

NUCLEO DISCIPLINAR / COMITÉ ACADÉMICO (7/24)

## CULTIVO IN-VITRO Y ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE UN HÍBRIDO DEL GÉNERO *CATTLEYA* (ORCHIDACEAE)

MARIA VIRGINIA BARSANTI<sup>1</sup>  
VICTOR HUGO LALLANA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Becario de Iniciación en la Investigación (PID 2144) y <sup>2</sup>Docente orientador. Universidad Nacional de Entre Ríos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cátedra de Fisiología Vegetal. Oro Verde, Ruta 11, Km 10,5. Entre Ríos. Argentina. E-mail: [barsanti.virginia@gmail.com](mailto:barsanti.virginia@gmail.com)

El cultivo in-vitro de orquídeas es un método efectivo para su propagación, logrando reducir los tiempos del proceso como así también incrementar el número de plantas obtenidas en poco espacio. La fase de aclimatación es considerada crítica para determinar la sobrevivencia y el posterior establecimiento de las plantas. Dicha etapa se caracteriza por cambios drásticos en las condiciones en las cuales se encuentran las plantas, lo cual puede provocar que sufran un alto grado de estrés y por lo tanto disminuya el porcentaje de sobrevivencia de las mismas. El proceso debe hacerse en forma gradual y tarda alrededor de dos a tres meses para que las plantitas puedan mantenerse en condiciones de invernáculo. Es escasa la literatura sobre el montaje directo de plantas de orquídeas epifitas en palo y bajo condiciones poco controladas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento “ex vitro” de plantas de un híbrido de *Cattleya* mediante el montaje directo en palos. Se partió de una cápsula (6,5 cm largo por 3,5 cm de diámetro) en madurez fisiológica de un híbrido producido entre *Cattleya intermedia* x *Cattleya pao de açúcar*, se evaluó la viabilidad de las semillas el 05/11/10, mediante la prueba de tetrazolio y se realizó la siembra asimbiótica, cultivo y subcultivo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales (Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNER).

El fruto se desinfectó con alcohol al 70 % e hipoclorito de sodio (55 g/l) durante 5 minutos y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Luego se procedió a la siembra directa en frascos de vidrio, conteniendo 30 ml de medio de cultivo semisólido Murashige & Skoog a la mitad de la concentración suplementado con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, 5 g.L<sup>-1</sup> de Agar Agar Britania; pH 5,6 – 5,8. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 15 min. Una vez finalizada la siembra los frascos se llevaron a cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1 °C y un fotoperíodo de 16 horas, con luz grow lux. El primer repique de protocormos con dos hojas se hizo el 15/12/10 y luego se realizaron 6 subcultivos hasta mayo de 2012. El 7/08/12 se extrajeron las plantas de los frascos para iniciar el proceso de aclimatación. Se obtuvieron alrededor de 100 plantas aptas para el cultivo “ex vitro”. Las cuales presentaron una altura promedio de 2,27 cm; longitud promedio de raíces de 2,42 cm y número promedio de hojas y raíces de 5,50 y 5,55, respectivamente. Para la aclimatación de las plantas, se estableció el siguiente protocolo de trabajo: 1) Extraer las plantas de los frascos y lavar las raíces con agua; 2) Aplicar fungicida, 3) Colocar las plantas en cámara húmeda sin sustrato (lecho de piedras), cubriendo con bolsa de nylon y a baja intensidad lumínica durante 3 a 5 días, 4) Clasificar las plantas por tamaño, las más chicas (< 3 cm de altura) colocarlas en bandejas con musgo de *Sphagnum* humedecido y tapadas, con luz de laboratorio y las más grandes (4 a 6 cm de altura) montarlas en palos, 5) Las raíces de las plantas deben estar en contacto directo con el palo, luego se cubren con hebras de musgo de *Sphagnum* y se atan firmemente con hilo encerado. 6) Humedecer las plantas en palo a saturación (24 a 48 h) en una bandeja con una película de 1 cm o más de agua, 7) Llevar las plantas a un umbráculo con mediasombra (50 a 70 %) y regar diariamente, durante 15 días, luego se llevan a invernáculo con media sombra (50 %) manteniendo el riego diario y fertilizando con NPK (20-20-20) 1 g/L, cada 30 días. La sobrevivencia ex vitro, a los 240 días de haber iniciado el proceso de aclimatación fue de 78,4 %, obteniéndose un valor más alto con plantas grandes. El mayor porcentaje de mortalidad, ocurrió entre los 60 y 90 días, principalmente en plántulas pequeñas. El número medio de hojas y raíces disminuyó en el tiempo mientras que la longitud de las hojas y de raíces incrementó levemente. El desarrollo de raíces fue muy significativo respecto a la situación inicial observando raíces firmemente adheridas a los palos de longitudes entre 5 y 7 cm. El valor medio de longitud de raíces también aumentó de 2,35±1,23 (inicio) a 2,80±0,98 cm.

