



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Modalidad: PASANTÍA

TÍTULO

“Efecto sobre el crecimiento de *vitro* plantas de
Gomonia (Miltonidium) Don Aurelio Schinini FCA utilizando
MS y B&G Orquídeas como medios nutritivos”

Pasante: Alumno Alexis Damián HATSEMBILLER

Asesor: Ing. Agr. FLACHSLAND, Eduardo Alberto.

Tribunal evaluador: Lic. Dra. Elsa C. LATTAR.

Ing. Agr. Oscar A. TAFFAREL.

Ing. Agr. Claudio DÁVALOS

Año: 2018

ÍNDICE

Introducción y Antecedente	1
Objetivos	2
Lugar de trabajo	2
Materiales y Métodos	3
Resultados y Discusión	15
Conclusiones	31
Anexos	33
Bibliografía	36

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las orquídeas constituyen la familia de plantas más numerosas del reino vegetal, siendo uno de los componentes de la biodiversidad más significativos en los trópicos y subtrópicos (Hammel, 1990). Comprende alrededor de 750 géneros y entre 30.000 a 35.000 especies. De éstas, un 73% corresponden a especies epífitas, un 20% a especies rupícolas y terrestres y el resto a especies palustres, humícolas y subterráneas (Atwood, 1986; Benzing, 1981; Dressler, 1981).

En la Argentina crecen 87 géneros con 267 especies (Schinini, 2008). Sin embargo, la belleza natural de las orquídeas ha hecho que muchas especies de esta familia botánica sean vulnerables, principalmente por la sobrecolección (con propósito comercial y, en algunos casos, debido al tráfico ilegal) y la pérdida de hábitat como consecuencia de la elevada tasa de deforestación en los trópicos (Olfield, 1985; Lugo, 1988).

Las orquídeas son capaces de multiplicarse agámicamente y a través de semillas, siendo éstas muy pequeñas (0,05 mm a no más de 1,5 mm de largo) y producidas en forma masiva (hasta 5.000.000 por fruto). Pero, éstas semillas presentan un embrión rudimentario constituido por unas pocas células siendo su dispersión fundamentalmente aérea (Bechtel, 1986). La falta de un embrión desarrollado hace que su posterior germinación y desarrollo del plantín -en la naturaleza- sólo sea posible a través de la asociación con hongos micorrízicos (Dressler, 1981). Se calcula que, de cada 10.000 semillas, sólo germinan alrededor de un 1% y que, de estas plantas logradas, sólo llegan a la madurez sexual un 1%.

Vegetativamente son plantas altamente especializadas y se encuentran en un estado evolutivo activo (Bechtel, 1986). Han aprovechado microambientes libres de competencia de otras plantas para sobrevivir y evolucionar, lográndolo a través de diversas estrategias, entre las cuales, la más frecuente es la de ir desarrollando tolerancia frente a situaciones estresantes (falta o exceso de luz, humedad, nutrientes, predadores, etc.). Ésta, es una de las razones por la cual las densidades poblacionales son generalmente bajas y con un alto porcentaje de endemismos (Dressler, 1981).

Debido a las complejas interdependencias existentes entre las orquídeas y su hábitat y a la necesidad de asociarse a hongos micorrízicos para germinar, se considera que son, entre las plantas, las más vulnerables frente a cualquier alteración de sus ambientes naturales (Dressler, 1983). Consecuentemente es lógico esperar un alto riesgo de extinción debido al elevado porcentaje de especies con distribución restringida o endémica (Koopowitz, 1991).

Lewis Knudson desarrolló un método para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas (Knudson, 1921; Yam *et al.*, 2002), y fue el primer procedimiento práctico para la propagación *in vitro* de cualquier planta en condiciones axénicas (libre de contaminantes), demostrando así que era posible la germinación sobre un medio simple que contuviera, sales minerales y azúcares. La investigación desarrollada por Knudson sacudió el mundo de las orquídeas al demostrar que las semillas de *Cattleya* (Lindley), *Vanilla* (Swartz) y otras especies, eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro* (Knudson, 1946). Otros autores como Arditti (1982) y Fast (1980) han contribuido a la formulación de medios de cultivos para muchos géneros y especies diferentes.

Uno de los medios de cultivo más comúnmente empleado en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es el denominado "MS" en honor a los científicos que lo formularon (Toshio Murashige & Folke K. Skoog en 1962), y desde entonces, ha sido probado en la germinación y crecimiento de muchas especies de orquídeas con resultados óptimos gracias a su contenido de sales inorgánicas,

carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, lo que brinda un alto porcentaje de nitrógeno y potasio, necesarios para la nutrición (Murashige & Skoog, 1962).

No obstante, en Argentina, no existen empresas especializadas que comercialicen medios de cultivo para ser aplicados al cultivo *in vitro* de orquídeas. En general, los laboratorios y biotecnólogos de orquídeas se encuentran en problemas a la hora de adquirir los componentes básicos de los medios nutritivos como sales minerales y vitaminas por la reglamentación vigente del SEDRONAR y por el alto costo de las drogas provenientes de importación como los necesarios para la preparación del medio de cultivo “MS”.

Por esta causa, la calidad de los medios nutritivos utilizados ha disminuido drásticamente, producto de la sustitución de componentes encontrados en el mercado, lo que conlleva a una mala calidad de plantas *in vitro* obtenidas en los laboratorios, prolongados períodos de cultivo *in vitro* y lenta adaptación a condiciones *ex vitro* en el invernadero.

Es por ello, que se ha buscado en el mercado biotecnológico regional, alguna empresa radicada en el Mercosur que pudiera suplir y asegurar los medios nutritivos y que a la vez sean de fácil preparación.

En este sentido, la empresa B&G Flores® de Minas Gerais (Brasil) tiene una línea de productos específicos para el cultivo *in vitro* de orquídeas que tienen 14 nutrientes esenciales, azúcar y carbón activado. Es de muy fácil preparación ya que sólo se le agrega agua destilada y agar sin necesidad de ajustar el pH y ha sido formulado para la propagación *in vitro* de los principales géneros de orquídeas, así como también de híbridos comerciales cultivados en el mundo.

