

Germinación y desarrollo inicial de *Eulophia alta* (L.) Fawcett et Rendle "in vitro".

Emma Grillo, Esperanza Peña y Dalia Pérez
Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

RESUMEN

Se probaron diferentes concentraciones de sacarosa, en combinación con variaciones en el período de iluminación, sobre la germinación y desarrollo inicial de las semillas de *Eulophia alta*. Se discuten los diferentes resultados obtenidos en tres fases experimentales. Se evalúan y se discuten diferentes vías para la germinación masiva de *Eulophia alta* "in vitro".

ABSTRACT

Different concentrations of sucrose combined with variations in light periods were tested in *Eulophia alta* seed germination. Results obtained in three different phases of the experiments are given and discussed. Evaluation of the different ways for obtaining masive seed germination of *Eulophia alta* "in vitro" are given.

INTRODUCCIÓN

La obtención de plántulas de orquídeas en medios estériles a partir de semillas o del conocido "cultivo de meristemos", constituye la vía actual más utilizada en este grupo de plantas, lo cual ha sido abordado en múltiples publicaciones desde principios del presente siglo. Estos trabajos han reflejado la especificidad de medios de cultivo, condiciones de luz, temperatura y humedad, así como las características de la fuente vegetal (Kundson, 1922; Knud

son, 1925; Noggle and Wynd, 1943; Curtis, 1943; Alberts, 1953; Harvais and Hadley, 1967; Arditti, 1967; Tyson, 1970; Ball, Arditti and Churchill, 1971; Ernst, 1974; Ernst, 1975; Saulea, 1976; Allenberg, 1976; Dalla and Laneri, 1977; Rao, 1977; Reyburn, 1978; Stewart and Button, 1978; Flamée, 1978).

En Cuba se realizan estudios en la germinación de Orchidaceae "in vitro" desde 1978 (González, comunicación personal) en que se obtuvie-

ron masivamente plántulas de *Spathoglothis plicata*. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas a orquídeas cubanas, no aparece publicada hasta 1985 en que se reporta la germinación masiva de algunas especies epífitas y terrestres del Jardín Botánico Nacional entre las cuales muchas son cubanas (Grillo, Peña y Pérez, 1985). En este trabajo se utilizó el medio de Knudson C para la germinación de semillas procedentes de cápsulas maduras abiertas o cerradas de manera exitosa, aunque no puede inferirse que los resultados en el tiempo de germinación sean los óptimos para cada especie.

En la germinación de orquídeas "in vitro" los azúcares constituyen probablemente uno de los componentes más importantes a tener en cuenta en los medios de cultivo. Mucho de los estudios realizados en este sentido tienen su base en la simbiosis, que en condiciones naturales se produce entre el hongo y la orquídea. Actualmente existen numerosos trabajos que reflejan variaciones en los tipos y concentraciones de azúcares en distintas especies (Smith, 1966; Ernst, 1967; Arditti, 1967; Freson, 1969; Ernst, Arditti and Healey, 1971; Smith, 1973).

Por otra parte, existen investigaciones en las que se hace referencia a las condiciones de iluminación en la germinación de especies de orquídeas en medios estériles (Murashige, 1974; Donald, Krizek and Lawson, 1974; Reyburn, 1978; Richter 1982).

En general se acepta que la germinación no se favorece en ausencia de luz con excepción de algunas especies terrestres (Murashige, 1974; Richter, 1982). En este sentido se ha podido obtener germinación masiva de varias especies de orquídeas utilizando luz blanca, continua de poca intensidad (Grillo, Peña y Pérez, 1985).

En el presente trabajo se reportan los resultados obtenidos en la germinación y el desarrollo inicial "in vitro" de *Eulophia alta* (L.) Fawcett et Rendle, haciendo variaciones en las concentraciones de sacarosa utilizadas en el medio Knudson C (Knudson, 1922) y en las condiciones de iluminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una cápsula madura cerrada de la especie *Eulophia alta* (L.) Fawcett et Rendle, procedente de plantas cultivadas en los umbráculos del Jardín Botánico Nacional en el mes de febrero de 1984.

