

GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS

DE CATTLEYA (*Brassolaeliocattleya*) IN VITRO

María Andrade-Rodríguez, Jesús Vargas-Araujo, Oscar Gabriel Villegas-Torres, Víctor López-Martínez, Dagoberto Guillén-Sánchez e Irán Alia-Tejagal

RESUMEN

Brassolaeliocattleya es un híbrido de alto valor en el mercado por presentar flores grandes de colores vivos muy atractivos. La multiplicación de las orquídeas es más eficiente por germinación in vitro de semillas que por inducción de brotación axilar. Sin embargo, el medio nutritivo para el cultivo in vitro es variable en función de la especie a propagar. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del medio de cultivo en la propagación de *B. cattleya* por semilla, para elegir el más adecuado para multiplicación. Se prepararon siete medios de cultivo: Murashige y Skoog (1962; MS) al 100, 75, 50 y 25% de concentración de macro y micronutrientes, WPM modificado por Villegas et al. (1992; WPMm),

WPMm sustituyendo el molibdato de sodio por ácido molibdicó (WPMm1), y WPM sustituyendo el sulfato ferroso y EDTA de sodio por quelato de hierro (WPMm2). Sembradas las semillas, los frascos de cultivo se organizaron en diseño completamente al azar. Se registró porcentaje de germinación, y a los 90 días se evaluó el crecimiento inicial mediante altura de plántula, hojas y raíces por plántula, y longitud de raíz. El medio MS al 25 y 50% generaron el mayor porcentaje de germinación (85 y 82%, respectivamente); sin embargo, la plántulas tuvieron mejor crecimiento en el medio WPMm1, en el que la altura fue de 1,2cm y emitieron en promedio 3,5 hojas y 2,13 raíces.

Introducción

Las orquídeas tienen gran importancia ornamental por la belleza de sus flores. *Cattleya* L. es un género de alta comercialización, agrupa a millares de híbridos que presentan flores grandes y de colores vivos muy atractivos (Paula y Silva, 2004). La propagación in vitro es una técnica de importancia para la producción de orquídeas cuya multiplicación en forma natural es limitada por las características inherentes a las semillas; por ello, la micropropagación ha sido de gran utilidad en la industria de la producción de sus especies, híbridos y cultivares. Se ha observado que la tasa de multiplicación y con ello el rendimiento de plantas

depende en gran medida de la metodología de cultivo utilizada; la producción de cuerpos protocórmicos presenta rendimientos considerablemente superiores cuando se usan semillas que cuando se induce la brotación axilar, aunque en el cultivo de semillas se manifiesta variación (Huang, 1984).

La siembra asimbiótica de orquídea constituye una técnica relevante desde el punto de vista comercial y ecológico (Martini et al., 2001) y se ha realizado desde el inicio del siglo pasado, cuando Knudson (1922) descubrió la germinación en medio de cultivo aséptico. La formulación del medio de cultivo es esencial para la propagación in vitro dado que éste suministra los nutrientes necesarios

(minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento, etc.) para el desarrollo de la planta; el medio deberá prepararse con diferentes combinaciones de nutrientes de acuerdo con los requerimientos de cada especie (Faria et al., 2002).

El medio de cultivo usado para la germinación de semillas de orquídea es variable en función de la especie. Así, Faria et al. (2002) germinaron y cultivaron con éxito a *Cattleya walkeriana* en el medio de Murashige y Skoog (1962; MS) con la mitad de concentración de macronutrientes. Damon et al. (2004) cultivaron in vitro semillas de *C. aurantiaca*, las cuales tuvieron una tasa de germinación similar (91,3; 93,2; 92,12 y 91,9%) en los medios Hutner, Knudson C modificado, Dalla

Rosa y Laneri, y Knudson C. Por su parte, Schneiders et al. (2012) cultivaron in vitro semillas de *C. forbesii* en medio de cultivo MS y en medio MS adicionando 2,5g·l⁻¹ de carbón activado y observaron que tres días después de la inoculación de las semillas había ocurrido 45 y 90% de germinación en el medio MS y medio MS con carbón activado respectivamente.