OBJETIVOS

- Conocer la metodología empleada en el cultivo *in vitro* de orquídeas.
- Estudiar el crecimiento *in vitro* de plantas de *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA empleando dos medios de cultivo (MS y B&G).
- Aumentar la supervivencia de las plantas a condiciones *ex vitro* mejorando su adaptación a las condiciones de invernadero.
- Posibilitar la transferencia de la metodología del cultivo *in vitro* de orquídeas a otras áreas (pequeños laboratorios y empresas, cooperativas o productores) al reducir los costos y facilitar la preparación de los medios de cultivo.
- Posibilitar que el cultivo *in vitro* sea una alternativa factible de ser transferida para la propagación de especies de orquídeas de difícil reproducción en peligro de extinción.
- Comparar los costos de ambos medios nutritivos, poniendo énfasis en la facilidad de preparación para el desarrollo de pequeños orquicultores regionales.

LUGAR DE TRABAJO

Estas tareas se realizaron en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales y en el invernáculo de Orquídeas de la Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE. Sargento Cabral 2131, Corrientes, ARGENTINA.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

El híbrido con el que se trabajó es *Gomonia* (ex *Miltonidium*) Don Aurelio Schinini FCA, (Fig.1) es resultado de un cruzamiento artificial entre: *Miltonia moreliana* x *Gomesa* (ex *Oncidium*) *bifolia*. Registrado y originado por: Ing. Agr. Eduardo A. Flachsland - Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) - Corrientes - República Argentina. Fecha de Registro: 04 de febrero de 2009.



Este híbrido ha sido muy prolífico en la floración en nuestro clima subtropical y con flores de excelente duración y coloración por lo que se volvió a realizar la hibridación y siembra *in vitro* y que dio origen a esta Pasantía. El híbrido realizado entre ambas especies sudamericanas es de muy fácil cultivo, varas largas (± 50 cm) con 8 a 15 flores de alrededor de 5 cm de diámetro y de excelente durabilidad (± 30 días). La coloración de sus flores es muy intensa y variada, del naranja suave al rosado amarillento con máculas rojas que lo hacen muy apreciado entre los cultivadores. *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA fue nombrado en honor al botánico del IBONE Aurelio Schinini por su contribución a los estudios orquideológicos de Argentina, Paraguay y Brasil e inscripto en la IRAOH de Inglaterra en 2009.

<http://apps.rhs.org.uk/horticulturaldatabase/orchidregister/orchiddetails.asp?ID=909832>

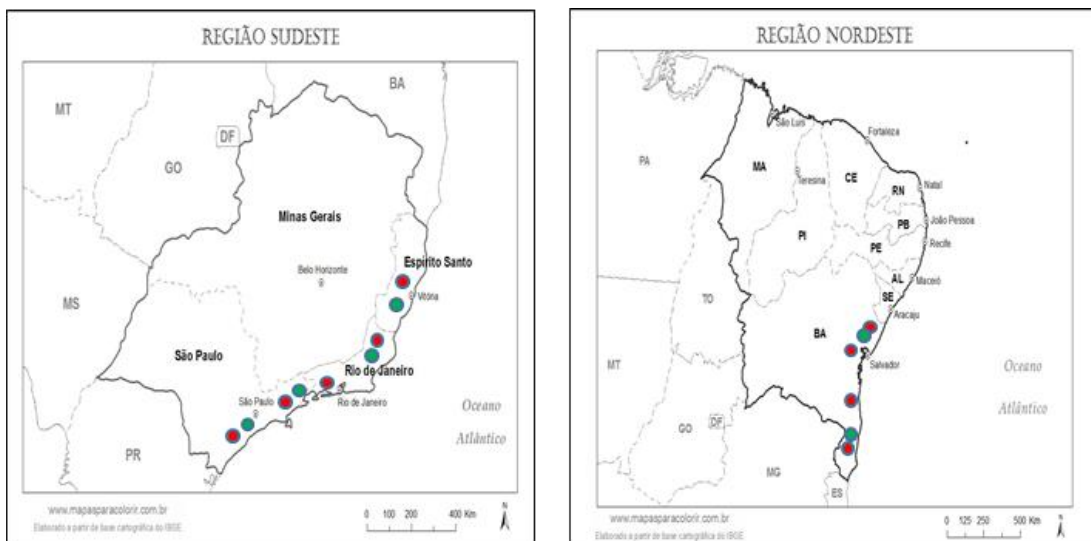
Miltonia moreliana fue considerada durante mucho tiempo como una variedad de *Miltonia spectabilis* (Fig.2). Muchas publicaciones aun la nombran como *Miltonia spectabilis* var *moreliana*.

Clasificaciones taxonómicas actuales consideran a *Miltonia moreliana* (Fig.3) como una especie diferente (Carlini-Garcia *et al.*, 2002). Ambas comparten la misma área de distribución en el litoral brasileño, desde el Estado de San Pablo hasta Bahía (Fig.4). Crece en bosques de montañas bajas con alta humedad, desde el nivel del mar hasta los 800 metros de altitud.

Su floración se da en verano, principalmente en el mes de febrero. La vara floral, presenta una sola flor, la cual, es de unos 7-9 centímetros de ancho con pétalos y sépalos púrpura oscuro. Por la belleza y durabilidad de sus flores es muy cultivada y utilizada en la producción de híbridos y es un componente genético muy importante para el mejoramiento de híbridos intergenéricos resistentes a



temperaturas cálidas. Existe en esta especie una variedad alba (*Miltonia moreliana* var *alba*), aunque con un menor grado de utilización (Fig.5). La mayor cualidad de esta especie es la de transmitir el color púrpura/rojizo que tienen sus flores como así también su forma y fertilidad de sus semillas.



Gomesa bifolia ex *Oncidium bifolium* Sims es una especie nativa de nuestro país y la de más amplia distribución entre las especies de orquídeas argentinas (Fig.6), encontrándose en Catamarca, La Rioja, Salta, Tucumán, Chaco, Corrientes, Entre Ríos y Punta Lara (Bs. As.). Esta última localidad, citada como el extremo más austral de la especie.