El material se esterilizó siguiendo el mismo método reportado antes para la utilización de cápsulas cerradas (Grillo, Peña y Pérez, 1985). Seguidamente las semillas se homogenizaron sobre papel de filtro estéril y se llevó a cabo la inoculación de las mismas con un asa de platino estéril sobre el medio nutritivo en plano inclinado. Se sembraron 240 tubos los cuales se mantuvieron a un rango de temperatura que osciló diariamente entre 23°C y 28°C.

Se realizaron cuatro tratamientos de 60 inóculos en los que se varió la concentración de sacarosa al medio Knudson C (Knudson, 1922): 1%, 2%, 3% y 4% de sacarosa.

Se hicieron variaciones en la iluminación después de mantener todos los cultivos en condiciones de luz blanca artificial continua y difusa durante seis semanas, lo cual constituyó una primera fase. A continuación sólo la mitad de los cultivos de cada tratamiento fueron transferidos a condiciones de oscuridad total durante seis semanas más, manteniendo el resto en las mismas condiciones de la primera fase; siendo esta, la segunda fase de la experiencia. En una tercera fase todo los tubos estuvieron en las mismas condiciones de iluminación que en la primera fase, durante dos semanas.

Se realizaron las siguientes evaluaciones cualitativas al finalizar cada fase:

- Estadio 1: Cambio de color a verde de las semillas del inóculo.
- Estadio 2: Formación de cuerpos protocormales.
- Estadio 3: Formación de plántulas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la primera fase del presente estudio no se produjo germinación independientemente de la concentración de sacarosa adicionada al medio de cultivo, de lo que puede inferirse que el tiempo de germina-

ción para esta especie es mayor de seis semanas cuando las semillas mantenidas "in vitro" están sometidas a iluminación blanca artificial y difusa. No puede descartarse la posibilidad de que en esta especie terrestre, la germinación se vea favorecida antes de las seis semanas en ausencia de luz, como ha ocurrido en otras especies terrestres estudiadas (Murashige, 1974; Richter, 1982). De ocurrir esto sería interesante conocer si las concentraciones de azúcares se relacionan al tiempo de germinación en ausencia de luz y cuál resultaría la óptima para esta especie.

Los resultados obtenidos en la segunda fase se reflejan en la tabla I.

ción intermedia que posiblemente hubiera evidenciado ligeras diferencias en el paso del estadio 1 al estadio 2.

Los resultados obtenidos en oscuridad, sin embargo, reflejan una menor especificidad por la concentración de sacarosa. Por otra parte se evidencia que en concentraciones bajas (1 % ó 2 %) el desarrollo a la oscuridad resulta retrasado con relación al desarrollo a la luz, mientras que la utilización de concentraciones mayores favorece el desarrollo como ocurre al 3% e inclusive promueve la germinación de semillas que en el mismo tiempo no germinan a la luz.

Aunque en general se plantean

Tabla I. Germinación de *Eulophia alta* (L.) Fawcett et Rendle a la luz y oscuridad en medios de cultivo de distintas concentraciones de sacarosa en la segunda fase de cultivo. Los estadios del proceso se definen como: 1, cambio de color a verde; 2, formación de protocormos; y 3, formación de plántulas.

[Sacarosa] en %	ILUMINACIÓN	
	LUZ	OSCURIDAD
1	Estadio 2 masivo	Estadio 1 masivo e inicio Estadio 2
2	Estadio 2 masivo	Estadio 1 masivo e inicio Estadio 2
3	Inicio del Estadio 1	Coexistencia de Estadio 1 y Estadio 2 en sus inicios.
4	-	Coexistencia de Estadio 1 y Estadio 2 en sus inicios.

