



Citar como:

Téllez Mazzocco, D. y L. Casanova Pérez. 2014.
El cultivo de tejidos vegetales: herramienta para la
conservación de orquídeas amenazadas. CONABIO.
Biodiversitas, 117:13-16

EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

herramienta para la conservación de orquídeas amenazadas

DENISSE TÉLLEZ MAZZOCCO Y LORENA CASANOVA PÉREZ

Entre las familias botánicas con mayor número de especies se encuentra Orchidaceae, con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial.¹ Es una de las familias de angiospermas más numerosas, está ampliamente distribuida en el mundo y se puede encontrar en todos los ecosistemas con excepción de las regiones polares.² Orchidaceae ocupa el tercer lugar a nivel de familia en México, superada sólo por Asteraceae y Fabaceae, con alrededor de 170 géneros, de las cuales 444 especies son endémicas,³ es decir, no se encuentran en otro lugar del mundo. Los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz son los que tienen una mayor diversidad.⁴

En las orquídeas generalmente la flor tiene tres sépalos y tres pétalos, uno de los cuales, llamado labelo, es muy distinto a los demás y tiene la función atraer a los polinizadores, como abejas, mariposas y aves. Los órganos sexuales (pistilo y estambres) se encuentran unidos en una estructura denominada columna, mientras que las semillas se localizan en una cápsula. Las semillas son diminutas y encierran un embrión que al momento de germinar produce una masa de células llamada protocormo que, al estar expuesto a la luz, desarrolla hojas. Las semillas contienen pocas o ninguna reserva para llevar a cabo la germinación.⁵

Desde la antigüedad, en toda Europa, a las orquídeas se les atribuyeron cualidades afrodisíacas. Algunos historiadores mencionan que cuando los españoles conquistaron nuestro territorio, un gran número de ellas fue enviado a Europa para formar parte de colecciones de la corona y la nobleza. Posteriormente, países como Inglaterra y Holanda contribuyeron a descubrir y a difundir estas extraordinarias plantas en todo el mundo. Desde entonces, las orquídeas son admiradas y apreciadas no sólo por su belleza, sino también porque tienen gran importancia ornamental, medicinal y alimentaria.

En México, en algunas comunidades, los pobladores utilizan especies de orquídeas con fines medicinales para curar tumores y heridas, disentería y para tratar la tos, así como para la elaboración de coronas y ramilletes que adornan los altares en las festividades. De la especie *Vanilla planifolia* se obtiene la vainilla, un saborizante utilizado en diversas preparaciones culinarias⁶ y como esencia en la elaboración de perfumes.

Por desgracia, de acuerdo con la NOM-059-2010⁷ existen más de 100 especies de orquídeas cuya supervivencia se encuentra en distintos niveles de riesgo. El saqueo de ejemplares, la sobreexplotación, la contaminación y destrucción de hábitat, la eliminación de insectos polinizadores y el comercio ilegal han llevado a una reducción en las poblaciones naturales.^{8,9} A lo anterior habría que agregar los problemas de lento crecimiento y la baja tasa de germinación de algunas especies,¹⁰ por lo que es necesaria la simbiosis con hongos micorrízicos.¹¹

Actualmente la biotecnología vegetal aporta herramientas valiosas para la conservación de estas especies mediante la utilización del cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro*, en virtud de la gran cantidad de plantas que se obtienen como resultado del cultivo y al reducido material vegetal que se requiere,¹² además de que se realiza en condiciones libres de patógenos y en un espacio mínimo.

Cápsula con semillas
de la orquídea *Catasetum
integerrimum*.

Foto: © Eduardo Axel Recillas
Bautista





¿Cuál es el proceso de un cultivo *in vitro*?

Fase 0. Selección del material vegetal

El primer paso consiste en la selección de una planta donante de material vegetal (semillas, hojas, tallos, polen), a partir del cual se desarrollan individuos con iguales características y en grandes cantidades. La planta seleccionada debe encontrarse libre de enfermedades y haber recibido un adecuado programa de fertilización y nutrición. En el caso de las orquídeas el material vegetal más comúnmente utilizado son las semillas.

Fase 1. Establecimiento del cultivo

Es primordial evitar la proliferación de microorganismos que puedan afectar el desarrollo de las especies vegetales. Los microorganismos presentes en la superficie del material vegetal y las fallas en el procedimiento de cultivo en el laboratorio son las principales fuentes de contaminación. Para evitarla es necesario que los operadores realicen un lavado de manos y antebrazos con alcohol, además de utilizar máscaras y gorros protectores de nariz, boca y cabello.

Son frecuentes las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter* y *Agrobacterium* y de hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Neurospora* y *Fusarium*, que proliferan rápidamente, dañan los tejidos de las especies vegetales y consumen los nutrientes del medio de cultivo.

Para evitar la contaminación, las semillas de las orquídeas se desinfectan con compuestos químicos como alcohol y etanol. Después del tratamiento químico, son lavadas con agua destilada para retirar los restos del producto. Los medios de cultivo y los instrumentos son sometidos a una presión y temperatura elevadas, lo que ocasiona la muerte de los microorganismos en un equipo llamado autoclave.