Es una planta epífita perenne, que crece adherida por sus raíces a troncos y ramas de árboles hospedadores (Fig.7) en selvas y áreas boscosas. Los pseudobulbos actúan como reservorios de agua y nutrientes. Al crecer, la planta origina hojas y raíces a partir de nuevos pseudobulbos, que se desarrollan en la base de los preexistentes. Puede multiplicarse por división en primavera, siendo recomendable que cada división tenga, al menos, tres pseudobulbos. Es de uso ornamental por su fácil cultivo y mantenimiento, formando bellos racimos de flores amarillas suspendidos en jardines y parques (Fig.8). Esta especie presenta en la naturaleza una gran diversidad en cuanto a la longitud de sus racimos florales (desde 30 cm hasta 180 cm); forma y tamaño de sus pseudobulbos (de 3 hasta 10 cm de longitud); tamaño y número de hojas (desde 1 hasta 3 hojas lanceoladas) y



Fig.6: Mapa de distribución de *Gomesa bifolia* ● en Argentina



Fig. 7



Fig. 8

coloración de sus flores que generalmente son de color amarillo intenso con máculas marrones en sépalos y pétalos, pudiendo medir desde 3 a 5 cm cada una y llegando a contar de 30 a 60 flores o más en cada racimo.

POLINIZACIÓN DE FLORES, FORMACIÓN DE CÁPSULAS Y SEMILLAS Y TRABAJOS PREVIOS AL INICIO DE LA PASANTÍA.

La formación de las cápsulas se realizó de la siguiente forma. 3 flores de *Miltonia moreliana* fueron polinizadas con políneas de *Gomesa bifolia*. Las flores fueron marcadas con un alambre y se colocó una etiqueta con la fecha de polinización (Fig.9). Al cabo de 60 días de realizado, sólo una cápsula continuó con su desarrollo y las restantes se secaron (Fig.10). 5 meses después de la polinización, las semillas fueron sembradas *in vitro* en el medio de cultivo MS utilizándose el sistema de "CÁPSULA CERRADA" que consistió en desinfectar la cápsula con una solución de lavandina al 50% (OCINA al 35%) con el agregado de 3 gotas de Tritón 100 para facilitar el mojado de la misma. Luego de 30 minutos, la cápsula fue lavada con abundante agua destilada estéril. Las tareas de desinfección, corte y siembra en los medios estériles se realizaron en cabina de flujo laminar de aire estéril. 10 frascos de 150 mL conteniendo 30 mL de MS fueron sembrados y al cabo de 3 meses se comenzaron los repiques o recultivo a medios frescos de similar composición. 3 repiques en total se realizaron al cabo de 9 meses de cultivo para poder tener plantas bien formadas e iniciar esta Pasantía.

ACLARACIÓN IMPORTANTE: La siembra se realizó en MS sólo porque al momento de la maduración de la cápsula y en los sucesivos repiques, no se contaba con el medio B&G.



Fig. 9

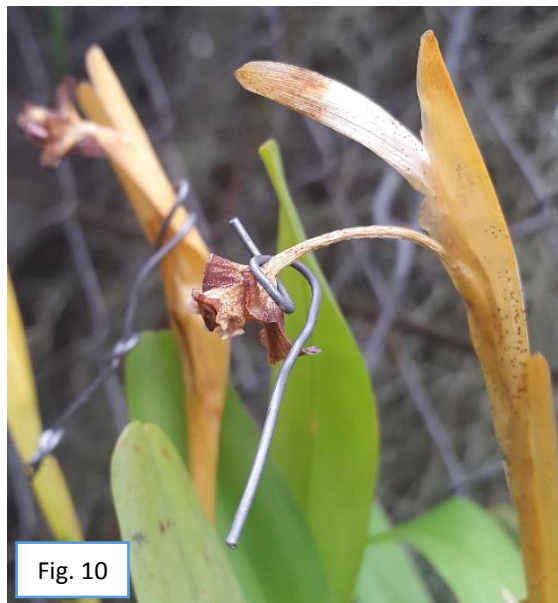


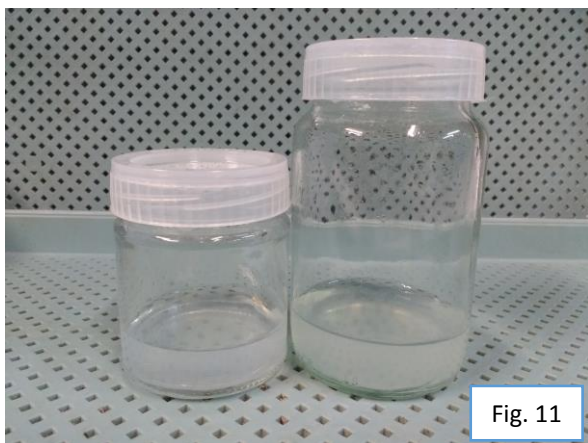
Fig. 10

MATERIAL DE VIDRIO y MEDIOS NUTRITIVOS

En la presente pasantía se trabajó con dos tamaños de frascos de vidrio y con los medios nutritivos MS (Fig.11) y B&G (Fig.12)

- Frascos de 150 mL conteniendo 30 mL de medio nutritivo.
- Frascos de 350 mL conteniendo 80 mL de medio nutritivo.

Ambos frascos fueron tapados con tapas transparentes de policarbonato durante toda la duración de los experimentos.



COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS

Se emplearon dos medios de cultivo:

- A) Murashige & Skoog (1962) “MS” (Tabla 1)
B) B&G Flores y Orquídeas (comercial) (Tabla 2)

COMPUESTOS	MEDIO BASAL MS [mg/L]
NH₄NO₃	1.650
KNO₃	1.900
MgSO₄·7H₂O	370
KH₂PO₄	170
CaCl₂·2H₂O	440
FeEDTA	33
H₃BO₃	6,2
MnSO₄·H₂O	22,3
ZnSO₄·7H₂O	8,6
KI	0,83
Na₂MoO₄·2H₂O	0,25
CoCl₂·6H₂O	0,025
Glicina	2
Tiamina.HCl	0,1
Piridoxina.HCl	0,5
Ácido Nicotínico	0,5
Myo-INOSITOL	100
Sacarosa	30 g/L

Tabla 1. Composición nutritiva del medio basal MS.

En cuanto al medio nutritivo B&G Orquídeas al ser comercial no se conoce con certeza su composición, pero se sabe que tiene 14 nutrientes esenciales, azúcar y carbón activado (Fig.13 y Fig.14).

