

DAD superior al precio que se le señaló, por acuerdo de la Junta Directiva dicho precio se elevará, para quienes lo adquieran a partir de esta fecha, a quince pesetas.

Trabajos presentados.—El Sr. Carandell remite una nota titulada *El punto de vista matemático ante el problema de la barisfera terrestre*; el Sr. Pons, unos *Datos acerca de unos ejemplares teratológicos del Instituto de Pamplona*, y el señor Aranzadi, un trabajo titulado *Triangulación de la calvaria en cráneos de Vizcaya*.

El socio correspondiente extranjero Profesor L. Knudson presenta un interesantísimo trabajo sobre *La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas*.

El Secretario presenta una nota sobre algunos carnívoros africanos nuevos y otra sobre una pequeña colección de mamíferos de Fu-Kien (China).

Secciones.—La de Valencia celebró sesión el 25 de mayo en el Laboratorio de Hidrobiología, presidida por el Excmo. Sr. Conde de Montornés.

El Sr. Boscá (E.) muestra a los reunidos algunas plantas de la Albufera, continuando así la exhibición de ejemplares regionales.

El Sr. Presidente da cuenta de que, al realizar algunas obras con objeto de mejorar el sistema de riegos de su finca, la colonia agrícola «La Vallesa de Mandor», se han descubierto unas conducciones de agua, que, según peritos en el asunto, proceden de la dominación romana y que parecen indicar el cauce distinto que seguía el Turia en aquellos lejanos tiempos, siendo una hipótesis muy probable que bajaran sus aguas por donde hoy corre el Barranco de Poyo en el Llano de Cuart.

El Sr. Morote da cuenta de la constitución en España de una Sociedad mercantil, formada con el concurso de abundante capital español y noruego, para la pesca de la ballena y su explotación industrial. Dicha entidad ha establecido una factoría en la bahía de Getares, localidad próxima a Algeciras, donde se verifican todas las operaciones pesqueras e industriales, contando para ello con su flotilla, locales, maquinaria, etc., de los más recientes modelos.

El éxito de la empresa es cosa descontada, como lo prueba el hecho de que, en un plazo tan breve como es el comprendido entre 11 de abril y 3 de mayo, hayan sido capturadas 29 ballenas, ha-

La germinación no simbiótica de las semillas de Orquídeas

por

Lewis Knudson (1).

(Lámina XVI.)

Está probado desde hace mucho tiempo lo difícil que es lograr la germinación de las semillas de orquídeas, frecuentemente cultivadas en estufas. De un modo general, puede decirse que los cultivadores de orquídeas no han resuelto aún el problema de lograr una producción normal de estas plantas por semillas.

Las semillas de las orquídeas son, generalmente, muy pequeñas. El embrión de *Cattleya* sp., tiene, aproximadamente, unas