La composición del medio de cultivo afecta la fisiología de los tejidos y órganos que se cultivan in vitro porque algunos elementos pueden ser tóxicos, como lo son el calcio y el sodio (Villegas et al., 1992). Los componentes que se incorporan para la preparación del medio modifican el potencial osmótico y por tanto el crecimiento de los cultivos.

PALABRAS CLAVE / Crecimiento de Plántulas / Germinación / Medios de Cultivo / Orquídea /

Recibido: 13/04/2014. Modificado: 26/06/2015. Aceptado: 29/06/2015.

María Andrade Rodríguez. Ingeniera Agrónoma, Universidad Autónoma de Chapingo (UACH), México. M.Cs. y D.Cs. en Genética, Colegio de Postgraduados (COLPOS), México. Profesora Investigadora, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), México. Dirección: Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM. Avenida Universidad 1001,

Colonia Chamilpa. C.P. 62209. Cuernavaca, Morelos, México. e-mail: maria.andrade@uaem.mx
Jesús Vargas Araujo. Ingeniero Hortícola y M.Cs. en Agropecuarias y Desarrollo Rural, y estudiante de doctorado, UAEM, México.

Oscar Gabriel Villegas Torres. Ingeniero Agrónomo, UACH, México. D.Cs. en Fisiología Vegetal, COLPOS, México.

Profesor Investigador, UAEM, México.

Víctor López Martínez. Ingeniero Agrónomo, UACH, México. M.Cs. y D.Cs. en Entomología y Acarología, COLPOS, México. Profesor Investigador, UAEM, México.

Dagoberto Guillén Sánchez. Ingeniero Agrónomo Parasitólogo, UACH, México. M.Cs. y D.Cs. en Fitopatología,

COLPOS, México. Profesor Investigador, UAEM, México.

Irán Alia Tejagal. Ingeniero Agrónomo Parasitólogo, UACH, México. M.Cs. y D.Cs. en Fitopatología, COLPOS, México. Profesor Investigador, UAEM, México.

SEED GERMINATION AND SEEDLINGS GROWTH OF CATTLEYA (*Brassolaeliocattleya*) IN VITRO

María Andrade-Rodríguez, Jesús Vargas-Araujo, Oscar Gabriel Villegas-Torres, Víctor López-Martínez, Dagoberto Guillen-Sánchez and Irán Alia-Tejagal

SUMMARY

Brassolaeliocattleya hybrid is a high market value plant because of its large, bright flowers of attractive colors. The multiplication of orchids is more efficient by in vitro seed germination than by axillary sprouting induction. However, the nutrient medium for the in vitro culture varies depending on the propagating species. Therefore, the aim of the present study was to assess the effect of culture medium in seed propagation of B. cattleya, in order to choose the most suitable one for multiplication. Seven culture media were prepared: Murashige and Skoog (1962; MS) at 100, 75, 50 and 25% concentration of macro and micronutrients, WPM modified by Villegas et al.

(1992; WPMm), WPMm substituting sodium molybdate, for molybdic acid (WPMm1), and WPM substituting ferrous sulphate and sodium EDTA for chelated iron (WPMm2). Culture flasks were seeded and organized by completely randomized design. The germination percentage was recorded and after 90 days of culture the initial growth was evaluated by seedling high, seedling leaves, roots per seedling and root length. MS medium at 25 and 50% concentration produced the greatest percentage of germination (85 and 82% respectively); however, the seedlings showed better growth in WPMm1, with 1.2cm height, 3.5 leaves and 2.13 roots.