NUTRIENTES	MEDIO BASAL B&G ORQUIDEAS (%)
N	0,9077
P2O5	1,2064
S	0,3146
K2O	2,3617
Ca	0,3906
Mg	0,0687
Cl	0,3000
Mo	0,0001
B	0,0051
Fe	0,0160
Zn	0,0043
Cu	0,0009
Mn	0,0090
Na	0,0111
Carbón activado	4 g/L
Sacarosa	30 g/L

Tabla 2. Composición nutritiva expresada en porcentaje del medio basal B&G.



Fig. 13



Fig. 14

MATERIAL VEGETAL *IN VITRO*

Plantas *in vitro* de 9 meses de edad de *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA (cultivadas en el medio basal MS) fueron clasificadas en dos tamaños diferentes:

- A) Plantas Chicas (comprendidas entre 0,5 y 1 cm de longitud cuyo promedio fue de 0,76 cm) (Fig.15 *)
- B) Plantas Grandes (comprendidas entre 1 y 2 cm de longitud con un promedio de 1,39 cm) (Fig.15 **).



PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS

Los medios fueron solidificados con Agar “Doña Clara” (comercial y de pureza no definida) a razón de 7 g/L para el MS, previo ajuste del pH a 5,5 con HCl y/o KOH y 14 g/L para el B&G sin la necesidad de ajustar el pH. Los frascos fueron obturados con tapas plásticas transparentes.

La esterilización se realizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 1 atm de presión.

Los frascos que contenían el medio B&G, fueron agitados suavemente antes de su enfriado a temperatura ambiente para mantener en suspensión al carbón activado y lograr una distribución homogénea del mismo.

CONSIDERACIONES ESPECIALES PARA LA PREPARACIÓN DEL MS Y B&G

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y crecimiento de los cultivos *in vitro*. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos.

Básicamente, los medios de cultivo se componen de:

- Nutrientes minerales (macro y micro nutrientes)
- Fuente de carbono (azúcares)
- Sustancias vitamínicas y aminoácidos
- Sustancias reguladoras del crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas)
- Agentes gelificante (agar agar, phytagel, agargel)
- Otros compuestos orgánicos de composición no bien definida (carbón activado, puré de banana verde, puré de papa, agua de coco, pulpa de ananá, jugo de naranja)

PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE 1000 mL DE SOLUCIÓN STOCK DE MS CONCENTRADO X10

El medio nutritivo MS fue formulado y publicado por Toshio Murashige y Folke Skoog en el año 1962 en la Universidad de Wisconsin (EEUU) experimentando con tejidos de tabacos y modificado de la solución nutritiva de White. Dada la gran cantidad de volumen que de este medio nutritivo se usa en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, se adoptó la metodología de prepararlo concentrado x10 veces para disminuir el espacio necesario para su conservación en freezer a -20 °C. También se congela con la sacarosa incorporada dado que impide la precipitación de sales, probablemente por disminuir el potencial osmótico de la solución haciéndola más estable.

Para la preparación de la Solución Stock de MS concentrado x10 ($[MS]^{x10}$), se procedió a acomodar las once drogas necesarias en la mesada del laboratorio de la Cátedra de Fisiología Vegetal una al lado de la otra, con mesada bien limpia y siguiendo el orden de solubilización. Se pesaron por separada las drogas correspondientes y se colocaron en un vaso de precipitado de 150 mL; por ejemplo: $(NH_4)NO_3$ 16,5 gr; KNO_3 19 gr, etc. Luego se le agregó a cada vaso de precipitado con la droga pesada, agua deionizada ligeramente tibia para disolver las sales. Las drogas disueltas se fueron volcando en un vaso de precipitado de 1000 mL en su respectivo orden de solubilidad. Se añadió posteriormente 100 mL de solución F y 10 mL de la solución Z (Ver preparación más adelante). Por último, se pesó y agregó 300 gr de sacarosa en 1000 mL de solución y una vez estén todas las drogas en el vaso de precipitado se enrasó con agua deionizada a 1000 mL. Con varilla de teflón se agitó hasta completar la disolución de la sacarosa. Se envasó en

recipientes de plástico perfectamente identificados (tapa y cuerpo del envase) con la sigla MSx10 y la fecha de preparación. Rápidamente se procedió a colocar los recipientes en el Freezer de -20 °C

Preparación de Solución F y Z: La Solución F del MS están constituidas por compuestos orgánicos, básicamente un alcohol-azúcar, un aminoácido y Vitaminas del Complejo B. La Solución Z está constituida por micronutrientes en muy baja concentración por lo que es más práctico preparar una solución concentrada de las mismas para poder entrar en escala de pesada en función a la sensibilidad de la balanza utilizada.

Para preparar 1000 mL de la solución F, se pesaron las drogas por separado y se colocaron en vasos de precipitados de 50 mL; por ejemplo, Myoinositol 100 mg; Ác. Nicotínico 0,5 mg. Se llevó a volumen de 1000 mL con agua deionizada. De la misma manera se procedió con la preparación de 1000 mL de la solución Z. Con varilla de teflón se agitó hasta completar la disolución de cada uno de los componentes. Se envasó en recipientes de plástico perfectamente identificado (tapa y cuerpo del envase) con la sigla SOL F o SOL Z y la fecha de preparación. Rápidamente se procedió a colocar los recipientes en el Freezer a -20 °C.

1) Pesar y colocar cada droga en un vaso de precipitado y disolver correctamente con una mínima cantidad de agua destilada. De ser necesario, calentar levemente el agua para mejorar la disolución.

Orden Solubilización	Droga	MS (g/L)	[MS] ^{x10} (g/L)	
1	(NH ₄)NO ₃	1,65	16,5	
2	KNO ₃	1,9	19	Disolver en agua tibia
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37	3,7	
4	KH ₂ OPO ₄	0,17	1,7	Disolver en agua tibia
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44	4,4	CaCl ₂ anhidro pesar 3,325g y solubilizar en agua fría
6	Na ₂ EDTA	0,0373	0,373	Disolver EDTA en 200 mL de agua y una vez disuelto agregar el FeSO ₄ .7H ₂ O. FeEDTA (FW:367,1) agregar 0.033 g/L ó [0,33g/L] ^{x10}
7	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0278	0,278	
8	H ₃ BO ₃	0,0062	0,062	
9	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,0223	0,223	
10	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0086	0,086	
11	KI	0,00083	0,0083	

2) Agregar 100 ml/L de **Solución F** para 1000 mL

3) Agregar 10 ml/L de **Solución Z** para 1000 mL

2) Preparación Solución F

Pesar y disolver las siguientes drogas y enrasar a 1000 mL con agua bidestilada.