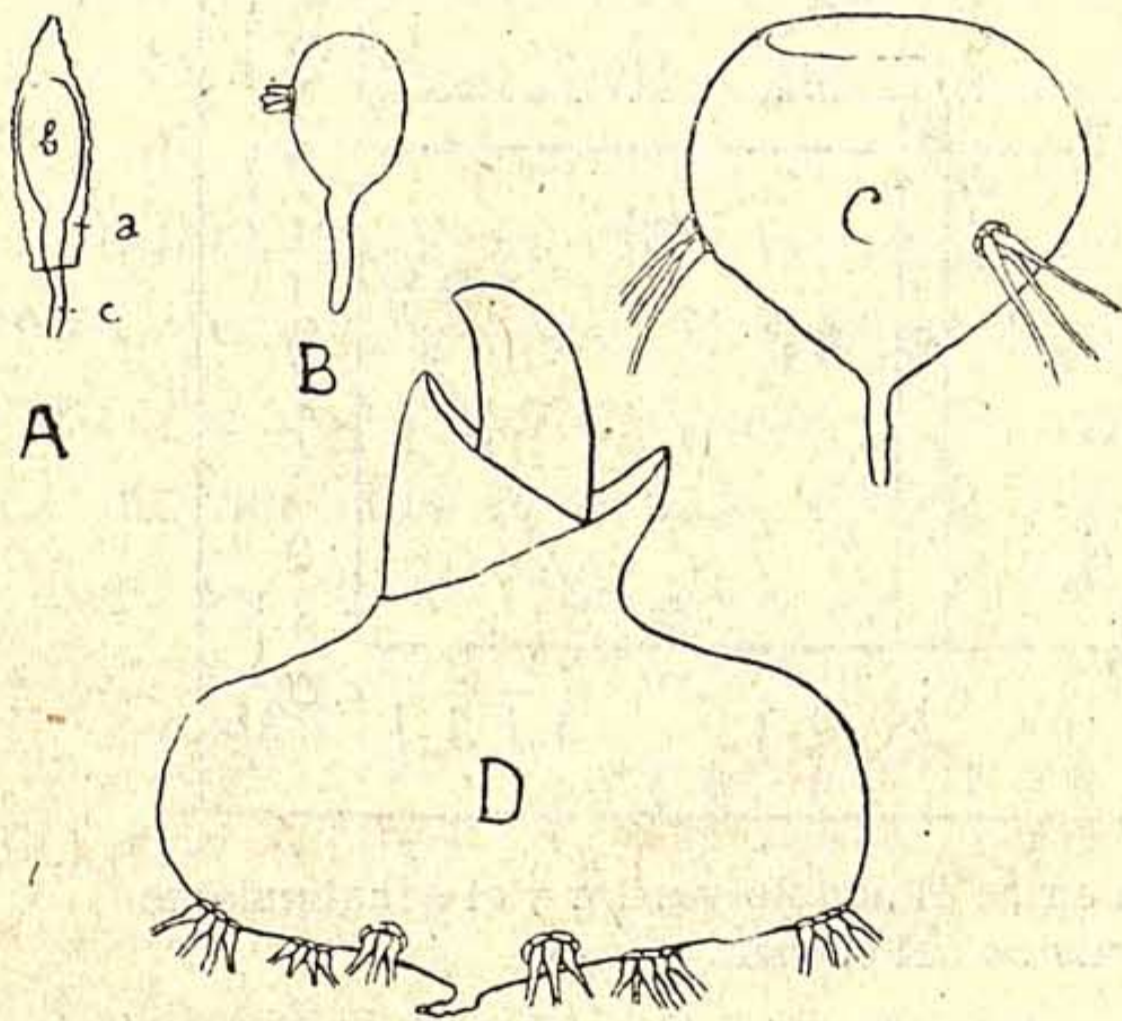


FIG. 1.—Estados sucesivos de la germinación de la semilla de una *Cattleya*, según Bernard. A: semilla, a tegumento, b embrión, c suspensor. B: embrión en estado de esférula.—C: protocormo.—D: embrión con sus primeras hojas.

tudio aconseje el exponerlo brevemente.

La germinación consiste en un engruesamiento del embrión

250 μ de largo por 75 de ancho. Incluido en un tegumento frágil y transparente, el embrión sólo está diferenciado en la región mesistemática superior, formada por células más pequeñas que las del centro y de la base. De ésta parte el delicado suspensor (figura 1, A).

El modo como germinan las orquídeas ha sido ya bien descrito por Bernard, aunque la mayor claridad de este es-

(1) La traducción al castellano ha sido hecha por D. Luis Crespí.

hasta que se forma un pequeño cuerpo ovoide provisto de clorofila. En tal estado, el embrión rompe el tegumento. Posee entonces una longitud de 250 μ y una anchura de 175. Sobre su epidermis empiezan a formarse pelos absorbentes.

Sigue dilatándose el embrión hasta alcanzar un estado de esférica, y siguen produciéndose más pelos absorbentes, sobre todo en su porción basal (fig. 1, B).

Una ligera depresión aparece entonces en la región apical. El embrión, creciendo en ambas dimensiones, toma la forma de una peonza o disco. Tal momento fué designado por Bernard con el nombre de *protocormo*, el cual puede poseer estomas, pudiendo ser muy abundantes sus pelos absorbentes (fig. 1, C).