**Palabras claves:** *Cattleya* – aclimatación – cultivo “in-vitro”

## Introducción

Las plantas son un componente vital de la diversidad biológica y ellas ofrecen una amplia gama de servicios a los ecosistemas, desde la producción de oxígeno y la eliminación de las emisiones de dióxido de carbono atmosférico, la creación y estabilización de suelos, protección de cuencas hidrográficas y el suministro de los recursos naturales, incluyendo alimentos, fibra, combustible, vivienda y medicinas.

La familia de las orquídeas argentinas está representada por 280 especies agrupadas en aproximadamente 78 géneros, de los cuales 33 son epífitos con 98 especies, y 45 son terrestres con 163 especies. Se distribuyen desde Tierra del Fuego hasta Misiones y Jujuy; pero la mayor concentración se encuentra en la región subtropical (selva paranaense y de las yungas) donde se encuentra el 50% de las especies mencionadas (Freuler, 2003). Algunas especies se consideran amenazadas y con algún riesgo de conservación (Cellini, 2009, Frueler, 2003).

A través de la técnica de cultivo “in vitro” se pueden obtener un gran número de plantas, transformándose en una valiosa herramienta cuando se trata de propagar especies en peligro de extinción (Pierik, 1990; Arditti, 1993; Flachslan et al., 1996) o híbridos, desde el punto de vista comercial o del mantenimiento de la biodiversidad; disminuyendo así la presión sobre las poblaciones silvestres.

La aclimatación de plantas cultivadas “in vitro” es la última fase del proceso de micropropagación y es considerada una etapa crítica donde se determina la sobrevivencia y establecimiento de plántulas (Lesar et al., 2012). Es una etapa crítica ya que implica cambios drásticos en la condición de cultivo para las plantas, la cual puede provocar estrés y muerte. Durante el cultivo “in vitro” las plantas presentan un crecimiento anormal con cambios de tipo morfológico, anatómico y fisiológico (Cañal et al., 2001).

Gran parte de la bibliografía sobre aclimatación de orquídeas está basada en la utilización de distintos tipos y mezclas de sustratos inertes, condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (Vidoz et al. 1999; Tadeu de Faria *et al.*, 2001; Deb e Imchen, 2010; Francisco Nava *et al.*, 2011). El proceso debe hacerse en forma gradual y tarda alrededor de dos a tres meses para que las plantitas puedan mantenerse en condiciones de invernáculo. Es escasa la literatura sobre el montaje directo de plantas orquídeas epífitas en palos, y bajo condiciones poco controladas.

El objetivo fue evaluar el comportamiento “ex vitro” de plantas de un híbrido de *Cattleya* mediante el montaje directo en palos.

## Materiales y Métodos

### Cultivo in vitro

Se partió de una cápsula (6,5 cm largo por 3,5 cm de diámetro) en madurez fisiológica de un híbrido producido entre *Cattleya intermedia* x *Cattleya pao de açúcar* (vhl, 2010). La flor se polinizó manualmente el 22/12/09 y se cosecho el 14/09/10 y el 15/09/10 se efectuó la siembra asimbiótica, cultivo y subcultivo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales (Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNER).

Se evaluó la viabilidad de las semillas el 05/11/10, mediante la prueba de tetrazolio (Lallana y García, 2012).

