

Influencia de la sacarosa en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl.

Influence of sucrose on in vitro germination of Cattleya maxima Lindl

Víctor Eras-Guamán¹, Ana Robles-Lara², Magaly Yaguana-Arévalo¹ y Darlin Gonzalez-Zaruma^{1,*}

¹ Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador

² Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador

* Autor para correspondencia: darlin.gonzalez@unl.edu.ec

Fecha de recepción del manuscrito: 06/12/2023 Fecha de aceptación del manuscrito: 12/01/2024 Fecha de publicación: 30/06/2024

Resumen—La familia Orchidaceae tienen gran importancia ornamental, por la belleza de sus flores, destacándose *Cattleya maxima* Lindl., como una especie de alta comercialización, ya que presenta flores grandes de colores vistosos muy atractivos. La especie se encuentra amenazada por la extracción indiscriminada, destrucción del hábitat, cambio climático, limitada producción de cápsulas y una baja tasa de germinación. Debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica, bajo condiciones *in vitro*. El objetivo del presente estudio fue contribuir a generar información científica, relacionada con la influencia de la sacarosa, en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *C. maxima*, a partir de cápsulas fisiológicamente maduras, obtenidas de una colección de germoplasma, se obtuvo las semillas y bajo condiciones asépticas, fueron inoculadas *in vitro* en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), suplementado con mio-inositol, tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, agua de coco, carbón activado, agar; y, en cuatro concentraciones de sacarosa (tratamientos). La germinación asimbiótica de las semillas probando diferentes concentraciones de sacarosa, registró altos porcentajes de germinación; así, el T0 (0 g L⁻¹) con 91 %, T1 (20 g L⁻¹) con 87 %, T2 (30 g L⁻¹) con 86 % y T3 (40 g L⁻¹) con 74 %. La concentración de sacarosa no influyó en la germinación *in vitro*, sin embargo se puede colegir que la viabilidad de las semillas y la composición química del medio de cultivo Knudson C (KC-1946) presentaron condiciones favorables, para la germinación asimbiótica de *Cattleya maxima*.

Palabras clave—Orquídeas, Cápsulas, Germinación *In vitro*, Conservación.

Abstract—The Orchidaceae family has great ornamental importance, due to the beauty of its flowers, with *Cattleya maxima* Lindl., standing out as a highly commercialized species, since it has large flowers and very attractive bright colors. The species is threatened by indiscriminate extraction, destruction of natural habitat, climate change and limited capsule production and a low germination rate. Due to orchid seeds' difficulty in germinating naturally, asymbiotic germination methodologies have been developed under *in vitro* conditions. Therefore, the objective of the present study was to contribute to generating scientific information related to the influence of sucrose on the *in vitro* asymbiotic germination of *C. maxima* seeds, from physiologically mature capsules, obtained from a germplasm collection, the seeds were obtained and under aseptic conditions, they were inoculated *in vitro* in the Knudson-C (1946) culture medium, supplemented with myo-inositol, thiamine, pyridoxine, nicotinic acid, coconut water, activated carbon, agar; and, in four sucrose concentrations (treatments). The asymbiotic germination of the seeds, testing different concentrations of sucrose, recorded high germination percentages; Thus, T0 (0 g L⁻¹) with 91 %, T1 (20 g L⁻¹) with 87 %, T2 (30 g L⁻¹) with 86 % and T3 (40 g L⁻¹) with 74 %. The sucrose concentration did not influence *in vitro* germination, however it can be deduced that the viability of the seeds and the chemical composition of the Knudson C (KC-1946) culture medium presented favorable conditions for the asymbiotic germination of *Cattleya maxima*.

Keywords—Orchids, capsules, *In vitro* germination, Conservation, Micro propagation.

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, dentro de la riqueza natural, las orquídeas es la familia que aporta con el mayor número de especies al Fito-endemismo, pues un tercio de las plantas endémicas del Ecuador son orquídeas (Fernandez et al., 2018). *Cattleya* es un género de orquídea perteneciente a la flora sil-

vestre Sudamericana, originario de la región amazónica de Ecuador y distribuido desde el sur de Costa Rica hasta Argentina, contiene 42 especies y una gran variedad de híbridos que encuentran distribuidos en bosques húmedos, que están dentro de las condiciones para el cultivo y desarrollo (Dodson, 2004). Dada la importancia ornamental por la belleza de

las flores, *Cattleya* es un género de alta comercialización y agrupa a millares de híbridos, que presentan flores grandes y de colores vistosos muy atractivos (Rodríguez *et al.*, 2015).

