

5. Propagación: macro y micropropagación

Germinación y desarrollo de plántulas “in vitro” de *Oncidium bifolium* Sims var. *bifolium* (Orchidaceae)

Lallana¹, V.H.; Billard¹, C.E.; Klug², L.M.

¹Docentes y ²Becaria. Laboratorio de Cultivos Vegetales, Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos. Proyecto PID-UNER 2144.

Introducción

Oncidium bifolium Sims var. *bifolium* (flor patito, bailarina) es una conocida orquídea epífita nativa cuya distribución es amplia en toda la zona litoral y centro norte del país, siendo la provincia de Buenos Aires su límite austral. En Entre Ríos se encuentra confinada a los cursos de agua de los arroyos y en la zona del delta del Paraná. Su extracción y venta en viveros y puestos callejeros atenta contra su conservación sumando a ello el avance de la frontera agrícola en los últimos años. Para preservar la flora nativa, que es objeto de depredación y de tala de bosques con desaparición de especies, es necesario buscar nuevas formas de propagación. Una de las formas más utilizadas para la propagación de orquídeas (Arditti, 2008) es a través de la propagación sexual simbiótica, y por fragmentos de tallos y pseudobulbos, procesos insuficientes para atender la demanda de producción de nuevas plantas.

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 (Flachsland et al., 1996) o híbridos desde el punto de vista comercial o del mantenimiento de la biodiversidad.

En tal sentido, se ha comenzado en 2010 el desarrollo de un proyecto de investigación (PID 2144) el que se centra en el rescate y propagación de especies nativas de orquídeas de la zona del litoral, en particular las que crecen en la diversidad de hábitats palustres y selvas ribereñas de los arroyos de Entre Ríos, contribuyendo a la preservación de las especies ante el avance de las actividades antrópicas en los ecosistemas.

El objetivo es propagar por técnicas de cultivo “in vitro” especies terrestres y epífitas de orquídeas nativas de la Provincia de Entre Ríos, hasta la etapa de aclimatación de plantas en macetas, confeccionando los respectivos protocolos de micropropagación y aclimatación para las especies evaluadas.

Experiencias realizadas en la Facultad de Agronomía de la UNNE por Flachsland et al., 1996, han probado diversos medios de cultivos para inducir la germinación in vitro de 41 especies de orquídeas, dentro de las cuales la mayoría son nativas de Argentina. Según estas experiencias el agregado de puré de banana y de carbón activado a los medios de cultivos sólidos es beneficioso para la mayoría de las especies. Por otra parte experiencias recientes (Billard y Lallana, 2009) han logrado el cultivo axénico de semillas y la propagación de plantas completas y su aclimatación de dos especies de orquídeas, una nativa de Argentina (*Laelia lundii*) y otra exótica (*Dendrobium kingeanum*), empleando el medio básico de M & S al 50 % con agregado de sacarosa al medio (15 g/l).

El **objetivo** del trabajo fue lograr la germinación “in vitro” y establecimiento de plántulas de *O. bifolium* como fuente de explantos para el cultivo de laminas foliares y pseudobulbos, con vistas a su micropropagación.

Material y métodos

El 13/12/2009 se cosecharon 4 frutos de *O. bifolium* los que midieron, en promedio, 1,9 cm de largo y 0,9 cm de ancho. Uno fue utilizado para extraer sus semillas, pesarlas y realizar estudios de viabilidad con la técnica de tetrazolio y los otros tres frutos, previa desinfección de las cápsulas cerradas, sus semillas fueron sembradas “in vitro”.

Se pesó el contenido total de semillas de un fruto y sobre alícuota de 0,1 mg de semillas se efectuó el recuento de las mismas bajo lupa binocular (Olympus –SZ40). Para la prueba de viabilidad se partió de una alícuota de 4 a 10 miligramos de semillas las que se colocaron en recipientes pequeños de plástico con agua destilada durante 24 horas (imbibición). Luego,