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE CATTLEYA (*Brassolaeliocattleya*) IN VITRO

María Andrade-Rodríguez, Jesús Vargas-Araujo, Oscar Gabriel Villegas-Torres, Víctor López-Martínez, Dagoberto Guillen-Sánchez e Irán Alia-Tejagal

RESUMO

Brassolaeliocattleya é um híbrido de alto valor no mercado por apresentar flores grandes de cores vivas muito atrativas. A multiplicação das orquídeas é mais eficiente por germinação in vitro de sementes que por indução de brotação axilar. No entanto, o meio nutritivo para o cultivo in vitro é variável em função da espécie a ser propagada. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do meio de cultivo na propagação de B. cattleya por semente, para eleger o mais adequado para multiplicação. Prepararam-se sete meios de cultivo: Murashige e Skoog (1962; MS) em concentrações de 100%, 75%, 50% e 25% de macro e micronutrientes, WPM modificado por Villegas et al. (1992; WPMm),

WPMm substituindo o molibdato de sódio por ácido molibdico (WPMm1), e WPM substituindo o sulfato ferroso e EDTA de sódio por quelato ferroso (WPMm2). Plantadas as sementes, os vidros de cultivo foram organizados em desenho completamente aleatório. Registrou-se percentagem de germinação e, aos 90 dias foi avaliado o crescimento inicial mediante altura de plântula, folhas e raízes por plântula, e comprimento de raiz. O meio MS com 25 e 50% gerou a maior porcentagem de germinação (85 e 82%, respectivamente); no entanto, as plântulas tiveram melhor crescimento no meio WPMm1, em que a altura foi de 1,2cm e emitiram em média 3,5 folhas e 2,13 raízes.

La concentración total de las sales del medio de cultivo determina el potencial osmótico del medio, que se obtiene de la suma de los potenciales osmóticos de sus componentes, donde influyen no sólo los pesos sino también el grado de disociación de las sales que los constituyen; en la práctica el potencial osmótico se determina en forma directa en el medio de cultivo (Pierik, 1990).

La interacción del genotipo con el ambiente (medio de cultivo) también se pone de manifiesto en la germinación *in vitro* de semillas de orquídea, por lo cual el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del medio de cultivo en la propagación de *Brassolaeliocattleya* por semilla, para elegir el más adecuado para su multiplicación.

Materiales y Métodos

Se usó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962; MS) así como el medio WPM modificado por Villegas *et al.* (1992; WPMm). La composición de macro y micronutrientes del medio de cultivo varió en función del tratamiento (Tabla I) y fue suplementada con 100mg·l⁻¹ mioinositol, 1mg·l⁻¹ tiamina HCl, 1mg·l⁻¹ piridoxina HCl, 1mg·l⁻¹ niacina, 1mg·l⁻¹ ácido nicotínico, 1mg·l⁻¹ glicina, 3% de sacarosa; el pH se ajustó a 5,7 y se agregó 0,6% de agar (Merk) y 1,0g de carbón activado. El medio se sirvió en frascos de 100ml, colocando 20ml de medio de cultivo y se esterilizó durante 18min a 120°C y 1.5kg·cm⁻². Se determinó el potencial osmótico (Mpa) de los medios de cultivo con un osmómetro Löser Messtechnik tipo 6.

Se usó semilla madura de *Brassolaeliocattleya* 'Triumph coronation' x self, que tenía dos meses en almacenamiento a 4°C. Se pesaron 200mg de semillas y en la campana de flujo laminar se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,6% durante 10min y posteriormente se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas fueron suspendidas en 10ml de agua destilada estéril y la siembra se realizó dispensando 100µl de agua con semillas. Los frascos sembrados se colocaron en incubación en un ambiente con temperatura de 25 ±2°C, fotoperiodo de 16h luz, e intensidad luminosa de 29µE·m⁻²·s⁻¹.

El experimento fue desarrollado en un diseño completamente al azar para estudiar siete tratamientos de los

cuales se establecieron diez repeticiones. Se evaluó el porcentaje de germinación; a los 90 días de cultivo, el crecimiento inicial fue evaluado mediante altura de plântula, hojas por plântula, raíces por plântula y longitud de raíz.

Los datos obtenidos fueron estudiados mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias (Tukey, P≤0,05). Las variables evaluadas en conteos se transformaron con la función \sqrt{X} previo al análisis estadístico.