Sin embargo, las orquídeas presentan factores intrínsecos que limitan su propagación sexual y la variación genética que en ellas se puede presentar. Estos factores están relacionados con el tamaño de las semillas y escasas reservas alimenticias en el embrión, lo que las lleva a establecer asociaciones simbióticas, principalmente con hongos micorrízicos, para lograr la germinación (Pérez, 2016). Por lo tanto, las semillas de orquídeas necesitan ser colonizadas por hongos, generalmente del género *Rhizoctonia*, entablando una relación simbiótica denominada simbiosis micorrízica; estableciéndose así, un flujo de carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos, que contribuyen a la germinación simbiótica (Quintero, 2012).

Debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar *in vivo*, se han desarrollado estudios previos relacionados con metodologías de germinación asimbiótica *in vitro* y entre otros han demostrado que depende de los macro y micronutrientes de los diferentes medios de cultivo (Murashige & Skoog; Knudson C; Vacin & Went) y el efecto de la fuente de carbohidratos (fructosa, glucosa, dextrosa, sacarosa) en diferentes concentraciones (0, 15, 30 o 45 g L⁻¹); sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar; por tanto, es necesario investigar cual es el medio de cultivo de germinación adecuado para cada una de ellas (Ruíz *et al.*, 2008).

Por los antecedentes señalados, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la influencia de la sacarosa, en diferentes concentraciones, en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946) para la germinación de semillas de *C. maxima*, tomando en cuenta que está constituye la fuente de energía y carbono, para la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de cápsulas y preparación del medio de cultivo

El experimento se realizó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, de la Universidad Nacional de Loja, a partir de cápsulas fisiológicamente maduras y cerradas de *Cattleya maxima* (Fig. 1) obtenidas de una colección de germoplasma, ubicado en la parroquia Malacatos, Loja, Ecuador; las mismas fueron previamente lavadas externamente con una solución de detergente y agua corriente antes de ser llevadas a la cámara de flujo laminar, para su posterior inoculación *in vitro*.

El medio de cultivo utilizado estuvo conformado por las sales nutritivas de Knudson-C (KC, 1946), suplementado con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 0,5 mg L⁻¹ de tiamina (Vitamina B1) + 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina + 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico + 200 mg L⁻¹ de agua de coco + 2 g L⁻¹ de carbón activado y 5,8 g L⁻¹ de agar (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se ajustó el pH del medio de cultivo a 5,8 ± 0,2; y se distribuyó el medio en frascos de vidrio, tipo compota, a razón de 30 ml y se procedió a esterilizar en la autoclave, a una temperatura de 120 °C, una presión de 1,5 kg/cm² por 15 minutos (Tabla 1).

Para evaluar el efecto de la sacarosa en la germinación de semillas *in vitro*, se utilizaron los siguientes tratamientos (Tabla 1).



Fig. 1: Cápsulas fisiológicamente maduras de *Cattleya maxima* Lindl

Tabla 1: Descripción de los tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa, para evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya maxima* Lindl.

No.	Tratamientos	Concentración de sacarosa (mg L ⁻¹)
1	T0	0
2	T1	20
3	T2	30
4	T3	40

Aislamiento de las cápsulas e inoculación *in vitro* de semillas *Cattleya maxima* Lindl

En la cámara de flujo laminar se procedió a realizar el aislamiento de las cápsulas, para lo cual, se realizó la desinfección de las capsulas con alcohol al 70% por un minuto; posterior a ello, se realizó un enjuague con agua destilada estéril, a continuación se adicionó una solución de hipoclorito de sodio al 20% más tres gotas de Tween 80, durante 10 minutos; posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, para eliminar el exceso de la solución desinfectante, terminado el proceso de desinfección, las cápsulas quedaron listas para la extracción de semillas.

La extracción de semillas se realizó en la cámara de flujo laminar, con la ayuda de un bisturí y cerca del mechero bunsen, se abrieron longitudinalmente las valvas de las cápsulas, y se obtuvieron las semillas; las cuales, luego con la ayuda de una espátula, fueron inoculadas de forma superficial homogéneamente, sobre el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946) con diferentes niveles de sacarosa, en frascos de vidrio de 250 ml, que contenían 30 ml del medio de cultivo.

