglucinol (Galdiano *et al.*, 2013). Este método también se ha utilizado en semillas de *Bletilla formosa* (Hayata) Schltr con sacarosa 0.4 M+glicerol 2 M y PVS2, con el que germinaron 91% de las semillas después de la criopreservación (Hu *et al.*, 2013). Con el método de encapsulación-deshidratación y el uso de cuerpos como protocormos (PLBs por sus siglas en inglés *Protocorm Like Bodies*) de *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) se obtuvo 30% de recrecimiento después de dos semanas de haber sido sometidos a criopreservación (Khoddamzadeh *et al.*, 2011). Con PLBs de *Dendrobium nobile* criopreservados con el método de encapsulación-vitrificación se logró una supervivencia y regeneración de 78.1% y 75.9%, respectivamente, valores superiores a los obtenidos con el método de encapsulación-deshidratación que registró 53.3% de supervivencia y 50.2% de regeneración, respectivamente (Mohanty *et al.*, 2012). Mohanty *et al.* (2013) al utilizar PLBs de *Dendrobium chysanthum* Wall ex Lindl., se obtuvieron 63.2% de supervivencia, de los cuales 59.9% lograron regenerarse después de la criopreservación.

Floración *in vitro*

En general, las orquídeas tienen una fase juvenil larga que puede durar hasta 12 años, en función de la especie y el cultivar (Islam *et al.*, 2015), lo que ha dificultado la propagación sexual de estas plantas. El cultivo *in vitro* ofrece la posibilidad de modificar los factores ambientales y químicos para acortar hasta en dos años el tiempo requerido para la floración de las plántulas. Por ejemplo, la floración *in vitro* de *Dendrobium candidum* y *Oncidium varicosum* se logró después de tres y ocho meses de cultivo, en comparación con tres años que toma su floración *in vivo* (Kerbaui, 1984; Wang *et al.*, 1997). Las plántulas de *Dendrobium Madame Thong-In* florecieron de cinco a seis meses después de iniciar su cultivo *in vitro*; además, las plántulas se autofecundaron y produjeron semillas fértiles (Sim *et al.*, 2007). La floración *in vitro* puede ser inducida por estrés (ácido abscísico), adición de complejos orgánicos (como el homogenizado de plátano; concentración de azúcares y nutrientes, fotoperiodo y temperatura, entre otros factores. Las plántulas de *Psychomorchis pusilla* son capaces de desarrollar inflorescencias en oscuridad (Vaz *et al.*, 2004); en la orquídea mexicana *Barkeria shoemakeri* la concentración de azúcar estimula la floración de las microplántulas (Figura 3). La floración *in vitro* puede facilitar la evaluación de progenies procedentes de cruces intra o interespecíficas, y de esta manera reducir los costos



Figura 3. Micropropagación de *Barkeria shoemakeri*. A) Inflorescencia de *B. shoemakeri*, orquídea bajo protección especial. B) Siembra. C) Germinación de semillas. D) Subcultivo. E y F) Alargamiento de plántulas. G) Floración *in vitro* H) Aclimatación.

de reactivos, mano de obra y espacio en el laboratorio durante el desarrollo de programas de mejoramiento genético. Además, las plántulas en miniatura con flores incrementan su valor comercial y pueden ofrecerse como regalos o decoración (Sudhakaran *et al.*, 2006). La capacidad de controlar la floración *in vitro* también es importante para estudiar los mecanismos moleculares y genéticos de la inducción floral (Teixeira Da Silva *et al.*, 2014).

Estudios sobre la fisiología de las plántulas cultivadas *in vitro*

Las técnicas de cultivo *in vitro* también han permitido estudiar algunos factores ambientales que afectan el desarrollo de estas especies, principalmente el efecto de la intensidad y calidad de la luz. Durante el cultivo *in vitro* de *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum* se documentó que las fuentes de iluminación que emiten la menor cantidad de radiación en la región roja (luz blanca fluorescente y LEDs blancos) promueven el enraizamiento de las plántulas. La inhibición de la rizogénesis puede estar asociada con un aumento en la emisión de luz azul de los espectros (Murillo *et al.*, 2016). La luz LED roja incrementa el peso fresco y seco de raíces de plántulas de *Paphiopedilum* en comparación con la luz blanca fluorescente y la azul (Lee *et al.*, 2011), y aumenta el peso fresco y seco de brotes en *Dendrobium*

officinale (Lin *et al.*, 2011). Mientras que la combinación con luz azul aumentó la acumulación de biomasa en PLBS de *Oncidium* (Mengxi *et al.*, 2011). Esto indica que la respuesta de las plantas a la calidad de luz cambia entre especies, su etapa de desarrollo, y se necesita estudiar su efecto en cada especie para lograr determinados propósitos, tales como, promover o inhibir brotes, raíces, bulbos y controlar floración (Kim *et al.*, 2004; Poudel *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Las técnicas de cultivo *in vitro*, desde sus inicios, han contribuido a la conservación de los recursos genéticos de las orquídeas. Con la micropropagación ha sido posible la multiplicación masiva de especies raras o amenazadas con fines de preservación e intercambio de germoplasma. El desarrollo de protocolos de conservación a mediano y largo plazo de semillas y explantes vegetativos ofrece la posibilidad de resguardar genotipos nativos valiosos o individuos derivados de programas de mejoramiento genético. Actualmente las técnicas de cultivo *in vitro* facilitan la ejecución de estudios moleculares y genéticos para conocer los factores que afectan el desarrollo de estas especies en su hábitat natural.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Morales M.A., López-Escamilla A.L. 2013. Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación ex situ. Estudios Científicos en el Estado de Hidalgo y Zonas Aledañas.
- Arditti J. 2008. Micropropagation of orchids, 2nd edn. Blackwell, Cambridge.
- Arditti J., Ghani A. K. A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytologist 146(3): 569-569.