El fruto se desinfectó con alcohol al 70 % e hipoclorito de sodio (55 g/l) durante 5 minutos y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Luego se procedió a la siembra directa en frascos de vidrio de 7 cm de alto por 5,5 cm de diámetro conteniendo 30 ml de medio de cultivo semisólido Murashige & Skoog (1962) a la mitad de la concentración suplementado con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, 5 g.L<sup>-1</sup> de Agar Agar Britania; pH 5,6 – 5,8. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 15 min. Una vez finalizada la siembra los frascos se llevaron a cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1 °C y un fotoperíodo de 16 horas, con luz grow lux. El primer repique de protocormos con dos hojas se hizo el 15/12/10 y luego se realizaron 6 subcultivos hasta mayo de 2012, utilizando el mismo medio de cultivo (M & S, a la mitad de la concentración).

### Aclimatación de las plantas

El 07/08/12 se procedió a la extracción de unas 100 plantas de los frascos e inmediatamente se lavaron las raíces con agua para eliminar todo resto de medio de cultivo. Luego, las plantas se sumergieron una a una en una solución de carbendazim (2 mL / L) y se colocaron de 4 a 5 plantas en vasos de polietileno conteniendo la mitad de su volumen cubierto con piedras moras y tapados con bolsa plástica para mantener la humedad. En estas condiciones permanecieron 3 días a temperatura de laboratorio y con baja intensidad de luz.

Las plántulas para aclimatación, 75 en total, presentaron 5 hojas y 4 raíces en promedio, con 2 cm de longitud de hojas y 2,34 cm de longitud de raíces. Las plántulas se clasificaron en dos grupos: grandes (mayores de 3 cm, con dos o más hojas y raíces), y pequeñas (menores 1,5 cm con una hoja y 1 o 2 raíces).

Las plantas más pequeñas (menos de 2 cm de altura) fueron montadas en bandejas plásticas con musgo de *Sphagnum* humedecido y tapadas. Las tapas fueron agujereadas con un clavo caliente para que haya intercambio de CO<sub>2</sub> con el ambiente y se evapore parte del agua evitando la condensación.

Al tratarse de plantas epífitas, las plantas de mayor tamaño, con buen desarrollo de hojas y raíces se montaron en palos secos de distintas especies (Bignonia, ciprés calvo y eucaliptus). Las plantas se ubicaron en grupos de dos por vez con las raíces en contacto directo con el palo y luego tapadas con hebras de musgo de *Sphagnum* y encima con musgo verde y luego se ataron firmemente con hilo encerado.

Luego, a cada palo se le hizo un soporte especial con alambre de manera que quedaran expuestos en posición de 45° de inclinación una vez colgados en el lugar definitivo. Una vez terminado el montaje y la colocación del soporte, se confeccionaron las respectivas etiquetas identificatorias y se dispusieron por 48 horas en posición horizontal sobre una bandeja amplia con una película de agua de 1 cm, para mantener una atmósfera húmeda y una completa hidratación de los palos.

En el momento de extracción de las plantas de los frascos, a los 120 y 240 días se efectuaron mediciones del número de hojas y raíces por planta, y de la longitud de hojas y raíces, registrando el número de plantas muertas para estimar la sobrevivencia. El porcentaje de sobrevivencia se obtuvo al multiplicar el número de plantas que sobrevivieron al final del periodo de aclimatación por 100, dividiendo el resultado entre el número inicial de plántulas sometidas a este proceso.

Las plantas montadas en palo se mantuvieron dos semanas en condiciones de laboratorio (luz solar difusa) y luego se llevaron al invernáculo con riegos diarios o cada dos días. A los 30 días y luego cada 30 días aproximadamente se efectuó una fertilización NPK (Peters®, 20-20-20) con pulverizador manual. Las plantas pequeñas continuaron en las bandejas, con luz natural al borde de una ventana del laboratorio y a los 95 días se transplantaron a palo.