Del análisis de los inóculos que se mantuvieron en las mismas condiciones que en la fase 1 se evidencia que al finalizar la fase 2 existe una relación inversa entre las concentraciones de sacarosa y el estadio alcanzado por el inóculo. En el caso de la adición de 1% ó 2% de sacarosa, que constituyen las respuestas más rápidas, hubiera sido interesante la realización de una evalua-

los requerimientos de luz en la germinación de semillas de orquídeas los resultados obtenidos en *Eulophia alta* ponen de manifiesto que esto no siempre se cumple y concuerdan con los obtenidos por otros autores en especies de los géneros: *Cypripedium*, *Barlia*, *Coeloglossum*, *Dactylorhiza*, *Gymnadenia*, *Orchis* y *Platanthera* (Richter, 1982).

En la tabla II se expresan los

resultados de la tercera fase. Resulta interesante que los cultivos que no fueron sometidos a ausencia de luz durante la fase 2 se comportan de diferentes maneras. A bajas concentraciones de sacarosa (1 % y 2 %) continúa el desarrollo hasta la formación de plántulas. Sin embargo, se observa que al 3 % no hay formación de protocormos después de 14 semanas en cultivo, como tampoco ocurre el cambio de coloración de las semillas en este tiempo cuando se utiliza la sacarosa al 4%. De esto se desprende que en las condiciones de iluminación empleadas no es recomendable la utilización de sacarosa a concentraciones superiores al 2 % por cuanto se inhibe la germinación y el desarrollo inicial en esta especie. Sin embargo pueden usarse exitosamente concentraciones menores de azúcar a la referida en

el medio Knudson C (Knudson, 1922) con iguales resultados.

Los resultados obtenidos al concluir la tercera fase (a la luz) del desarrollo de los inóculos que fueron sometidos a condiciones de oscuridad durante seis semanas a bajas concentraciones 1% y 2%, están contenidos en la tabla II. Se evidencia que continúa el desarrollo hasta la formación de plántulas y a las mayores concentraciones las condiciones aplicadas en la segunda fase parecen haber influido de manera determinante en el rápido ritmo de desarrollo hasta el estadio de plántula lográndose los mismos resultados finales que con la utilización de bajas concentraciones, los cuales son comparables con el desarrollo obtenido con luz blanca artificial continua y difusa, con bajas concentraciones.

Tabla II. Germinación y desarrollo inicial de *Eulophia alta* (L.) Fawcett et Rendle a la luz al concluir la tercera fase.

Origen del Cultivo		Caracteres del total de los inóculos.
[Sacarosa]	Condiciones de LUZ	
1 %	LUZ	Estadio 2 masivo e inicio Estadio 3.
1 %	OSCURIDAD	Estadio 1 masivo e inicio Estadio 2 y Estadio 3.
2 %	LUZ	Estadio 2 masivo e inicio Estadio 3.
2 %	OSCURIDAD	Estadio 1 masivo e inicio Estadio 2 y Estadio 3.
3 %	LUZ	Inicio Estadio 1.
3 %	OSCURIDAD	Estadio 1 masivo e inicios Estadio 2 y Estadio 3.
4 %	LUZ	- - -
4 %	OSCURIDAD	Estadio 1 masivo e inicios Estadio 2 y Estadio 3.

En general de los resultados obtenidos podemos concluir:

- Las semillas de *Eulophia alta* no germinan antes de las seis semanas, Al menos para nuestras condiciones de cultivo.
- Después de 14 semanas de cultivo pueden obtenerse plántulas con luz continua blanca artificial y difusa, cuando la concentración de sacarosa es al 1 % y al 2 % y cuando lo es del 1 % al 4 % con oscuridad intermedia durante seis semanas.
- Concentraciones superiores al 2 % inhiben la germinación y el desarrollo inicial para el uso de luz continua blanca artificial y difusa.
- La ausencia de luz, al menos en la fase utilizada, favorece de manera determinante la germinación y desarrollo de plántulas independiente de la concentración de sacarosa utilizada, por lo menos en ese rango.
- Se requiere un estudio minucioso de la efectividad de la ausencia de luz en la germinación y desarrollo inicial de *Eulophia alta*, utilizando medio Knudson C con sacarosa al 1 % con el objetivo de la optimización del medio y del fluido eléctrico.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, A.A. (1953)
Use of fish emulsion for the germination of orchid seed. *Orchid J.* 2 pág. 464-466.
- Allenberg, H. (1976)
Notizen zur keimung, meristemkultur und regeneration von endorchideen. *Die Orchidee* 27 (1) pág. 28-31.
- Arditti, J. (1967)
Factor's affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review* 33 (1) pág. 1-97.
- Ball, E.A., J.Arditti and M.E.Churchill (1971)
Clonal propagation of orchids from leaf tips. *Orchid Rev.* 79 pág. 281-288.
- Curtis, J.T. (1943)
Germination and seedling development L. *Am. J. Bot.* 30 pág. 199-206.
- Dalla, R.M. et U. Laneri (1977)
Modification of nutrient solutions for germination and growth "*in vitro*" of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. *Am. Orch. Soc. Bull.* 46 (9) pág. 813-820.
- Donald, T., Krizek et R.Lawson (1974)
Acelerated growth of *Cattleya* and *Phalaenopsis* under controlled environment condition *Am. Orch. Soc. Bull.* 43 (6) pág. 503-509.
- Ernst, R. (1967)
Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. *Am. Orch. Soc. Bull* 36, pág. 1068.
- Ernst, R.; J.Arditti and P.L.Healey (1971)
Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *Am. J. Bot.* 58 pág. 827.
- Ernst, R. (1974)
The use of Activated Charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. *Am. Orch. Soc. Bull.* 43 (1) pág. 35-38.
- Ernst, R. (1975)
Studies in asymbiotic culture of orchids *Am. Orch. Soc. Bull.* 44 (1) pág. 12-18.
- Flamée, M. (1978)
Influence of selected Media and supplements of the germination and growth of *Paphiopedilum* seedlings. *Am. Orch. Soc. Bull.* 47 (5) pág. 419-423.
- Freson, R. (1969)
Action du glucose sur des protocormes de *Cymbidium Sw.* cultivés "*in vitro*" *Bulletin de la Societé royale de Botanique de Belgique.* Tomo 102, pág. 205-209.
- Grillo, E.; E.Peña y D.Pérez (1985)
Germinación "*in vitro*" de algunas especies de Orquídeas en el Jardín Botánico Nacional. *Vol. VI, 3, 1985 pág.95*

- Harvais, G. et G.Hadley (1967)
The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist* 66 pág. 217-230.
- Knudson, L. (1922)
Non symbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 73 (1) pág. 1-25.
- Knudson, L. (1925)
Physiological study of the symbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 79 (4) pág. 345-379.
- Murashige, T. (1974)
Plant propagation through tissue cultures *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25 pág. 135-166.
- Noggle, G.R. and F.L.Wynd (1943)
Effects of vitamins on germination and growth of orchids. *Bot. Gaz.* 104 (3) pág. 455-459.
- Rao, A.N. (1977)
Tissue culture in the Orchid Industry. En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. Ed. Springer-Verlag, Berlin Cap. I. Art. 3 pág. 44-68.
- Reyburn, A.N. (1978)
The effects of pH on the expression of darkness. Requiring dormancy in seeds of *Cypripedium reginae* Walt. *Am. Orch. Soc. Bull.* 47 (9) pág. 798-802.
- Richter, W. (1982)
Orchideen pflegen vermehren, Züchten. Neumann Verlag. Leipzig Radebeul.
- Sauleda, R.P. (1976)
Harvesting times of orchid seeds capsules for the green pod cultures process. *Am. Orch. Soc. Bull.* 45 (4) pág. 305-309.
- Smith, S.E. (1966)
Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist* 65 pág. 488.
- Smith, S.E. (1973)
Asymbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin *New Phytologist* 73 (3) pág. 497-499.
- Stewart, J. et J. Button (1978)
Development of callus and plantlets from *Epidendrum* root tips cultured in vitro. *Am. Orch. Soc. Bull.* 47 (7) pág. 607-612.
- Tyson, R. (1970)
Home Orchid Growing 3th Ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York, Chap. 9 pág. 91-114.

Recibido: 15 de julio de 1985.