Incubación *in vitro* de las semillas

Se identificó cada frasco según el tratamiento y repetición, luego se procedió a ubicar en el cuarto de luces o de incubación, a una temperatura de 26 ± 2 °C, en un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 3 000 a 5 000 lux, por un tiempo de evaluación de 90 días (Fig. 2).

Diseño experimental

Para evaluar el efecto de las tres concentraciones de sacarosa en la germinación *in vitro* de semillas de *Cattleya ma-*

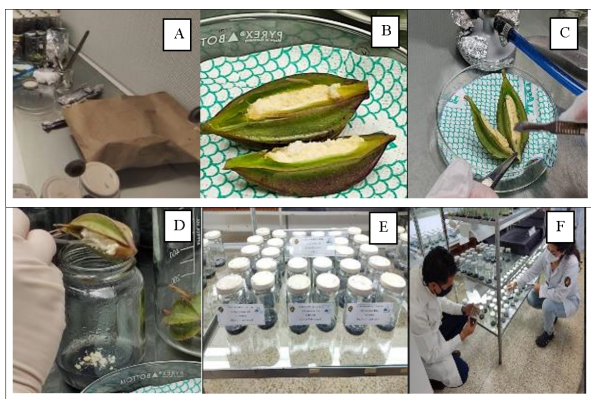


Fig. 2: Inoculación *in vitro* de las semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson-C (KC-1946), A) Materiales utilizados para la inoculación; B) Cápsulas fisiológicamente maduras; C) Apertura de cápsulas; D) Inoculación *in vitro* de semillas; E) Identificación de frascos; y, F) Incubación de los tratamientos.

xima Lindl., se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con cuatro tratamientos y tres repeticiones (Tabla 2). Las evaluaciones se realizaron, a partir del quinto día posterior a la siembra, con intervalos de cada 4 días, por un periodo de 90 días. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación, número de días a la germinación y porcentaje de germinación.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de normalidad de Lilliefors y prueba de Bartlett, para verificar la homogeneidad entre las varianzas de las diferentes variables; y, como las variables no alcanzaron la normalidad, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis al 5% de probabilidad, para comparar si las medianas de dos o más tratamientos son diferentes. Los procedimientos se realizaron en el software estadístico R (R Core Team, 2020).

RESULTADOS

Contaminación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson C (KC-1946), bajo tres concentraciones de sacarosa

La contaminación de las semillas de *C. maxima* se registró a partir del quinto día y se estabilizó a los setenta y siete días en los cuatro tratamientos (Fig. 3). Los menores porcentajes de contaminación se obtuvieron en los tratamientos T0 (0 g L⁻¹) con 6%, T2 (30 g L⁻¹) y T3 (40 g L⁻¹) con 11%, respectivamente; mientras que, el tratamiento T1 (20 g L⁻¹) obtuvo el mayor porcentaje de contaminación con 12%, lo cual, no fue estadísticamente significativo ($p=0,7248$). La contaminación se observó en los frascos o medio de cultivo y fue causada por bacterias y hongos.

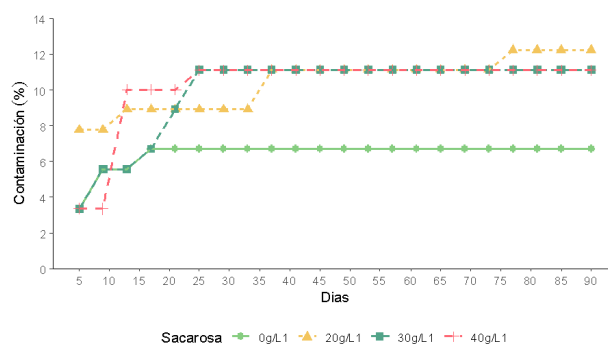


Fig. 3: Porcentaje de contaminación de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., a los 90 días de evaluación.

Germinación in vitro asimbiótica de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., en el medio de cultivo Knudson C (KC-1946), probando tres concentraciones de sacarosa

Número de días a la germinación

La germinación inició a partir de los 21 días de instalado el ensayo en los tres tratamientos con diferentes niveles de concentración de sacarosa (Fig. 4); así, en el T1 (20 g L⁻¹); T2 (30 g L⁻¹) y T3 (40 g L⁻¹); mientras que, en el T0 (0 g L⁻¹) se registró a los 25 días de evaluación; sin embargo, a medida que transcurrieron los días, la germinación experimentó un crecimiento ascendente en la curva acumulativa (Fig. 4).