De la ligera depresión apical se inicia una protuberancia, que se desarrolla, dando origen a la primera hoja. Más tarde, en esta misma región se formarán una o dos hojas más, alargándose la primitiva protuberancia, que se diferencia en tallo, o del protocormo nacerá la primera raíz (fig. 1, D).

Cuando nace la primera hoja del embrión (protocormo), éste tiene un ancho de 0,8 a 1,0 mm.

La evolución de la germinación hasta que aparece la primera hoja dura de dos a cinco meses, según las condiciones en que se realiza.

¿Qué causas determinan el fracaso de las germinaciones en estas plantas? Bernard [1] y también Burgeff [4] llegan a la conclusión de que la germinación depende de una relación simbiótica entre la semilla y un hongo particular que vive en las raíces de las orquídeas. Según ellos, la infección primaria de la semilla de *Cattleya* se produciría por el suspensor, y el crecimiento del embrión sólo se verificaría si la infección no pasaba de su tercio inferior; de ser mayor la invasión, el embrión moriría.

Se ha observado, además, tanto por Bernard como por Burgeff, que el hongo invasor forma en el embrión en desarrollo pelotones de hifas semejantes a las que se encuentran en las raíces de las orquídeas, lo que les hizo pensar que el hongo era digerido por las células en embrión.

Bernard atribuye particular importancia a la idea de que la germinación es posible tan sólo cuando el equilibrio se mantiene entre

el embrión y el hongo; un ligero predominio del uno sobre el otro produciría o un fracaso en la germinación o la muerte del embrión.

Un estudio crítico del trabajo de Bernard revela el hecho de que el fracaso fué más frecuente que el éxito en las germinaciones, y, en efecto, señala que: «Para la mayoría de las semillas, la asociación con el hongo fué pasiva y sin efecto o rápidamente dañina para el embrión». Su sinceridad le llevó a declarar que la germinación de la semilla por medio del hongo era la excepción más bien que la regla general.

Bernard afirma, sin embargo, que en todos los casos no seguidos de éxito no fué empleada la casta adecuada del hongo, o, tal vez, que el hongo, que previamente había sido eficaz, a causa de haber estado algún tiempo conservado su cultivo puro, había perdido su «actividad» o capacidad para provocar la germinación.

Dándose cuenta Bernard de los inconvenientes del método de inoculación, pensó que debería emplearse algún otro. El mismo logró la germinación empleando el *salep* (harina obtenida pulverizando tubérculos o rizomas de ciertas orquídeas), alimento orgánico que utilizó en concentración bastante elevada.

Con el propósito de encontrar un método para hacer germinar las semillas de orquídeas sin la intervención de hongos, y con la curiosidad de adquirir algún conocimiento relativo a la causa que impide la germinación, emprendí yo una serie de investigaciones bastante amplias.

Seguidamente doy cuenta de la parte que se refiere al método para esterilizar las semillas y al estudio de la influencia de algunos azúcares, de la glucosa en diferentes concentraciones y de la influencia de algunos microorganismos y levaduras. En la discusión se hace la crítica de algunas de las conclusiones de Bernard y de Burgeff y se dan algunas explicaciones posibles referentes a las causas del fracaso de la germinación en las orquídeas.

MÉTODOS.—Hice todos los cultivos en tubos de ensayo de 180 milímetros de largo por 18 de diámetro.

Como medio nutritivo usé la solución Pfeffer o la llamada solu-

ción B (1). Esta última la empleé porque, según Burgeff, el nitrógeno amoniacal es más favorable para el crecimiento que el nitrógeno nítrico. Hice sólido el medio con agar al 1,5 por 100. Todos los tubos con medios de cultivo fueron esterilizados durante treinta minutos a una presión de 15 libras. Por lo tanto, todos los cultivos se desarrollaron en condiciones asépticas.

Para esterilizar las semillas utilicé el método Wilson [5] al hipoclorito cálcico. A este fin puse 10 g. de hipoclorito cálcico en 140 c. c. de agua destilada. Agité fuertemente durante unos minutos y filtré. El líquido transparente obtenido fué el empleado para esterilizar las semillas. Coloqué en un pequeño tubo de ensayo una cierta cantidad de semilla, añadí la lejía de hipoclorito y agité el tubo hasta que estuvieran humedecidas todas las semillas. Moviendo el tubo repetidas veces mantuve las semillas en la lejía durante unos quince minutos. Previamente había comprobado que las semillas de *Cattleya* y *Laelia* resistían sin daño en la lejía de hipoclorito varias horas.