- Billard C. E., Dalzotto C. A., Lallana V. H. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica* 38:145-157.
- Engelmann F., González-Arno M. T. 2013. Introducción a la conservación *in situ* de los recursos genéticos vegetales. En: González Arno M., y Engelman F. Crioconservación de Plantas en América Latina y el Caribe, 25-35 (No. IICA F30-52). Universidad Veracruzana (México).
- Francisco-Nava J. J., Jiménez-Aparicio A. R., De Jesús-Sánchez A., Arenas-Ocampo M. L., Ventura-Zapata E., Evangelista-Lozano S. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* RCHB. f. generadas *in vitro*. *Polibotánica* 32:107-117.
- Galdiano R. F. Jr., De Macedo L. E. G., Vendrame W. A. 2013. Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium fleuwosum* Sims. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 114:139-148.
- Hu W. H., Yang Y. H., Liaw S. I., Chang C. 2013. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla forosana* (Hayata) Schltr. by vitrification. *Botanical Studies* 54:33.
- Irawati. 2013. Conservation of orchids the gems of the tropics. En: Normah M. N. Chin H. F. y Reed B. M. Eds. Conservation of Tropical Plant Species. Springer Science & Business Media.
- Islam S. S., Islam T., Bhattacharjee B., Mondal T. K., Subramaniam S. 2015. *In vitro* pseudobulb based micropropagation for mass development of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 27(6): 469-474.
- Kerbaux G. 1984. *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones (Orchidaceae). *Plant Science Letters* 35: 73-55.
- Khoddamzadeh A. A., Sinniah U. R., Midhzar P. L., Kadir M. A., Kadzimin S. B., Mahmood M. 2011. Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107:471-481.
- Kim S. J., Hahn E. J., Heo J. W., Paek K. Y. 2004. Effects of LED on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Sci. Hort.* 101: 143-151.
- Kulus D., Zalewska M. 2014. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species-A review. *Scientific Horticulture* 168: 88-107.
- Lee E. H. E., Laguna A., Murguía J., Iglesias-Andreu L., García B., Escobedo D., Martínez Y. M., Barredo F. A., Santana N. 2010. Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(4):323- 332.
- Lee Y. G., Popova E., Cui H. Y., Kim H. H., Park S. U., Bae C. H., Lee S. C., Engelmann F. 2011. Improved cryopreservation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using droplet-vitrification. *Cryo Letters* 32(6): 486-497.
- Lin Y., Li J., Li B., He T., Chun Z. 2011. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 105: 329-335.
- Mengxi L., Zhigang X., Yang Y., Yijie F. 2011. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106: 1-10.
- Mohanty P., Das M. C., Kumaria S., Tandon P. 2012. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 109:297-305.
- Mohanty P., Das M. C., Kumaria S., Tandon P. 2013. Cryopreservation of pharmaceutically important orchid *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl., using vitrification based method. *Acta Physiology Plantarum* 35:1373-1379.
- Murillo T. M. M. 2016. Desarrollo *in vitro* de microplantas de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* iluminadas con diodos emisores de luz (LEDs). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 123 p.
- Neto N. B. M., Custódio C. C. 2005. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. *Selbyana* 316-317.
- Poudel P. R., Kataoka I., Mochioka R. 2008. Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92: 147-153.
- Pritchard H. W., Seaton P. T. 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana* 89-104.
- Romero-Tirado R., Luna-Rosales B. S., Barba-Álvarez A. 2007. Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. *Lankesteriana* 7(1-2):353-356.
- Salazar G. A. 2013. Two additions to the Mexican Orchid flora. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:378-380.
- Sim G.E., Loh C.S., Goh C. J. 2007. High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium Madame Thong-In* (Orchidaceae). *Plant Cell Reports* 26, 383-93.
- Sudhakaran S., Teixeira da Silva JA., Sreeramanan S. 2006. Test tube bouquets - *in vitro* flowering. En: Teixeira da Silva JA. Ed. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and Topical Issues (1st edn, Vol. II), 336-346. Isleworth, UK: Global Science Books, Ltd.,
- Teixeira da Silva J. A., Kerbaux G. B., Zeng S. Chen Z., Duan J. 2014. *In vitro* flowering of orchids. *Critical reviews in biotechnology* 34(1): 56-76.
- Tsiftsis S., Tsiripidis I., Karagiannakidou V. 2009. Identifying areas of high importance for orchid conservation in east Macedonia (NE Greece). *Biodiversity and conservation* 18(7): 1765-1780.
- Vaz A. P. A., Rita de Cássia L., Kerbaux G. B. 2004. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(5): 411-415.
- Verma J., Sharma K., Thakur K., Sembi J. K., Vij S. P. 2014. Study on seed morphology of some threatened Western Himalayan orchids. *Turkish Journal of Botany* 38: 234-251.
- Wang G., Xu Z., Chia, T. F., Chua N. H. 1997. *In vitro* flowering of *Dendrobium candidum*. *Science in China Series C: Life Sciences* 40(1): 35-42.