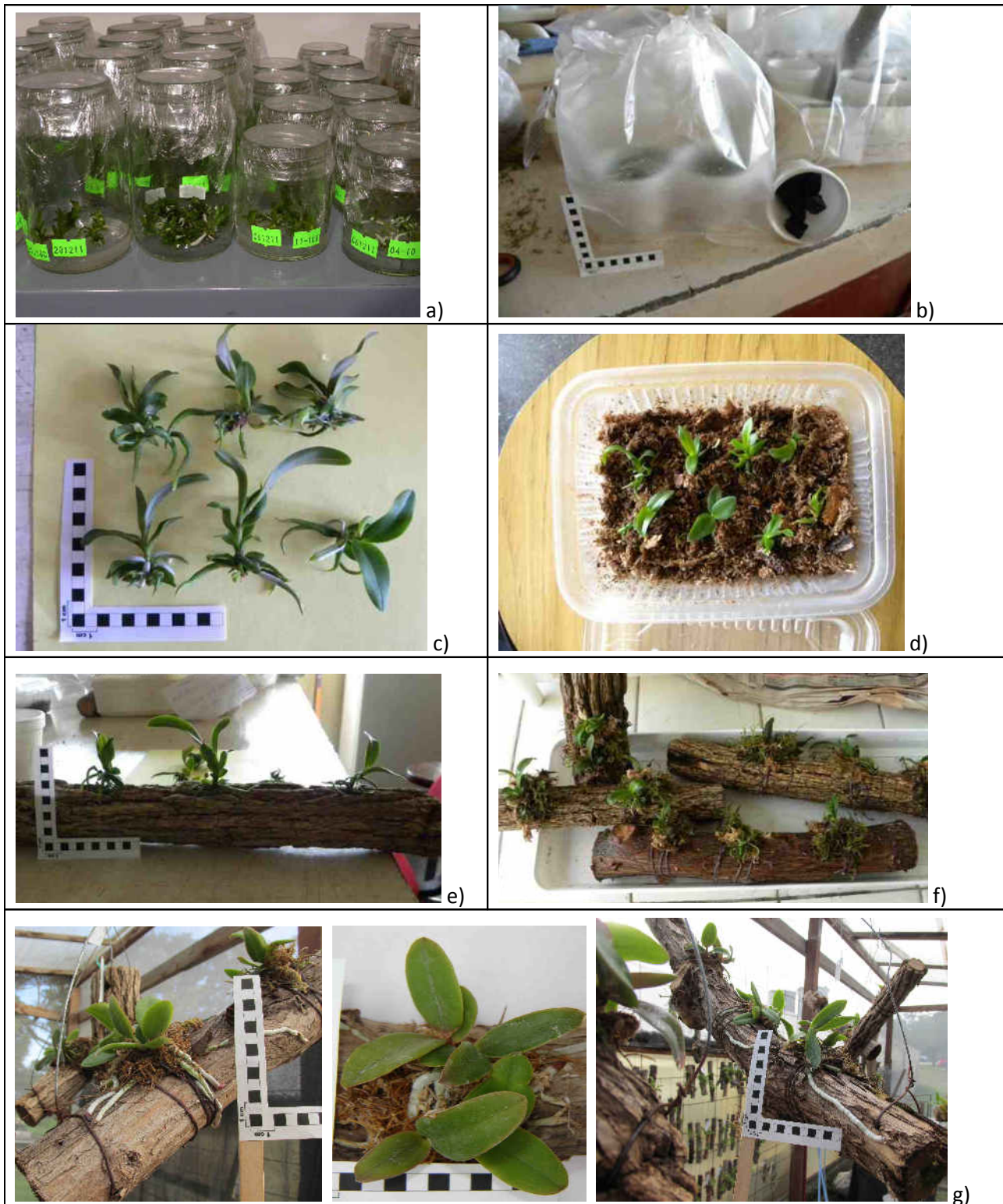
## Resultados

La germinación asimbiótica ocurrió normalmente sin contaminación, al igual que los subcultivos. La viabilidad de las semillas fue del 99%.