Directamente, sin previo lavado, hice el traslado de las semillas de la solución de hipoclorito al tubo donde habían de germinar. Para esa siembra empleé un alambre de platino de los que se usan en bacteriología, cuyo extremo encorvado en pequeño anillo bastaba para recoger cada vez un centenar de semillas. Inmediatamente las esparcí sobre el medio sólido de cultivo.

Para determinar el grado de desarrollo de las plantitas utilicé como criterio el diámetro del embrión, medido con el ocular micrométrico. En algunos casos anoté el tiempo transcurrido hasta la aparición de la primera hoja y llevé también cuenta respecto a las diferencias en el crecimiento.

Todos los cultivos los tuve en una cámara especial dentro de la estufa con una temperatura de 25 a 30° C. durante el día, y de 15 a 25° C. por la noche.

Antes de la esterilización final de los tubos los recubrí con un tubo de vidrio de 80 mm. de largo por 25 de diámetro. Esta segunda cubierta tuvo por objeto impedir que pudieran alojarse esporas en el tapón de algodón, que, desarrollándose y creciendo hacia el

(1) Solución Pfeffer: $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, 4 g.; NO_3K , 1 g.; PO_4HK_2 , 1 g.; SO_4Mg , 1 g.; ClK , 0,5 g.; Cl_3Fe , 5 g.; agua destilada, seis litros.

Solución B: $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, 1 g.; PO_4HK_2 , 0,25 g.; SO_4Mg , 0,25 g.; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0,50 g.; PO_4Fe , 0,05 g.; agua destilada, un litro.

interior del tubo, llegaran a contaminar el cultivo. Invariablemente, cuantos tubos se dejaron sin ese segundo tapón de vidrio, se mostraron contaminados hacia el tercero o cuarto mes. Además, estas cubiertas de vidrio disminuían la evaporación en el medio de cultivo.

EXPERIMENTOS.—*Primero*.—Preparé cinco tubos con solución Pfeffer y 1,5 por 100 de agar, y otros cinco con la misma solución nutritiva, más 1 por 100 de sacarosa. El 14 de enero de 1919 sembré en ellos semillas de *Cattleya mossiae*. En 1.º de julio de 1919, los embriones en los cultivos con sacarosa presentaban una hojita y tenían el protocormo con un ancho de 1.000 micras, mientras que en los cultivos sin sacarosa los embriones se encontraban todavía en estado de esférulas, con un diámetro de 250 micras solamente.

Segundo.—Hice un extracto hirviendo de 70 g. de raíz joven de zanahoria con 75 c. c. de agua. Filtré el cocimiento, y al líquido claro filtrado añadí 1,5 por 100 de agar. Otro extracto hice de igual modo, sólo que sustituyendo la zanahoria por 50 g. de raíz joven de remolacha de jardín.

En algunos tubos preparados con estos medios sembré *Cattleya labiata* × *Cattleya aurea* el 14 de febrero de 1919. El 13 de mayo del mismo año los embriones habían producido una hoja bien distinta.

Estos experimentos, al igual que otros muchos que hice, demuestran que las semillas de *Cattleya* sp., y de *Lalia* sp. pueden germinar rápidamente en cultivos puros si contienen azúcar.

Los siguientes experimentos acusan claramente la influencia de la glucosa y fructosa, así como el efecto marcadamente estimulante del empleo de extractos de levaduras en la germinación y crecimiento de los embriones.

Tercero. Empleé la solución B añadiendo 1,5 por 100 de agar. Además, añadí, un fermento obtenido de una levadura especial que se utiliza mucho en los Estados Unidos para fabricar el pan. Propagué esta levadura en solución William, usando tres frascos, cada uno de los cuales contenía tres litros de la solución. Separé por filtración la levadura obtenida en esas soluciones, la autolicé a 37º C. durante veinticuatro horas, y la desequé por succión y lavado con éter. Finalmente la puse un desecador. Entonces 70 g.

de la levadura seca, adicionados con 250 c. c. de agua destilada, los cocí al vapor durante diez minutos. Filtré y llevé el filtrado al volumen de un litro. El líquido presentaba un limpio color de ámbar.