Resultados y Discusión

El análisis de varianza indicó que la composición del medio de cultivo afectó de manera altamente significativa (P≤0,01) la expresión de todas las variables evaluadas. Los coeficientes de variación fueron pequeños, con excepción

TABLA I
CONCENTRACIÓN DE MACRO Y MICRO NUTRIMENTOS DE SIETE
MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS
DE *Brassolaeliocattleya* 'TRIUMPHANT CORONATION'

Nutrientes	MS 100% (mg·l ⁻¹)	MS 75% (mg·l ⁻¹)	MS 50% (mg·l ⁻¹)	MS 25% (mg·l ⁻¹)	WPMm (mg·l ⁻¹)	WPMm1 (mg·l ⁻¹)	WPMm2 (mg·l ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650	1237,5	825	412,5	400	400	400
KNO ₃	1900	1425	950	475			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	277,5	185	92,5	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	127,5	85	42,5	170	170	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	330	220	110			
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O					695	695	695
Microelementos							
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	16,725	11,15	5,575	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6	6,45	4,3	2,15	8,6	8,6	8,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0187	0,0125	0,0062	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0187	0,0125	0,0062			
H ₃ BO ₃	6,2	4,65	3,1	1,55	6,2	6,2	6,2
KI	0,83	0,6225	0,425	0,2075			
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,1875	0,125	0,0625	0,25		0,25
H ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O						0,16	
Quelatos							
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,81	20,8575	13,905	6,952	27,8	27,8	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,31	27,9825	18,655	9,327	37,2	37,2	
FeEDTA·2H ₂ O							0,03

MS: Murashige y Skoog (1962), WPMm: WPM modificado por Villegas *et al.* (1992), WPMm1: WPM con ácido molibdico en lugar de molibdato de sodio, WPMm2: WPM con quelato de hierro en lugar de FeSO₄·7H₂O y Na₂EDTA·2H₂O.

del de longitud de raíz. Los valores de R² fueron de 0,94 a 0,99, indicando que el modelo estadístico usado para el análisis de varianza fue el adecuado (Tabla II).

La composición del medio de cultivo repercutió en el potencial osmótico del mismo (Tabla III); los medios MS 100% y 75% tuvieron el potencial más negativo. En los cuatro medios de cultivo MS, el potencial osmótico fue menos negativo conforme disminuyó la concentración de sales en el mismo. Los tres medios WPMm tuvieron potencial osmótico menos negativo que los medios MS 100% y 75%. Al respecto, Pierik (1990) señala que la concentración total de las sales del medio de cultivo determina su potencial osmótico. Conforme el potencial osmótico es más negativo se cambia el potencial matricial del medio y ocurre menor absorción de agua; además, los explantes tienen contacto menos eficiente con el medio, lo que dificulta la disponibilidad de los macro y micro nutrientes del medio de cultivo, dependiendo también de la concentración del agar (George, 1993). El medio MS es considerado rico en sales (Bell

et al., 2009), de ahí que su potencial osmótico es más negativo; por el contrario, el medio WPM se considera como de bajo contenido de sales.

La germinación de las semillas de orquídea se manifestó a simple vista con el cambio de semilla amarilla-crema a estructuras de color verde, pero en el microscopio se observó que el embrión se transformó en cuerpo protocórmico con crecimiento de la primera hoja. Este proceso tuvo inicio a los cinco días después de la siembra en el medio de cultivo MS con las sales al 50% de la concentración original, mientras que en los otros medios la germinación ocurrió entre 7 y 15 días, con excepción del medio WPMm2. La mayoría de las semillas germinaron en el

transcurso de tres semanas. La germinación de las semillas fue rápida en comparación con lo reportado por Dohling *et al.* (2008) para la germinación de *Dendrobium longicornu* y *D. formosum*, las que germinaron en 3 a 5 semanas. Posterior al cambio a color verde en las semillas, se formaron los pequeños protocormos a partir de los cuales se observó la primera hoja pequeña (meristemo del vástago). La continuación del crecimiento se manifestó con la emisión de nuevas hojas, incremento en altura y grosor de tallo, y en algunos casos la iniciación y crecimiento de rizoides.

En la mayoría de los casos se formó una plántula a partir de una semilla; sin embargo, en el medio de cultivo MS al

50% de concentración de sales se tuvo 4% de plántulas con tallos múltiples. Las semillas que germinaron en el medio MS al 25% de concentración de sales generaron plántulas de color verde amarillento, indicando deficiencia nutrimental por la baja concentración de macro y micro nutrientes.