Porcentaje de germinación

Las semillas de *Cattleya maxima* Lindl. en los cuatro tratamientos ensayados registraron altos porcentajes de germinación (>74%), destacándose el T0 con el 91%; sin embargo, no se evidenció diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$); (Fig. 4).

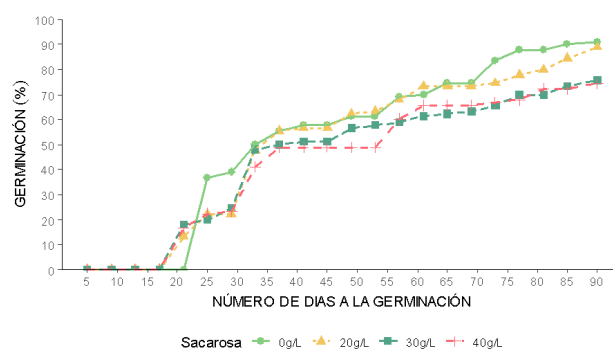


Fig. 4: Curva acumulativa del porcentaje de germinación *in vitro* asimbiótica de semillas de *Cattleya maxima* Lindl., a los 90 días de evaluación.

DISCUSIÓN

Influencia de tres concentraciones de sacarosa en la germinación in vitro asimbiótica de semillas de Cattleya maxima Lindl., en el medio de cultivo Knudson C (KC-1946).

Porcentaje de contaminación

El cultivo *in vitro* puede presentar contaminación de tejidos y originarse por microorganismos en la superficie del medio de cultivo y/o en los tejidos de los explantes (Ansori, 2015). La contaminación de semillas de *C. maxima*, registró un porcentaje inferior al 6%, lo que evidencia que el protocolo de desinfección utilizado en las cápsulas fue satisfactorio. Estos resultados son semejantes al protocolo para la misma especie, utilizado por Vilcherrez et al. (2020) en cuanto a los productos utilizados; sin embargo, diferente en cuanto a tiempo de exposición. Rahmawati y Dewi (2020) registraron porcentajes de contaminación en *C. skinneri* y *C. maxima* de 16,66%, esto debido a que las semillas fueron expuestas a métodos de desinfección, como inmersión en alcohol al 95% fuera de cámara, hipoclorito de sodio y la aplicación de enjuagues con agua destilada, lo que evidenció una disminución en los porcentajes de contaminación, la misma que en los dos casos fue causada por hongos y bacterias.

Número de días a la germinación

La germinación de *C. maxima* inició con el cambio de coloración de las semillas, de blanco a amarillo verdoso a los 21 días de instalado el ensayo, en los tres tratamientos con diferentes niveles de concentración de sacarosa (T1 con 20 g L⁻¹; T2 con 30 g L⁻¹ y T3 con 40 g L⁻¹), mientras que en el T0 con 0 g L⁻¹, la germinación inició a los 25 días de evaluación; estos resultados son similares a los reportados por Rodríguez et al. (2015) quienes registraron germinación a las tres semanas (21 días), utilizando en su ensayo 3% de sacarosa, para la germinación de las semillas de orquídea. Entre tanto, Vilcherrez et al. (2020) registraron germinación en *C. maxima* a los 33,67 días en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) suplementado con dos sustancias orgánicas complejas, agua de coco y harina de plátano.

El cambio de coloración de la semilla, de amarilla-crema, a estructuras de color verde, evidencian que el embrión se transforma en un cuerpo protocórmico; y, posteriormente, se evidencia el crecimiento de los primordios foliares en los protocormos (Rodríguez et al., 2015).