se extrajo el agua con un rollo de papel absorbente cuidando de no tocar las semilla en la base y se agregó la solución de la sal 2,3,5 trifenil de teterazolium al 0,5 %, incubando en oscuridad a 30 °C durante 6 horas (Lallana y Garcia, 2010). Posteriormente la solución conteniendo las semillas se vertieron en una caja de petri de vidrio y con movimientos circulares se homogenizó la solución, luego se colocaron papeles de filtro para eliminar el exceso de agua y lograr que las semillas queden adheridas al vidrio de la caja de pretri. Para el recuento cada caja se dio vuelta y se observó sobre el vidrio, colocando una cuadrícula (1x1cm) impresa sobre acetato y contando 5 cuadros al azar bajo lupa binocular. Para realizar la siembra se trabajó en la cámara de flujo laminar, se estilizaron las cápsulas cerradas con una solución de alcohol 70° durante dos minutos, agitándolas en 4 oportunidades. Luego se retiró el alcohol y se le colocó agua lavandina comercial (con 55 g/L de producto activo) al 50% dejándolas en esta solución durante 30 minutos. Cada 5 minutos se agitó la solución. Posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada esterilizada, pasando entre cada enjuague 1 minuto.

Para el cultivo axénico se preparó el medio de cultivo M&S (1962) a la mitad de su concentración mas el agregado de 15 g.L⁻¹ de sacarosa y carbón activado 0,5 g.L⁻¹. Se esterilizó a 1 atm durante 20 minutos. Al retirar los frascos del autoclave se los colocaron inclinados hasta la solidificación del agar con el objetivo que el agua excedente quede en la base. De esta manera las semillas no toman contacto con el agua. La siembra se efectuó en flujo laminar el día 16/12/09 utilizando 10 frascos de 150 cc de capacidad, los que fueron cubiertos con film de PVC en doble capa y llevados a cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1 °C y un fotoperiodo de 16 horas, con luz grow lux e incandescente. El 14/02/10 y 13/05/10 se efectuaron repiques de protocormos y plántulas respectivamente, utilizando el mismo medio de cultivo. A los 220 días después de la siembra se registró en cuatro plantas de cada frasco, el número de hojas, su longitud y la de la raíz principal sin extraer las plantas de los recipientes y sobre 19 plantas de un frasco se efectuaron las mismas mediciones y el peso fresco y seco.

Resultados y discusión

O. bifolium presentó 95 % de semillas viables. Un miligramo de semillas de *O. bifolium* contiene aproximadamente 1700 semillas muy pequeñas (Fig. 1 B), por lo cual un fruto de 2,5 cm de longitud contiene 693 mg de semillas lo cual equivale a **1.178.100** semillas.