Solución F	MS	[MSx100]
Droga	(mg/L)	(mg/L)
Myoinositol	100	10.000
Ác. Nicotínico	0.5	50
Piridoxina-HCl	0.5	50
Glicina	2	200
Tiamina-HCl	0.1	10

3) Preparación Solución Z

Pesar y disolver las siguientes drogas y enrasar a 1000 mL con agua bidestilada.

Solución Z	MS	[MSx1000]
Droga	(mg/L)	(mg/L)
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	25

4) Agregar 300 g de **Sacarosa** y enrasar a 1000 mL con agua deionizada. Agitar hasta completa disolución. Envasar, rotular y llevar a -20 °C.

Preparación MS (Normal: diluido 10 veces)

Los medios basales de Murashige & Skoog (1962-MS), se sacaba del congelador de -20°C y se descongelaban con una microonda. Una vez descongelados se procedía a colocar en un vaso de precipitado 100 mL/L del medio basal MS midiendo con una probeta de 100 mL, luego con agua deionizada se lo llevó a volumen de 1000 mL (para un vaso de 1000 mL). Posteriormente se reguló el pH con pHchímetro marca ALTRONIX® modelo TPX1 a 5,5 ajustándose con HCl y/o K(OH), luego se pesó el agar “Doña Clara” 7 g/L y se agregó al vaso de precipitado, éste se lo colocó último por ser de naturaleza inerte y para no ensuciar el electrodo del pHchímetro con el agar. Finalmente, se lo disolvió en microondas hasta ebullición y fue dispensado en frascos (sin la necesidad de agitarlo) y autoclavado (esterilizado).

PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE 1000 mL DE SOLUCION DE B&G flores y Orquídeas

Ya viene formulado de fábrica en presentación sólida.

Preparación:

Colocar en un vaso de precipitado 1 sobre de 47 g por cada 1000 mL de solución a preparar. Llevar a volumen con agua deionizada. Agregar el agar a razón de 14 g/L (agar “Doña Clara”). Finalmente, se lo disolvió en microondas hasta ebullición y fue dispensado en frascos. Luego del autoclavado y estando el medio caliente, se lo agitó suavemente para mantener el Carbón Activado en suspensión y homogéneamente distribuido.

DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS

En total se realizaron 8 Tratamientos resultando de la combinación de: Tamaño de Plantas (Chicas y Grandes); Medios de Cultivo (MS y B&G) y Tamaño de Frascos (150 y 350 mL) que se resumen en el siguiente cuadro.

1) Plantas Chicas – MS – Frascos Chicos.	2) Plantas Chicas – B&G – Frascos Chicos
3) Plantas Grandes – MS – Frascos Chicos	4) Plantas Grandes – B&G – Frascos Chicos
5) Plantas Chicas – MS – Frascos Grandes	6) Plantas Chicas – B&G – Frascos Grandes
7) Plantas Grandes – MS – Frascos Grandes	8) Plantas Grandes – B&G – Frascos Grandes

CULTIVO E INCUBACIÓN DE LOS FRASCOS

El cultivo *in vitro* se realizó en una cabina de flujo laminar de aire estéril y se colocaron 10 plantas por tratamiento para disminuir la competencia de nutrientes y luz entre ellas y obtener plantas más robustas y así mejorar las probabilidades de éxitos en la etapa de aclimatación *ex vitro*. En cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones con un total de 50 plantas en cada uno de ellos.

Posteriormente los frascos se incubaron en un cuarto climatizado a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 14 hs de luz provista por tubos fluorescentes Philips TLD 36w/840 y una intensidad de $116\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

El cultivo inicial se llevó a cabo el 27 de abril de 2016 (a los 9 meses de realizada la siembra) y el día 30 de Julio de 2016 (aproximadamente 3 meses después) se transfirieron a medios frescos de igual composición.

PARÁMETROS EVALUADOS

Se seleccionaron 20 plantas de cada tratamiento (2 frasco/tratamiento) y se realizaron mediciones de los siguientes parámetros de crecimiento:

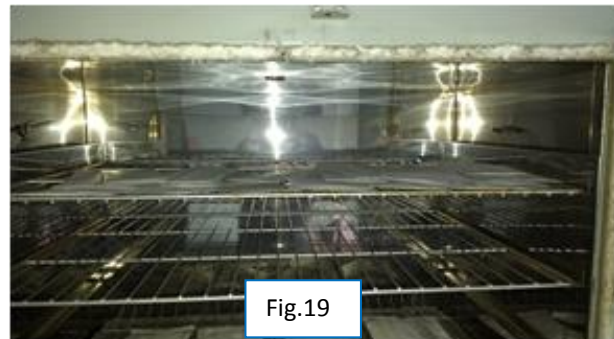
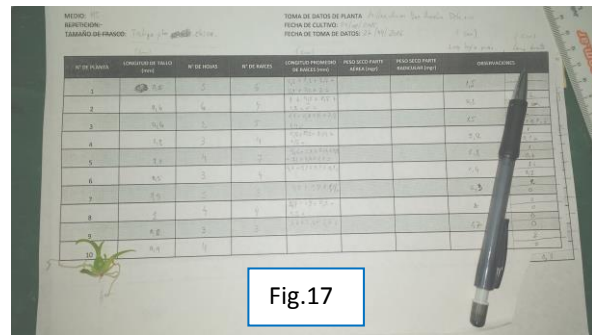
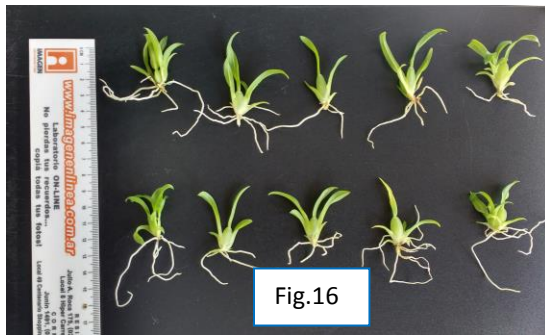
1. (A) Número de hojas; (B) brotes y (C) raíces.
2. (D) Longitud de vástagos y (E) longitud de raíces.
3. (F) Peso seco de vástagos y (G) Peso seco de raíces.
4. (H) Supervivencia de las plantas a condiciones de invernadero a los 60 días de trasplantadas.