Porcentaje de germinación

La germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas, presenta ventajas comparativamente superiores a la tasa de germinación que se da en condiciones *in vivo* (Valencia, 2018). De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se registró porcentajes de germinación de semillas de *C. maxima* superiores a 74%; destacándose el T0 con el 91%; sin embargo, el T1 que contenía sacarosa, en una concentración de 20 g L⁻¹, obtuvo 87%. En general, las concentraciones de sacarosa presentaron una respuesta favorable en la germinación asimbiótica *in vitro* de las semillas; resultados que son superiores a los reportados por Chávez et al. (2014) quienes registraron en *Comporetia falcata* en me-

dio de cultivo Knudson C, un porcentaje de germinación de 71,5%; además, determinaron que uno de los mejores métodos para la germinación asimbiótica de semillas de *C. falcata*, fue el medio de cultivo Knudson C. Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación, son inferiores a los registrados por Rodríguez et al. (2015), quienes en su investigación cultivaron *in vitro* semillas de *C. aurantiaca*, las cuales tuvieron un porcentaje de germinación superiores al 90%, en los medios de cultivo de Hutner y Knudson C, con una concentración de 3% de sacarosa y Vilcherrez et al. (2020) con un 55,87% de viabilidad de las semillas de *C. maxima*, la tasa de germinación registrada fue del 97,12%, con adición del 2% de sacarosa en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

CONCLUSIONES

La concentración de sacarosa no influyó en la fase de germinación *in vitro*, sin embargo, se puede colegir que la viabilidad de las semillas y la composición química del medio de cultivo Knudson C (KC-1946) presentaron condiciones favorables, para la germinación asimbiótica de *Cattleya maxima*. El efecto de la sacarosa durante la germinación *in vitro* y el desarrollo temprano de protocormos/plántulas de *Cattleya maxima* genera nueva información sobre la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas como herramienta para la propagación comercial masiva e investigación primaria sobre la fisiología en medio de cultivo.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

conceptualización: VHEG y ACR; metodología: VHEG y MY; análisis formal: DGZ.; investigación: ACR; curación de datos: ACR, MG y DGZ; redacción — preparación del borrador original: VHEG, ACR y DGZ; redacción — revisión y edición: VHEG, MY y DGZ; supervisión: VHEG y MY. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito. Víctor Hugo Eras Guamán: VHEG. Ana Cristina Robles: ACR. Magaly Yaguana: MY. Darlin Gonzalez Zaruma: DGZ

FINANCIAMIENTO

El presente estudio fue financiado por el laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

REFERENCIAS

- Andrade, M., Vargas, J., Villegas, O., López, V., Guillen-Sánchez I., Alia-Tejagal, D., & Andrade-Rodríguez, M. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Cattleya (Brassolaelio cattleya) in vitro*. *Interciencia*, 40(8), 549–553.
- Ansori. (2015). Optimización de un medio de cultivo para la vitropropagación de *Vanilla planifolia* G. Jackson. *Paper Knowledge. Toward a Media History of Documents*, 3, 49–58.
- Chávez, H., Mosquera, A., & Otero, J. (2014). Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comporetia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas sim-

bióticas y asimbióticas. *Acta Agronomica*, 64(2), 125–133.
<https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>

Dodson CH. (2004). Native Ecuadorian Orchids, *Rodriguezia* to *Zygosepalum*. Dodson Trust. Quito 5.

Fernandez, D., Garzon, C., Yáñez, M., González, D., Mena, J., Tobar, F., & Freire, E. (2018). Orquídeas y Bromelias de la provincia de El Oro. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9).

Pérez, et al. (2016). Nativas como una contribución para la conservación ex situ contribution to ex situ conservation. 1–14.

Quintero. (2012). Rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels). *Acta Agronomica*, 61(1), 52–60.

Rahmawati, A., & Dewi, R. (2020). View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk. Pengaruh penggunaan pasta labu kuning (*Cucurbita moschata*) UNTUK substitusi tepung terigu dengan penambahan tepung angkak dalam pembuatan mie kering, 274–282.

Rodríguez, M., Vargas, J., Villegas, Ó. G., López, V., Guillen, D., & Alia, I. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Cattleya* (*Brassolaelio cattleya*) *in vitro*. *Interciencia*, 40(8), 549–553.

R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing.

Ruíz, B., Laguna, C., Iglesias, G., Damon, A., Marín, H., Azpíroz, R., & Moreno, M. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Phyton*, 77(964), 203–215.

Valencia. (2018). Universidad San Francisco de Quito USFQ Colegio de ciencias Biológicas y Ambientales. J. M. Pajares y J. P. Gisbert, 22(4), 20–41.

Vilcherrez, J., Rojas, C., Delgado, G. (2020). Micropropagation of *Cattleya maxima* J. Lindley in culture medium with banana flour and coconut water. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 10, 179–193.