Después de la desinfección, las semillas se colocan en un medio de cultivo compuesto por agua destilada y minerales que constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas. Estos compuestos son esenciales para el crecimiento y desarrollo, incluyendo los macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) y los micronutrientes (Fe, Co, Zn, B, Al, Mn, Mo y Cu). Como fuente de carbono comúnmente se utiliza la sacarosa.

También se adicionan reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citocininas, que desempeñan un papel muy importante. Las auxinas son responsables de la elongación celular y expansión de los tejidos, mientras que las citocininas estimulan la división celular y retardan el envejecimiento. En algunas especies vegetales no es necesario adicionar reguladores de crecimiento.

Se agregan vitaminas como el inositol, vitamina B1, riboflavina y biotina. Por último, se coloca el agar, un polisacárido derivado de un alga marina que se utiliza ampliamente como soporte sólido en dichos medios de cultivo. Algunos componentes pueden ser reemplazados por mezclas de sustancias, como extractos vegetales y de levaduras. La acidez en los medios de cultivo oscila entre los intervalos de 5-7.5.

Existen diversos medios de cultivo que varían de acuerdo con la concentración de los componentes; por ello, la elección del medio de cultivo dependerá de la especie vegetal a propagar debido a que algunas especies son sensibles a las altas concentraciones de estos componentes, mientras que otras las toleran. Generalmente para la propagación de orquídeas se utiliza el medio de cultivo denominado MS.^{13, 14, 15}

La colocación de las semillas en el medio de cultivo se realiza en una campana de flujo laminar, una cabina que tiene como función mantener el área de

Siembra de plántulas en medio de cultivo y posterior crecimiento y desarrollo de éstas en fase de incubación. Trasplante de las orquídeas obtenidas *in vitro* a suelo o sustrato inerte.

Foto: © Eduardo Axel Recillas Bautista



trabajo libre de partículas contaminantes que puedan acceder al cultivo vegetal. Debido a que el aire que se toma del exterior pasa a través de un filtro de poro muy fino se garantiza un ambiente libre de contaminación sobre la mesa donde se trabaja;¹⁶ es muy importante que se realice el mantenimiento de ésta.

Fase 2. Multiplicación

Después de la colocación del material vegetal en el medio de cultivo, viene el proceso de incubación donde las condiciones de temperatura, luz, humedad y fotoperiodo (alternancia de luz y oscuridad que utilizan las plantas para desarrollar sus funciones biológicas) se encuentran controladas, y con ello la obtención de una gran cantidad de plántulas.

En general para el proceso de incubación las semillas de las orquídeas se colocan bajo lámparas fluorescentes que brindan 2000 lux de iluminación con un fotoperiodo de dieciséis horas luz y una temperatura entre 25 y 30°C.¹⁴

El porcentaje de germinación de las semillas varía de acuerdo con la especie. La especie *Laelia albida* reporta un porcentaje de germinación de 70-90%,¹⁷ mientras que especies del género *Oncidium* una germinación de 100%.¹⁸ Las semillas contenidas en una cápsula de orquídea pueden ser numerosas (2-3 millones),¹⁰ lo que permite la obtención de una gran cantidad de plántulas. La adición de reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas frecuentemente estimulan el desarrollo de estas últimas.^{18, 19}

Fase 3. Enraizamiento

Las plántulas obtenidas en la fase de multiplicación son trasladadas a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento "que tiene como función es-

timular el desarrollo de raíces" o que sólo contenga auxinas. Algunos autores recomiendan para el enraizamiento de las orquídeas agregar agua de coco y transferir las plántulas a un medio de cultivo renovado.²⁰ El desarrollo de raíces vigorosas y en cantidad adecuada permitirá continuar con la última fase del cultivo de tejidos vegetales.

Fase 4. Aclimatación

Las plántulas obtenidas son trasplantadas a charolas utilizando suelo o algún sustrato inerte; posteriormente son colocadas en un invernadero donde sufrirán cambios que les permitirán adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Debido a que las plantas se han desarrollado en un sistema controlado, el periodo de adaptación al nuevo hábitat puede resultar complicado.

Al momento del trasplante, las raíces de las orquídeas deben lavarse cuidadosamente con agua destilada para retirar el agar del medio de cultivo y una vez limpias se les debe aplicar una dosis mínima de fungicida y enraizador. Cuando son trasplantadas a charolas, el sustrato a utilizar dependerá de la especie, pero generalmente se emplea corteza de pino, musgo, tezontle y coco picado. Es importante seleccionar sustratos que presenten una buena aireación y porosidad que permitirá que el agua de riego drene sin problemas.

Posterior al traspaso, las orquídeas deben cubrirse con un domo para evitar la exposición de las plantas a temperaturas extremas y la desecación. El domo se remueve parcialmente durante las dos semanas siguientes hasta que se retira. El riego debe realizarse por aspersión en intervalos de 2 a 3 días y debe controlarse para evitar una humedad elevada y la aparición de hongos.