En el medio de cultivo WPMm2, donde se sustituyó el sulfato ferroso y el quelato de sodio por quelato de hierro, las semillas no germinaron (Tabla III); la ausencia de germinación indica que el sulfato ferroso y el EDTA de sodio son componentes del medio de cultivo necesarios para la germinación de semillas de la orquídea estudiada. El porcentaje de germinación de semillas fue mayor cuando se usaron los macro y micronutrientes del medio MS al 25 y 50% de concentración, sin diferencias estadísticas entre ambos medios de cultivo (Figura 1). Este resultado es acorde con lo observado por Faria *et al.* (2002) quienes usaron el medio MS con los macronutrientes al 50% de su concentración obteniendo buen resultado. En contraste, la menor germinación ocurrió cuando se usó el medio MS con las sales al 100% de su concentración, debido a que este medio tuvo el potencial osmótico más negativo. Estos resultados difieren de lo reportado por Schneiders *et al.* (2012), quienes obtuvieron 90% de germinación de semillas de *C. forbesii* en medio MS con 2,5g de carbón activado; también difieren de lo obtenido por Dohling *et al.* (2008), quienes observaron mejor germinación de *D. longicornu* (90-95%) y

TABLA II
CUADRADOS MEDIOS Y PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL
ANOVA PARA GERMINACIÓN Y VARIABLES DEL CRECIMIENTO
DE PLÁNTULAS DE *Brassolaeliocattleya* 'TRIUMPHANT CORONATION'

Fuentes de variación	gl	Germinación (%)	Altura de plántula (mm)	Nº hojas	Nº raíces	Longitud de raíz (mm)
Medio de cultivo	6	3564,551**	53,408**	4,538**	3,008**	1,109**
Error exp.	14	5,428	0,738	0,105	0,006	0,009
CV (%)		5,85	12,6	15,1	13,9	28,0
R ²		0,99	0,96	0,94	0,99	0,98

gl: grados de libertad, CV: coeficiente de variación, R²: coeficiente de determinación, **: altamente significativo (P≤0,01).

TABLA III
EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN
DE RAÍZ EN PLÁNTULAS DE *Brassolaeliocattleya*
'TRIUMPHANT CORONATION'

Medio de cultivo	Potencial osmótico (Mpa)	Nº Raíces	Longitud de raíz (cm)
MS 100%	-0,3394	0,0 b	0,0 c
MS 75%	-0,3187	0,0 b	0,0 c
MS 50%	-0,2695	0,0 b	0,0 c
MS 25%	-0,2591	0,0 b	0,0 c
WPMm	-0,2902	1,96 a	1,46 a
WPMm1	-0,2772	2,13 a	0,95 b
WPMm2	-0,2850	0,0 b	0,0 c
DMSH (P<0,05)		0,22	0,27

MS: Murashige y Skoog (1962), WPMm: WPM modificado por Villegas *et al.* (1992), WPMm1: WPM con ácido molibdico en lugar de molibdato de sodio, WPMm2: WPM con quelato de hierro en lugar de FeSO₄·7H₂O y Na₂EDTA·2H₂O. Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey ≤0,05).

D. formosum (80-85%) en el medio Murashige y Skoog (1962) que en los medios Gamborg *et al.* (B5), Mitra *et al.* y Knudson C (KC) (Dohling *et al.*, 2008).

Con respecto a los medios WPM, el uso del medio WPMm generó 50% menos semillas germinadas que lo obtenido en el medio MS 25%. Sin embargo, cuando se sustituyó el molibdato de sodio por el ácido molibdico (WPMm1) la germinación mejoró, ya que fue de 45,3% (Figura 1). Lo anterior indica que el sodio agregado al medio tuvo efecto negativo en la germinación de las semillas de orquídea.

Al relacionar el potencial osmótico del medio de cultivo con el porcentaje de germinación, se observó que conforme el potencial osmótico fue más

negativo se tuvo menor germinación de semillas, con excepción del medio WPMm2 cuyo potencial fue de -0,2850 y en el que no hubo germinación (Figura 1).