Los parámetros evaluados fueron analizados calculando los valores promedio de las repeticiones, teniendo en cuenta su desvío estándar. Los datos fueron sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de las medias fue realizada usando el Test de Tukey ($P<0,05$). Para ello se utilizó el programa estadístico Infostat.

El 26 de noviembre de 2016 (aproximadamente a los 7 meses de cultivados) se procedió a la extracción de 20 plantas (2 frascos) por tratamiento. Las medidas de longitud se tomaron con ayuda de una regla milimetrada y se confeccionaron planillas para su anotación (Fig.16 y Fig.17).

El peso seco se realizó llevando las plantas a estufa a 80°C hasta pesos constantes (Fig.18 y Fig.19) y luego fueron pesadas en una balanza analítica digital (96 hs en promedio).

Las restantes plantas fueron utilizadas para el pasaje *ex vitro* para evaluar su comportamiento y analizar su supervivencia en condiciones de invernadero.



PASAJE A CONDICIONES *EX VITRO*

Para el pasaje de plantas *ex vitro*, se extrajeron de los frascos y se lavaron cuidadosamente con agua corriente hasta quitar todo el medio de cultivo cuidando de no romper las raíces. Luego se las plantó en vasos térmicos (50 mL) en cuyo fondo se colocó piedras para facilitar el drenaje y posteriormente una mezcla de musgo *Sphagnum* y cáscara de pino en trozos pequeños de tal manera que la planta quede firmemente plantada. Algunas plantas fueron plantadas en bandejas de germinación de 50 celdas para ver su comportamiento en vivero (datos no publicados).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Se detallan a continuación los parámetros de crecimiento que se midieron (20 plantas por tratamiento) en los 8 experimentos que se programaron en esta Pasantía.

1. (A) Número de Hojas/planta (h/p)
(B) Número de Brotes/planta (b/p)
(C) Número de Raíces/planta (r/p)
2. (D) Longitud de Vástagos (mm)
(E) Longitud de Raíces (mm)
3. (F) Peso Seco de Vástagos (mg)
(G) Peso Seco de Raíces (mg)
4. (H) Supervivencia de las plantas a condiciones de invernadero a los 60 días de trasplantadas.

Un mayor número de hojas en cada planta, al momento del pasaje a condiciones de invernadero, podría resultar beneficioso debido a una mayor tasa fotosintética. Esta fase es muy crítica y representa en algunos casos, un factor limitante en el proceso de micropropagación dado que las plantas salidas de los frascos sufren un estrés debido a que en el interior de los mismos, poseen humedad relativa cercana al 100%, intensidad de luz baja ($110 - 150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), nutrientes y azúcar disponibles. Es una planta absolutamente HETERÓTRÓFICA.

En condiciones de invernadero esta situación cambia drásticamente puesto que las plantas deben cambiar su condición de HETERÓTROFAS a AUTÓTROFAS obligadas.

Una planta, aparentemente perfecta en condiciones *in vitro*, presenta una serie de deficiencias anatómicas que dificultan el control de la transpiración, permitiendo una rápida pérdida de agua debido a que los estomas no son funcionales en su totalidad y responden muy lentamente al estrés hídrico. La cera cuticular protectora sobre sus hojas es mínima o inexistente, y se agrava la situación si a esto sumamos un sistema radicular y órgano de reserva (pseudobulbo) poco desarrollado o deficiente y que no alcanza a proveer el agua demandada por la transpiración de las hojas. Debido a ello, es fundamental mantener la humedad relativa alta, luego que la planta es retirada del medio de cultivo hasta que empieza a crecer nuevamente en los recipientes trasplantados y se le debe suministrar luz difusa para mejorar la funcionalidad de las hojas.

Dada la cantidad de parámetros estudiados, se decidió ordenar la discusión de los resultados en función al tamaño de las plantas cultivadas al inicio de los experimentos: PLANTAS CHICAS [pl.ch.] (0,5 a 1 cm) y PLANTAS GRANDES [PL.GR.] (1 a 2 cm).

El crecimiento de *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA estuvo muy influenciado respecto al recipiente de vidrio en que fue cultivado; FRASCOS CHICOS [fr.ch.] (150 mL conteniendo 30 mL de medio de cultivo) y FRASCOS GRANDES [FR.GR.] (350 mL conteniendo 80 mL de medio de cultivo).

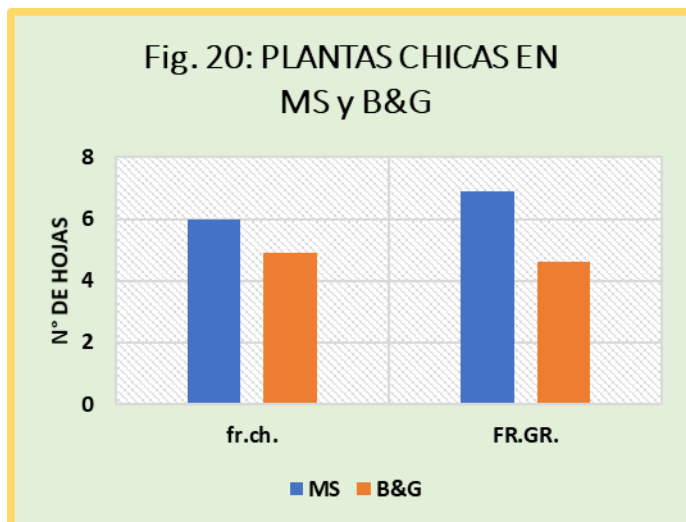
Por último, el Medio de Cultivo fue el desencadenante de esta PASANTÍA. Poder acceder de forma práctica, segura y rápida a un medio nutritivo comercial, posibilitó comparar al tradicional "MS" respecto al novel "B&G" y de sus resultados generar cambios que faciliten, a futuro, mejores plantas *in vitro*, menores tiempos de cultivo en laboratorio, menores costos en insumos y facilidad operativa en la preparación de medios nutricionales.