La concentración del azúcar y la cantidad de extracto de levadura empleados se consignan en el cuadro I. Las cifras de los promedios del tamaño de los embriones fueron obtenidas con los promedios de 40 medidas individuales para cada cultivo. Todos éstos fueron hechos por cuadruplicado, y el crecimiento de los embriones en cada serie resultó tan uniforme, que no fué necesario medir las plantitas en todos los cultivos.

CUADRO I

Híbridos de *Lælio-Cattleya*.

Siembra verificada el 31 de agosto de 1920.

Observaciones efectuadas el 27 de enero de 1921.

SOLUCIONES DE CULTIVO EMPLEADAS	DIÁMETRO DE LOS EMBRIONES EN MICRAS			Por ciento de embriones con hojas.
	Diámetro mínimo.	Diámetro máximo.	Pro- medios.	
Solución B., + 2 por 100 de glucosa.....	485	1.261	970	20
Solución B., + 2 por 100 de fructosa.....	776	1.260	940	60
98 c. c. de solución B., + 2 por 100 de glucosa, más 2 c. c. de extracto de fermento.....	582	1.552	1.076	90
98 c. c. de solución B., + 2 por 100 de fructuosa, más 2 c. c. de extracto de fermento.....	582	1.358	1.047	80
Solución B., sin azúcar ni fermento.....	194	242	213	0
Extracto de fermento solo.....	87	339	194	0

Pocos comentarios necesita este cuadro. Claramente se ve que los cultivos con fructosa son mejores que los cultivos con glucosa, y que la adición del extracto de levadura se hizo notar particularmente en el cultivo con glucosa. Los resultados parecen indicar un influjo de las vitaminas; pero es probable que las sustancias orgánicas nitrogenadas u otros elementos nutritivos orgánicos sean los causantes del fenómeno. El extracto de levadura

solo no produjo mejores efectos que la solución B sola. Desgraciadamente, no hice ningún experimento, empleando 98 c. c. de solución B, sin azúcar, más dos centímetros cúbicos de extracto de levadura.

En la lámina XVI se representan un cultivo característico con 2 por 100 de fructosa y un cultivo con sólo sales minerales.

Otra observación de interés fué ver que los embriones desarrollados en medios ricos en glucosa o fructosa tenían abundante almidón, mientras que los desarrollados en medios sin azúcar carecían en absoluto de almidón. El azúcar, al parecer, fué absorbido, y de él se formó la reserva amilácea.

Cuarto experimento. En el cuadro II aparecen los resultados de un experimento hecho para determinar la influencia de las diferentes concentraciones de glucosa en las semillas de *Epidendrum*. Los resultados son interesantes, porque no sólo demuestran una gran influencia del azúcar en el tanto por ciento de las germinaciones, sino que también muestran un tanto por ciento de semillas sin desarrollo apreciable, mayor en el medio que carece de azúcar, y el por ciento con apreciable cambio es tanto mayor a medida que el azúcar aumenta.

Las cifras del grueso medio de los embriones, dadas seguidamente, son los promedios de las semillas germinadas. El tamaño de los embriones, que apenas han variado, no está incluido. En todas las concentraciones superiores al 0,2 por 100 de glucosa se encontró almidón en los embriones, indicado por la coloración azul obtenida con la solución de yodo y yoduro potásico. Pero tan pronto como la primera hoja apareció, el almidón fué transformado en una forma de eritrodextrina, según pudo evidenciarse por el color rosa, o faltaba el almidón y la dextrina.

Probablemente, la aparición de las hojas fué acompañada de un cambio de almidón en azúcar.

CUADRO II

Influencia producida por las diferentes concentraciones de glucosa.

Semillas de *Epidendrum tampense* × *E. maximum*.

Siembra verificada el 8 de diciembre de 1920.