La altura de las plántulas (Figura 2) fue mayor cuando fueron cultivadas en los medios WPMm1 y WPMm; en contraste, la altura fue menor cuando se usó cualquiera de los cuatro medios que contenían los macro y micronutrientes formulados por Murashige y Skoog (1962).

El número de hojas por plántula también fue afectado por el medio de cultivo (Figura 3). Las plántulas que crecieron en el medio WPMm1, sustituyendo el molibdato de sodio por ácido molibdico, tuvieron el mayor número de hojas (3,5 por plántula) que fue

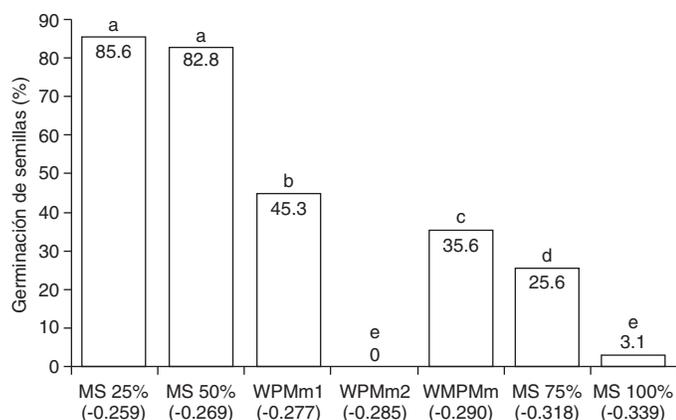


Figura 1. Efecto del medio de cultivo y potencial osmótico (Mpa) en la germinación de semillas de *Brassolaeliocattleya* 'Triumphant coronation'. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey ≤0,05), DMSH= 6,49.

estadísticamente igual a las hojas de las plantas cultivadas en el medio WPMm y las del medio MS al 25%.

Al igual que el número de hojas, la cantidad de raíces por plántula fue afectada por el medio de cultivo (Tabla III, Figura 4). Hubo producción de

raíces sólo en las plántulas cultivadas en el medio WPMm y WPMm1; ambos medios generaron plántulas con raíz; sin embargo, las raíces fueron de mayor longitud en el medio de cultivo WPMm (modificado por Villegas *et al.*, 1992). Las plántulas que crecieron en el

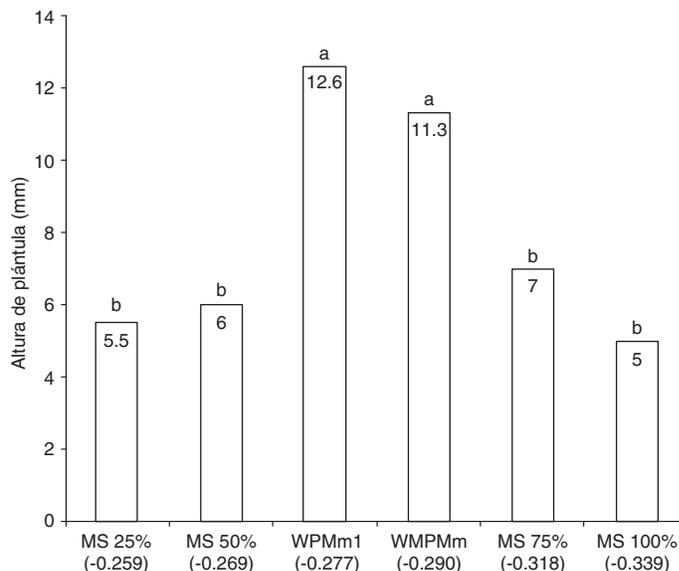


Figura 2. Efecto del medio de cultivo y potencial osmótico (Mpa) en la altura de plántulas de *Brassolaeliocattleya* 'Triumphant coronation'. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey ≤0,05), DMSH= 2,39.

MS: Murashige y Skoog (1962), WPMm: WPM modificado por Villegas *et al.* (1992), WPMm1: WPM con ácido molibdico en lugar de molibdato de sodio, WPMm2: WPM con quelato de hierro en lugar de FeSO₄·7H₂O y Na₂EDTA·2H₂O. Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey ≤0,05).