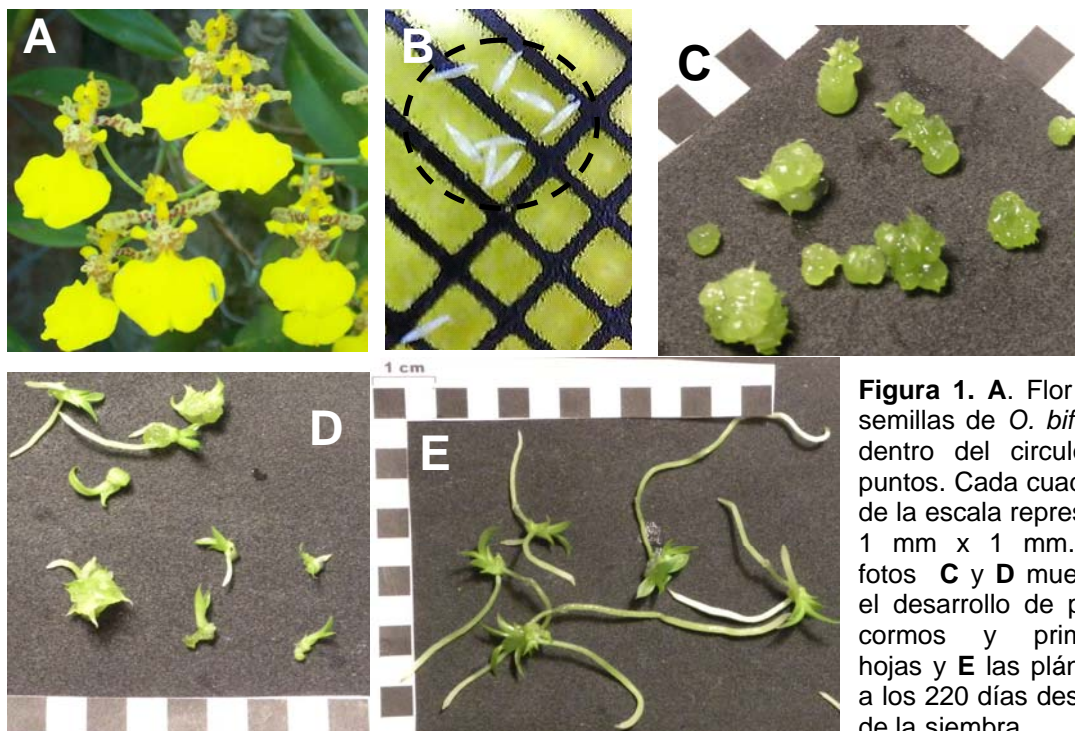


Figura 1. A. Flor y B. semillas de *O. bifolium* dentro del círculo de puntos. Cada cuadrado de la escala representa 1 mm x 1 mm. Las fotos C y D muestran el desarrollo de protocormos y primeras hojas y E las plántulas a los 220 días después de la siembra.

No se registró contaminación en la siembra ni en los repiques, ni muerte de plantas. Al cabo de 120 días de cultivo se observó la formación de protocormos, algunos con esbozo de la primera hoja verdadera. No se observaron semillas sin germinar, por el contrario la germinación fue concordante con el alto porcentaje de viabilidad de las semillas (95%).

El 13/05/10 se efectuó el repique de protocormos en grupos de 8 a 10 por frasco de cultivo y a los 220 días (Cuadro 1) se obtuvo el desarrollo completo de las plántulas con un promedio de 6 hojas por planta, una altura de 1 cm y 1,5 cm de longitud de la raíz principal.

Cuadro 1. Numero de hojas, altura y longitud de la raíz mas larga de plantas de *O. bifolium* a los 220 días después de la siembra.

Frasco	Nº de hojas	Altura (cm)	Long. Raíz (cm)
1	5,25	0,97	0,99
2	6	0,84	1,30
3	6	1,08	1,07
4	5,5	0,99	1,62
5	6,25	0,97	1,50
6	6,25	1,02	1,28
7	7	0,90	1,68
8	6,25	1,03	1,88
9	6	1,08	2,31
10	6	1,07	1,43
Promedio	6,05	0,99	1,50

Las plantas cosechadas del frasco de cultivo número 7 se registraron los siguientes valores: Número de hojas por planta 6; Altura 0,83 cm; Longitud de raíz, 1,79 cm; Longitud de la raíz más larga 2,42 cm; peso fresco 0,797 g y peso seco 0,0724 g. La relación Altura de planta /longitud de raíces (0,46) fue favorable a la parte radicular para las 19 plantitas evaluadas. Estos valores indican una clara ventaja de crecimiento para la parte radical en longitud y con un promedio de 3 raíces por planta en las primeras etapas de crecimiento (Fig. 1 E).

Consideración final

Este material se utilizará para continuar su crecimiento un periodo de 90 días más y proceder a la etapa de aclimatación (ex vitro), otra parte del material se utilizará para extraer explantos (hojas y pseudobulbos) para otros ensayos de regeneración de plantas a través de la inducción "in vitro" de protocormos y yemas.

Se ha logrado el desarrollo de los cultivos libre de contaminación, el establecimiento de protocormos y el desarrollo de plantitas "in vitro", restando ahora plantear la etapa de aclimatación. También se ha puesto a punto la técnica de tinción por tetrazolio para determinar la viabilidad de las semillas.

Referencias bibliográficas

- Arditti, J. Micropropagation of Orchids, Second Edition. (2008). Volumen I y II. Blackwell Publishing. 1523 pp.
- Billard, C.E.; Lallana, V.H. 2009. Aclimatación de plantas de orquídeas obtenidas por germinación in Vitro. Resúmenes de ponencias Pag.18. VI Reunión de Comunicaciones Científicas y técnicas y IV de Extensión. Facultad de Ciencias Agropecuarias –UNER. Oro Verde, 10 de junio de 2009.
- Flachsland, E.; Terada, G.; Rey, H.; Mroginski, L. (1996). Medios de cultivo para la germinación in vitro de 41 especies de orquídeas. FACENA. Volumen 12: 93-100.
- Lallana, V.H.; Garcia, L.F. (2010). Puesta a punto de la prueba de tetrazolio en semillas de orquídeas. Resúmenes, Pág. 8. 75º Reunión de Comunicaciones Científicas de la Asoc. Cienc. Nat. Del Litoral. Santa Fe, 23 de junio de 2010.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.