Si bien esta Pasantía estuvo enfocada en aspectos biotecnológicos *per se*, y así lo demuestra el título de la misma: "Efecto sobre el crecimiento de *in vitro* plantas de *Gomonia* (*Miltonidium*) Don Aurelio Schinini FCA utilizando MS y B&G Orquídeas como medios nutritivos" y, dado la posibilidad de generar datos relevantes con las plantas en condiciones *ex vitro*, también se dio especial atención a la supervivencia de las mismas en el invernadero ya que la mayoría de los

trabajos en biotecnología de orquídeas enfatizan metodológicamente muy bien las tareas dentro del laboratorio, descuidando o aún más, no informando sobre esta última etapa del proceso productivo que es la sobrevivencia de las *vitro* plantas en su destino final: el invernadero. En tal sentido, se informa sobre las tareas sencillas que involucraron el llamado “pasaje *ex vitro*” y se sugiere algunos consejos de cómo llevarlos a cabo para incrementar el éxito de los mismos.

1) (A) NÚMERO DE HOJAS/PLANTA [h/p]

PLANTAS CHICAS (pl.ch.)



En [pl.ch.-fr.ch.], el mayor valor en cuanto al número de hojas por planta se obtuvo en el medio “MS” con 6 h/p, superior al medio “B&G” con un valor de 4,9 h/p.

En [pl.ch.-FR.GR.], el mayor valor en cuanto al número de hojas por planta se obtuvo también en el medio “MS” con 6,9 h/p, superior al medio “B&G” que resultó con 4,6 h/p.

Tanto en fr.ch. como en FR.GR. el medio de cultivo “MS” dio los mayores valores en cuanto al número de hojas por planta poniendo en

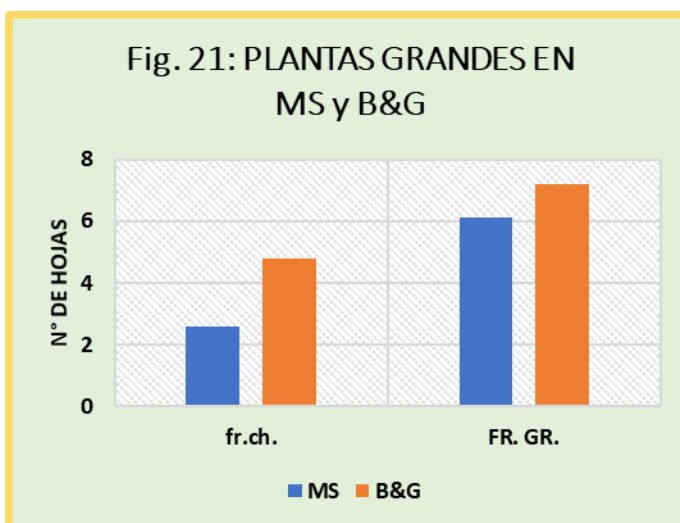
evidencia la influencia nutritiva del medio de cultivo MS con respecto a este parámetro de crecimiento (Fig.20) e independiente del tamaño del recipiente de cultivo (fr.ch.=150 mL o FR.GR.=350 mL). Las plantas chicas (0,5 a 1 cm) presentan hojas muy pequeñas y en pleno proceso de desarrollo y es probable que ellas continúen con su crecimiento en un medio más “orgánico” como lo es el **MS** respecto a uno más “inorgánico” como el **B&G**.

PLANTAS GRANDES (PL.GR.)

En [PL.GR.-fr.ch.], la mayor cantidad de número de hojas por planta se obtuvo en “B&G” con 4,8 h/p, seguido por “MS” con 2,6 h/p (Fig. 21).

En [PL.GR.-FR.GR.], el mayor valor medio de número de hojas por planta se obtuvo en “B&G” con 7,2 h/p y luego el medio “MS” con 6,1 h/p.

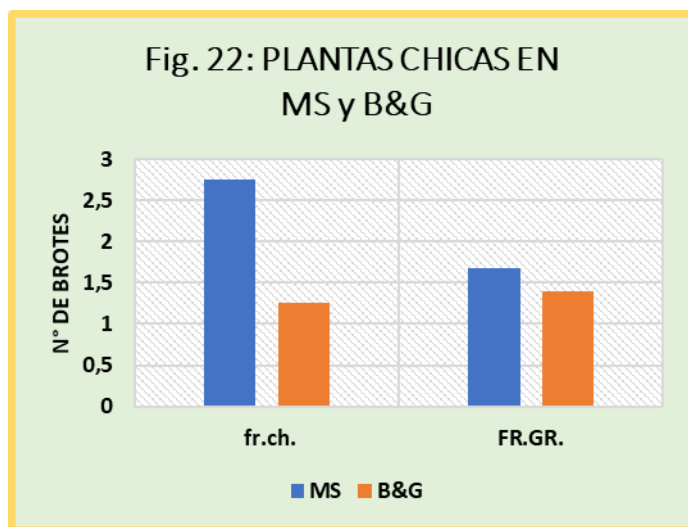
Aquí se observó que, en ambos tamaños de frascos, “B&G” fue el medio nutritivo que mayor número de hojas/planta formó, demostrando la influencia nutritiva del medio de cultivo cuando el explante inicial son plantas grandes (1 a 2 cm). También se visualiza que en **FR.GR.** se obtuvieron los mayores valores de éste parámetro.



1) (B) NÚMERO DE BROTES /PLANTA [b/p]

En la mayoría de los trabajos en orquídeas, no se cita el parámetro estudiado en esta Pasantía (probablemente porque queda reflejado en el Peso Seco por Planta). Es deseable que cada planta tenga el mayor número de brotes desarrolladas al momento de proceder a su transferencia *ex vitro*. Dependiendo de las condiciones *in vitro*, éstos brotes podrán transformarse en pseudobulbos con una mayor reserva de agua y nutrientes, condición directamente relacionada con la calidad de los nutrientes que aporten los medios nutricios. En condiciones *ex vitro* y aun habiendo perdido hojas, la brotación y adaptación de las plantas será más rápida en aquellas que presenten pseudobulbos bien desarrollados en condiciones heterotróficas.

PLANTAS CHICAS (pl.ch.)



En [pl.ch.-fr.ch.] (Fig. 22), el medio nutritivo “MS” arrojó un valor medio de 2,7 b/p superior al medio nutritivo “B&G” con 1,2 b/p indicando la influencia del medio MS en el desarrollo de los pseudobulbos al cabo de 7 meses de crecimiento.