Observaciones efectuadas el 17 de marzo de 1921.

SOLUCIONES DE CULTIVO EMPLEADAS	Diámetro mínimo de los embriones. — Micras.	Diámetro máximo de los embriones. — Micras.	Promedio del diámetro de los embriones (*). — Micras.	Tanto por ciento sin cambio	Por ciento con hojas.
Solución B	116	203	145	95	0
Idem, + 0,05 % de glucosa...	116	291	178	90	0
Idem, + 0,10 % — ...	184	407	281	80	0
Idem, + 0,20 % — ...	339	630	465	30	10
Idem, + 0,40 % — ...	291	582	397	40	10
Idem, + 0,80 % — ...	194	582	446	50	20
Idem, + 1,00 % — ...	339	582	446	30	10
Idem, + 2,00 % — ...	291	630	446	26	10

En otro experimento parecido hecho con semillas híbridas de *Laelia-Cattleya* se notó que cuanto más alta era la concentración más rápido era el desarrollo, aunque la concentración de 0,8 por 100 era próximamente tan buena como la más alta empleada.

Debe tenerse en cuenta que la concentración final, al tomar las notas, fué aproximadamente un 30 por 100 mayor que la concentración inicial de la solución de cultivo. Ese aumento de la concentración fué debido a la evaporación del agua en los tubos.

Experimento quinto. Influencia del «Bacillus radicum» sobre el crecimiento de los embriones de las semillas de Epidendrum.

Preparé 10 tubos con solución Pfeffer + 3 por 100 de sacarosa. Cinco de esos tubos los inoculé con *Bacillus radicum* de la alfalfa (*Medicago sativa*), y los otros cinco tubos los dejé sin inocular. Las semillas de *Epidendrum* las sembré en esos tubos el 8 de diciembre de 1920, y las observaciones las hice el 5 de marzo de 1921.

En los tubos inoculados, el 80 por 100 de las semillas germinó,

(*) Promedios obtenidos de la medida de 40 embriones, excluyendo aquellos que no presentaban cambio alguno.

las plantitas tenían una a dos hojas y un color verde obscuro. En los tubos sin inocular, el 40 por 100 de las semillas no germinaron, y el 60 por 100 de los embriones obtenidos tenían un color verde amarillento, y empezaba entonces a producirse en ellos la depresión de la región apical. Calculé por este dato que estaban en retardo de unas seis semanas en relación con los del cultivo inoculado.

No es posible afirmar actualmente la causa de la favorable influencia del *Bacillus radicolica*. Es posible que sea debido a una inversión del azúcar o al cambio de la concentración del ion H en el medio. Bottomley [3] observó una favorable influencia de un muy diluído extracto de *Bacillus radicolica* sobre el crecimiento de la *Lemna minor*, y quizás las sustancias producidas y excretadas por la bacteria fueran los agentes efectivos de ese mayor desarrollo.

* * *

DISCUSIÓN.—El hecho realmente significativo que se ha obtenido de estas investigaciones es el de que las semillas de orquídeas no germinan fácilmente en un medio nutritivo que carezca de azúcar. En algunos cultivos en medio nutritivo puro, sin azúcar, la germinación que se obtuvo transcurridos diez meses daba solamente al embrión de *Cattleya* un diámetro de 500 μ .

Es probable que las semillas germinen sin azúcar, pero el tiempo requerido en este medio sería posiblemente de quince a veinte meses. Este aspecto del problema está aún investigándose.

Puede plantearse ahora la siguiente cuestión: ¿Cuál será el agente causante de la germinación en condiciones naturales, o bajo las condiciones generalmente empleadas por los cultivadores de orquídeas, que han tenido éxito en la germinación de estas semillas? Desde luego tenemos que reconocer que no han empleado azúcar. La planta que vive en el campo, y las siembras de semillas de orquídeas en las estufas se producen generalmente sobre medios ricos en materia orgánica. Los cultivadores emplean generalmente mantillo, serrín o una mezcla de *Sphagnum* y turba. Todas estas materias están sujetas a una descomposición bacteriana, y quizás algunos de los productos orgánicos que se originen sean capaces de hacer más rápido el crecimiento. Esta idea está acorde con algunos resultados obtenidos por Bottomley sobre la probable

influencia de extracto de turba descompuesta por bacterias sobre el crecimiento de *Lemna*.