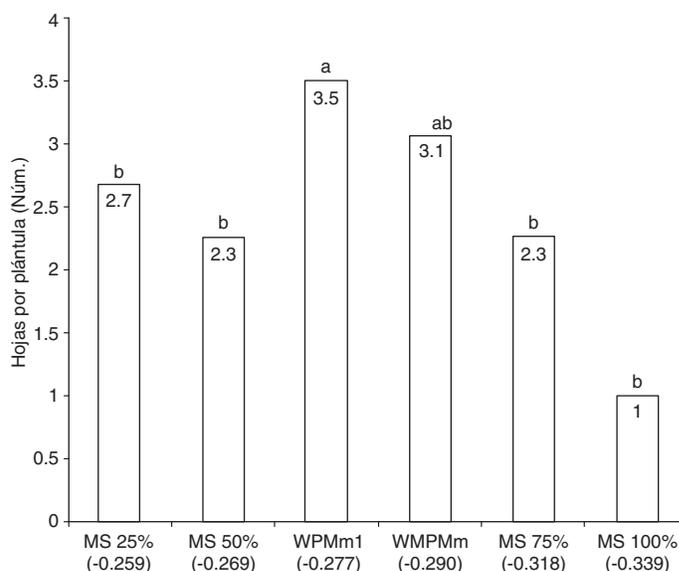


Figura 3. Efecto del medio de cultivo y potencial osmótico (Mpa) en el número de hojas por plántula de *Brassolaeliocattleya* 'Triumphant coronation'. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey 0,05), DMSH= 0,90.

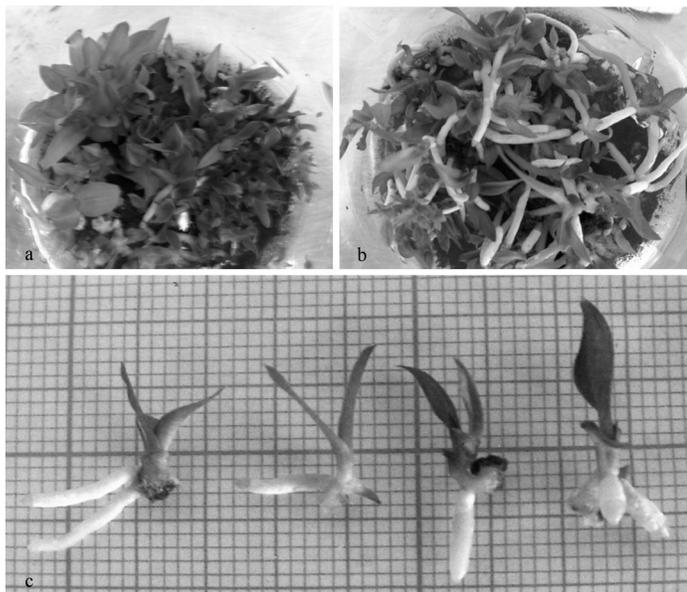


Figura 4. Plántulas de *Brassolaeliocattleya* 'Triumphant coronation', cultivadas en dos medios nutritivos. a: en medio MS (1962) al 50%; b, c: en medio WPM modificado por Villegas *et al.* (1992), sustituyendo el molibdato de sodio por ácido molibídico.

medio MS no presentaron raíces, independientemente de la concentración de sales del medio (Tabla III).

Haciendo un análisis general de las variables evaluadas, se puede decir que aunque los medios de cultivo MS 50 y 25% presentaron los mayores porcentajes de germinación de semillas de orquídeas, su composición no fue adecuada para nutrir a las plántulas ya que éstas crecieron mejor en el medio de cultivo WPMm, que tuvieron potencial osmótico de -0,290 y -0,277pa respectivamente. Estos resultados contradicen lo observado para *D. longicornu* y *D. Formosum*, ya que el número de brotes, longitud de brote, número de raíces y longitud de raíz fueron mayores en el medio de cultivo de Murashige y Skoog que en los medios Gamborg *et al.* (B5), Mitra *et al.* y Knudson C (KC; Dohling *et al.*, 2008).