Para la aclimatación de las plantas del híbrido de *Cattleya* se estableció el siguiente protocolo:

- 1) Extraer las plantas de los frascos y lavar las raíces
- 2) Aplicar fungicida (en forma líquida sumergiendo las plantas o con aspersor manual)
- 3) Colocar las plantas en cámara húmeda sin sustrato (lecho de piedras), cubriendo con bolsa de nylon y a baja intensidad lumínica (condiciones de laboratorio) durante 3 a 5 días.
- 4) Clasificar las plantas por tamaño, las más chicas (menos de 3 cm de altura) colocarlas en bandejas con musgo de *Sphagnum* humedecido y tapadas, con luz de laboratorio y las más grandes (4 a 6 cm de altura) montarlas en palos
- 5) Ubicar las raíces de las plantas en contacto directo con el palo, luego cubrir con hebras de musgo de *Sphagnum* y atar firmemente (dos a tres vueltas) con hilo encerado. Rotular y colocar un soporte colgante de manera que los palos queden expuestos a 45° de inclinación.
- 6) Humedecer las plantas montadas en palos a saturación (24 a 48 hs.) en una bandeja con una película de 1 cm o más de agua, para mantener la humectación de los palos y de las plantas.
- 7) Llevar las plantas a un umbráculo con una mediasombra (50 a 70 %) o mantenerlas en condiciones de laboratorio próximo a una ventana con luz solar difusa. Regar diariamente o cada dos días, durante 15 días, luego las plantas están en condiciones de ser llevadas a invernáculo con media sombra (50 %). Mantener el riego diario o cada dos días y fertilizar con NPK (20-20-20) 1 g/L, cada 30 días.

En la Figura 1, se ilustran los principales pasos del protocolo.

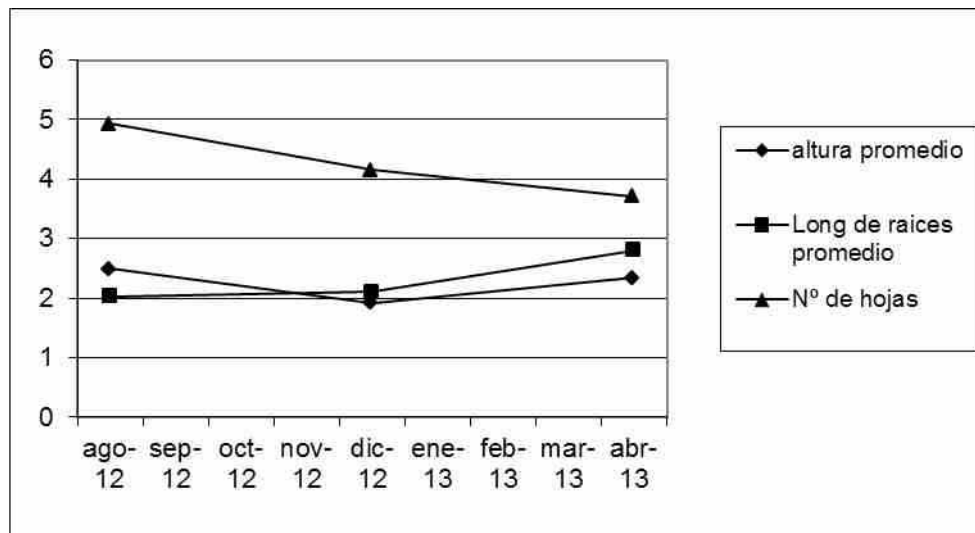


**Figura 1.** Montaje de plantas de *Cattleya* híbrida en palo y fase final de aclimatación (g). a) Cultivo “in vitro”, b) extracción de plantas, desinfección y colocación en vasos de tergorpor (paso 2 y 3, del protocolo), c) clasificación de plantas por tamaño (paso 4), d) siembra de plantas chicas, en bandejas con musgo de *Sphagnum*, e) montaje de las plantas con las raíces en íntimo contacto con el palo (paso 5), f) imbibición de las plantas montadas en palos con musgo de *Sphagnum* (paso 6) y g) estado de crecimiento de las plantas y desarrollo del sistema radical firmemente adherido a

los palos, a los 300 días (junio de 2013). Las escalas en todos los casos corresponden a 1 cm (cuadro negro + cuadro blanco). Fotos: vhl 2012/13 obtenidas con máquina Nikon Coolpix P-90.