En los cultivos en tubo, la difusión del anhídrido carbónico está muy reducida, a causa del tapón de algodón y la caperuza de vidrio que usé para cubrir a éste. Esta reducción en la concentración del CO₂ disminuiría consiguientemente la función clorofílica, y, por lo tanto, la provisión de alimento orgánico estaría influida cuantitativa y cualitativamente. En los cultivos en tubos existiría, además, una retardación de la transpiración, y este hecho, según los ejemplos presentados por Spohér, influiría probablemente en el carácter del alimento que se encontraría en el embrión.

Bernard y Burgeff opinaron que la germinación sólo podría ocurrir después de la infección por el hongo apropiado. Un examen crítico de la obra de ambos autores ofrece el hecho de que ellos no han probado que la germinación sea causada por la infección del embrión por el hongo. Sus trabajos demuestran claramente que si el cultivo no está inoculado con hongo apropiado no germina la semilla. Burgeff empleó el almidón, y Bernard, el *salep* (polvo obtenido pulverizando tubérculos o rizomas de ciertas orquídeas), en los medios de cultivo. El *salep* contiene almidón, gomas, proteínas, probablemente algún azúcar y materias orgánicas nitrogenadas. Es concebible que la influencia favorable debida al hongo sea resultado de que él digiera el almidón y alguna otra substancia del medio de cultivo, y así solubilizadas estas substancias orgánicas, sean por ello causa de la germinación. También está bien probado que las hifas de los hongos segregan productos orgánicos, que acaso pudieran ser de importancia para provocar el desarrollo del embrión. Pruebas circunstanciales de esta idea se encuentran en los experimentos sobre la favorable influencia del *Bacillus radicola*.

Debe recordarse que en la mayoría de los experimentos hechos por Bernard el hongo fué claramente perjudicial a las semillas, obró como hongo patógeno, y es posible que en la naturaleza una de las causas del fracaso de las germinaciones de las orquídeas sea ese carácter patógeno de los hongos en cuestión. Actualmente realizó experimentos para determinar, definitivamente si es posible, las relaciones del hongo con la germinación y con el fracaso de la misma, y convendrá esperar a los resultados de estos experimentos para una discusión más amplia.

Sumario.

1.º Las semillas de *Cattleya*, *Laelia* y *Epidendrum* pueden germinar sin ningún hongo siempre que se proporcione azúcar al medio de cultivo.

2.º La germinación es completamente normal, y se obtiene un elevado tanto por ciento de semillas germinadas.

3.º Aumentando la concentración de glucosa hasta un 8 por 100 aumenta claramente la velocidad en el desarrollo del embrión.

4.º Si se da azúcar al embrión, en éste se acumula almidón. En el caso del *Epidendrum* el almidón formado en el embrión desaparece completamente al producir la primera hoja.

5.º Un método adecuado para hacer germinar las semillas tendría valor considerable, porque facilitaría la producción de orquídeas por semilla.

BIBLIOGRAFÍA

1. BERNARD (Noel).—*Recherches expérimentales sur les Orchidées*.—Revue gén. de Bot., XVI, 1904; p. 405-476.
2. BERNARD (Noel).—*L'évolution dans la symbiose, les Orchidées et leurs champignons commensaux*.—Ann. Sc. nat. Bot., 9^e série. Tome IX, 1909; p. 1-196.
3. BOTTOMLEY (W. B.).—*The effect of organic matter on the growth of various water plants in culture solutions*.—Annals of Botany, 34, 1920; p. 353-365.
4. BURGEFF (Hans).—*Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihre Leben in der Pflanze*.—222 págs Jena, 1909.
5. WILSON (J. K.).—*Calcium hypochlorite as a seed sterilizer*.—Amer. Jour. Bot., 2, 1915; p. 420-427.
6. WILLIAMS.—*The vitamins Requirements of yeast*.—Jour. Biol Chem., 38, 1919; p. 465.

Ithaca, marzo de 1921.