Se observó que hubo tres factores que afectaron negativamente la respuesta de las variables evaluadas: el sulfato

ferroso y el EDTA de sodio fueron componentes del medio de cultivo indispensables para la germinación de semillas, ya que en su ausencia no ocurrió germinación; el potencial osmótico mayor a -0,3 que limitó la germinación y crecimiento de plántulas; y la composición nutrimental del medio MS 25 y 50% que afectó negativamente el crecimiento de las plántulas. Pierik y Steegmans (1975) señalan que el crecimiento y organogénesis de las plantas *in vitro* se detiene si el potencial osmótico es más negativo que -0,3Mpa, ya que impide la absorción de agua del medio hacia la planta. De igual modo, Morard y Henry (1998) indican que el potencial osmótico del medio tiene efecto directo en los explantes; conforme es más negativo, la absorción de agua es menor y por consecuencia se dificulta el crecimiento por la baja disponibilidad de los nutrientes del medio. Navarro *et al.* (2000) indican que junto con el aumento del potencial osmótico aumenta la salinidad,

la que reduce el transporte del agua y la asimilación de nutrientes.

Con base en las condiciones en que se desarrolló la investigación y los resultados obtenidos, se concluye que la germinación de semillas de *B. cattleya* 'Triumphant coronation' fue mayor en el medio MS al 25 y 50% de concentración de sales. Sin embargo, la plántulas tuvieron mejor crecimiento en el medio WPMm modificado por Villegas *et al.* (1992), sustituyendo el molibdato de sodio por ácido molibídico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, al Programa de Fortalecimiento de la Calidad en las Instituciones Educativas (PIFI), al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo para la adquisición de equipos, compra de materiales e insumos.

REFERENCIAS

- Bell RL, Srinivasan C, Lomber D (2009) Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In vitro Cell Devel. Biol. Plant.* 45: 708-714.
- Damon A, Aguilar-Guerrero E, Rivera L, Nikolaeva V (2004) Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Rev. Chapingo Hort.* 10: 195-203.
- Dohling S, Kumaria S, Tandon P (2008) Optimization of nutrient requirements for asymbiotic seed germination of *Dendrobium longicornu* Lindl. and *D. formosum* Roxb. *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad.* 74: 167-171.
- Faria RT, Santiago DC, Saridakis DP, Albino UB, Araujo R (2002) Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeri* Gardner using *in vitro* propagation. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 2: 489-492.
- George EF (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. Technology. Exergetics. Edington, RU. 574 pp.
- Huang L (1984) Alternative media and method for *Cattleya* propagation by tissue culture. *Am. Orch. Soc. Bull.* 53: 167-170.
- Knudson L (1922) Non-symbiotic germination of orchid seed. *Bot. Gaz.* 73: 1-25.
- Martini PC, Willadino L, Alves GD, Donato VMTS (2001) Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras.* 36: 1319-1324.
- Morard P, Henry M (1998) Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *J. Plant Nutr.* 21:1565-1576.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Navarro JM, Botella MA, Cerdá A, Martínez V (2000) Effect of salinity x calcium interaction on cation balance in melon plants grown under two regimes of orthophosphate. *J. Plant Nutr.* 23: 991-1006.
- Paula CC, Silva HMP (2004) *Cultivo Práctico de Orquídeas*. 3ª ed. Universidade Federal de Viçosa. Brasil. 106 pp.
- Pierik RLM (1990) *Cultivo in vitro de las Plantas Superiores*. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 pp.
- Pierik RLM, Steegmans HH (1975) Analysis of adventitious root formation in isolated stems explants of rhododendrom. *Sci. Hort.* 3: 1-20.
- Schneiders D, Pescador R, Raitz BM, Mamoru SR (2012) Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). *Ceres* 59: 185-191.
- Villegas MA, Mazuelos C, Cantos M, Troncoso A (1992) Influencia del nitrógeno sobre el desarrollo *in vitro* del portainjerto de vid 161-49. *Suelo Planta* 2: 529-539.