**Cuadro 1.** Longitud de hojas, raíces y altura de plantas del híbrido de *Cattleya*, número de hojas y raíces al inicio (07/08/12) y final (08/04/13) del periodo de observación.

		longitud			long de	
		altura (cm)	raíces (cm)	nº de hojas	nº de raíces	hojas (cm)
inicial	promedio	2,50	2,03	5,50	5,55	2,02
	desvio	0,62	0,79	1,47	1,90	0,43
	minimo	1,58	0,77	3,00	3,00	1,49
	maximo	3,93	4,20	9,00	10,00	3,05
final	promedio	2,34	2,80	3,71	3,60	2,41
	desvio	0,73	0,98	0,98	1,57	0,20
	minimo	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
	maximo	4,00	6,00	6,00	7,00	2,69



**Figura 2.** Evolución del número de hojas, longitud de raíces y altura promedio de plantas de *Cattleya* híbrida en condiciones de invernáculo.

El número medio de hojas y raíces disminuyó en el tiempo mientras que la longitud de las hojas y de raíces incrementó levemente (Cuadro 1). El desarrollo de raíces fue muy significativo respecto a la situación inicial observando raíces firmemente adheridas a los palos de longitudes entre 5 y 7 cm (Fig. 1 g). El valor medio de longitud de raíces también aumentó de  $2,35 \pm 1,23$  (inicio) a  $2,80 \pm 0,98$  cm (Fig. 2).

La supervivencia *ex vitro*, a los 240 días de haber iniciado el proceso de aclimatación fue de 78,4 %, obteniéndose un valor más alto con plantas grandes. El mayor porcentaje de mortalidad, ocurrió entre los 60 y 90 días, principalmente en plántulas pequeñas.

### Conclusiones

- 1) A los 240 días de cultivo se logró un alto valor de supervivencia "ex vitro" cercano al 80 %.
- 2) El número medio de hojas y raíces disminuyó en el tiempo mientras que la longitud de las hojas y de raíces incrementó 19 y 18 %, respectivamente
- 3) Se estableció un protocolo para el montaje de plantas de *Cattleya* híbrida en palos.



**Referencias**

- Arditti, J. y R. Ernst (1993). Micropropagation of Orchids. John Wiley & Sons, New York. USA. 640 p.
- Cañal, M.J. Rodríguez, R.; Fernández, B. Sánchez-Tames, R.; Majada, J.P. (2001). Fisiología del cultivo “in vitro”. Biotecnología vegetal 1:3-9.
- Cellini, J.M., L. Salomon, R. Garcia, L. Cellini y M. Sanchez (2009). Límite sur del área de distribución de *Oncidium bifolium* Sims. Bol. Soc. Arg. de Bot. 44 (suplemento):83.
- Deb, C.R.; Inchen, T (2010). An efficient “in vitro” hardening technique of tissue culture raised plants. Biotechnology 9(1):79-83.
- Flachsland, E.; Terada, G.; Rey, H.; Moroginski, L. (1996). Medios de cultivo para germinación in vitro de 41 especies de orquídeas. FACENA. Volumen 12: 93-100.
- Francisco Nava, J.J.; Jiménez-Aparicio, A.R.; De Jesús-Sánchez, A.; Arenas-Ocampo, M.L.; Ventura-Zapata, E.; Evangelista-Lozano, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. F. generadas in vitro. Polibotánica 32: 107-117.
- Freuler, M. J., 2003. 100 Orquídeas Argentinas. Albatros. Buenos Aires. 128 pp.
- Lallana, V.H. y García, F.L. (2012). Conservación de semillas de orquídeas y estudio de su viabilidad en el tiempo. Revista Análisis de Semillas, 6(23):58-61. ISSN 1851-1678
- Lesar, H.; Hlebec, B.; Čeranič, N.; Kastelec, D.; Luthar, Z. (2012). Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under in vitro conditions. Acta agriculturae Slovenica, 99 – 1: 69 – 75.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15:473-497.
- Pierik, R. L. M., 1990. Cultivo “in vitro” de las plantas superiores. Mundi Prensa, p. 301. Madrid.
- Tadeu de Faria, R; Valle Rego, L.; Bernardi, A.; Molinari, H. (2001). Performance of different genotypes of Brazilian orchid cultivation in alternative substrates. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol 44:337-342.
- Vidoz, M. L.; Flachsland, E. A.; Rey, H. Y.; Mroginski, L. A.(1999). Comportamiento ex vitro de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de tres híbridos intergenéricos. 4 p. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. SGCyT, UNNE. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/agrarias/a-005.pdf> [Consulta: 4 de junio de 2013].