De la especie *Vanilla planifolia* se obtiene la vainilla, un saborizante natural.

Foto: © www.orchidseed.com

Es importante realizar una fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, así como un óptimo control fitosanitario para impedir la aparición de infecciones bacterianas y fúngicas. De esta forma, las orquídeas crecerán hasta obtener la talla adecuada para ser transferidas al campo. Los cambios deben ser graduales con el propósito de minimizar el estrés y conseguir una mayor tasa de supervivencia de estas especies vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* es una herramienta invaluable para contrarrestar la pérdida de la biodiversidad de especies de orquídeas amenazadas y /o con poblaciones extremadamente reducidas,²¹ debido a que permite la obtención de una gran cantidad de plantas, además de contribuir a la germinación de semillas que en condiciones naturales es difícil.

Bibliografía

- ¹ Chase, M.W., J.V. Freudenstein, K.M. Cameron y R.L. Barrett. 2003. "DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification", en K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Kota Kinabalu, Natural History Publications, pp. 69-89.
- ² Taylor, D.L., T.D. Bruns, T.M. Szaro y S.A. Hodges. 2003. "Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexaletris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid", *American Journal of Botany* 90 (8):1168-1179.
- ³ Villaseñor. J.I. 2003. "Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México", *Interciencia* 28: 160-167; Soto, M.A., E. Hagsater, R. Jiménez, G.A. Salazar, R. Solano, R. Flores e I. Contreras. 2007. *Las orquídeas de México: catálogo digital*. México, Instituto Chinoín.
- ⁴ Soto-Arenas, M. y G. Salazar. 2004. "Orquídeas", en A. J. García Mendoza, M. de J. Ordoñez y M. Briones-Salas (eds.), *Biodiversidad de Oaxaca*. México, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México/Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza/World Wildlife Fund, pp. 271-295.
- ⁵ Singh., F. 1981. "Differential staining of orchid seeds for viability testing", *American Orchid Society Bulletin* 50: 416-418.

- ⁶ Hagsater, E., M.A. Soto Arenas, G.A. Salazar, R. Jiménez, M.A. López y R.L. Dressler. 2005. *Las orquídeas de México*. México, Instituto Chinoín.
- ⁷ Hossain, M.M. 2009. "Traditional therapeutic uses of some indigenous orchids of Bangladesh", *Medicinal Aromatic Plant Science Biotechnology* 3: 100-106.
- ⁸ SEMARNAT. 2010. "Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-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 de diciembre de 2010.
- ⁹ Yam, T.W., J. Chua, F. Tay y P. Ang. 2010. "Conservation of the native orchids through seedling culture and reintroduction – a Singapore experience", *Botanical Review* 76: 263-274.
- ¹⁰ Luan, V.Q., N.Q. Thien, D.V. Khiem y D.T. Nhut. 2006. "In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids", *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*. Ciudad Ho Chi Minh, Nong Lam University, 20-21 de octubre, pp. 175-177.
- ¹¹ Hadley, G. 1997. "Orchid mycorrhiza", en J. Arditti y A. M. Pridgeon (eds). *Orchid Biology: Reviews and perspective (2)*, Ithaca, Cornell University Press.
- ¹² Quiala, E., G. Montalvo y J. Matos. 2004. "Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas", *Biología Vegetal* 4: 195-199.
- ¹³ Escobar, G.F., G.P. Solano, I. Vázquez y L. Colinas. 2008. "Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* Lind., una orquídea amenazada y endémica de México", *Revista Chapingo Serie Horticultura* 3: 347-353.
- ¹⁴ Díaz., I. y R. Salgado. 2006. "Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación", *Biológicas* 8: 138-149.
- ¹⁵ Jiménez., V. y E. Guevara. 1996. "Propagación in vitro de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) mediante el cultivo de secciones de ejes florales después de la senescencia de las flores", *Agronomía Costarricense* 1: 75-79.
- ¹⁶ Pierik. R.L. 1989. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. México, Mundi-Prensa Libros.
- ¹⁷ Arditti J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. Nueva York, John Wiley and Sons.
- ¹⁸ Kalimuthu, K., R. Sentilkumar y S. Viyahakumar. 2007. "In vitro micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing dolls)", *African Journal of Biotechnology* 10: 1171-1174.
- ¹⁹ Alfaro, S., P. Tejada, R. Sánchez, C. Parimango, A. Santa, A. Vega y J. Chico. 2009. "Desarrollo in vitro de plántulas de *Epidendrum* (Orchidaceae) utilizando carbón activado y 6-Bencil amino purina (BAP)", *Rebiol* 29: 1-5.
- ²⁰ Arias, H.L., S.R. Santibañes, L. Dendooven, T.T. Ayora y M.F.A. Gutiérrez. 2003. "Efecto de agua de coco y homogenizados de jitomate y plátano sobre el crecimiento de la orquídea *Guaranthe skinneri* cultivada in vitro", *El Cromosoma* 3: 76-79.
- ²¹ Iriondo, A. 2001. "Conservación de Germoplasma de especies raras y amenazadas", *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales* 18: 1-21

* Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense. nis06@hotmail.com