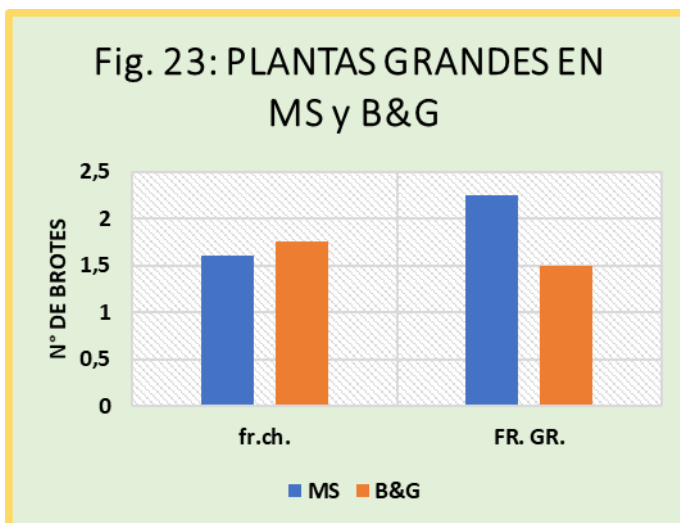
En [pl.ch.-FR.GR.] al igual que en el caso anterior, se obtuvo el mayor resultado en “MS” con un valor medio de 1,6 brotes/planta, pero con una diferencia poco marcada respecto a “B&G” que fue de 1,4 b/p. En ambos tamaños de frascos, el “MS” fue

superior al “B&G”. Es probable que el crecimiento de los pseudobulbos observados en los frascos chicos esté influenciado por la formación y acumulación de Etileno en la atmósfera del mismo y es sabido que ésta hormona gaseosa, es promotora de la tuberización en varias especies de plantas. Las plantas pequeñas son más sensibles que plantas grandes. Los frascos grandes, al tener una atmósfera mayor, su efecto es más deletéreo. El medio B&G tiene en su composición carbón activado que podría estar adsorbiendo al Etileno e impidiendo su manifestación en el crecimiento de los vástagos o brotes.

PLANTAS GRANDES (PL.GR.)

En [PL.GR.-fr.ch.] (Fig. 23) se obtuvo el mayor valor en “B&G” con 1,7 b/p seguido de “MS” con 1,6 b/p.

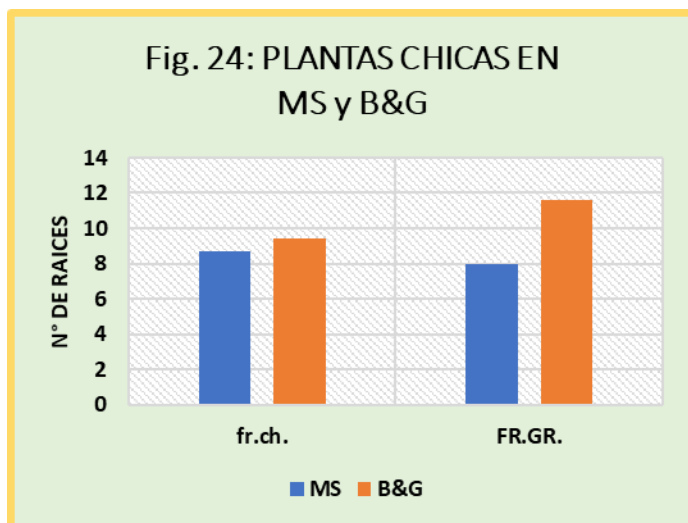
En cambio, en [PL.GR.-FR.GR.] el “MS” obtuvo el mayor valor con 2,2 b/p, seguido del obtenido en “B&G” con 1,5 b/p.



1) (C) NÚMERO DE RAÍCES/PLANTAS [r/p]

Las raíces en plantas *in vitro* tienen una especial significancia porque son los órganos de fijación y transporte de agua y nutrientes desde el medio semisólido. También es muy importante para la etapa posterior de aclimatación de las plantas a condiciones de invernadero. En las plantas de orquídeas de hábitos terrestres, es fundamental contar con el mayor número y peso seco de raíces puesto que son los órganos naturales de reserva.

PLANTAS CHICAS (pl.ch.)



De acuerdo con los datos obtenidos de *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA (Fig. 24), observamos que:

En **[pl.ch.-fr.ch.]** el mayor valor medio en cuanto al número de raíces por planta fue en “B&G” con 9,4 r/p seguido por “MS” con 8,7 r/p.

En **[pl.ch.-FR.GR.]** el mayor valor también se da en “B&G” con 11,6 r/p seguido por “MS” con 8 r/p.

Como se evidencia, el medio “B&G” supera al “MS” en este parámetro de crecimiento en ambos tamaños de frascos, denotando la

influencia nutritiva del medio. Si bien el mayor valor se obtuvo en FR.GR., la influencia del tamaño de frasco puede deberse al mayor volumen de medio de cultivo del mismo: 80 mL/FR.GR. versus 30 mL/fr.ch.

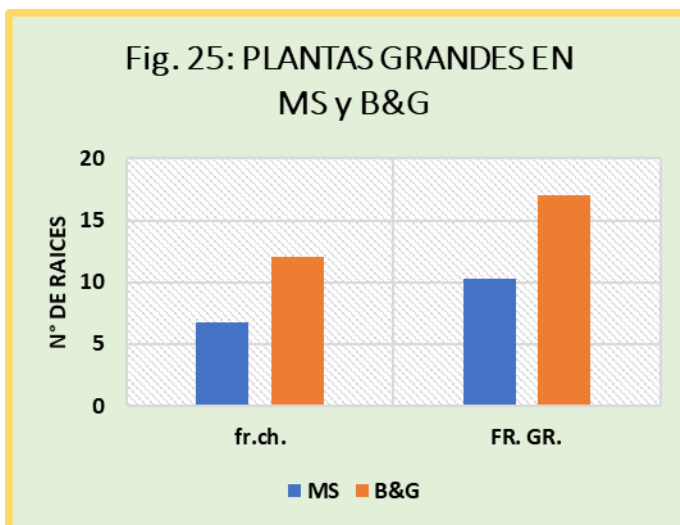
PLANTAS GRANDES (PL.GR.)

En la Figura 25 observamos que:

En **[PL.GR.-fr.ch.]**, el mayor número de raíces/planta se registró en “B&G” con 12 r/p, siendo prácticamente el doble al “MS” con 6,7 r/p.

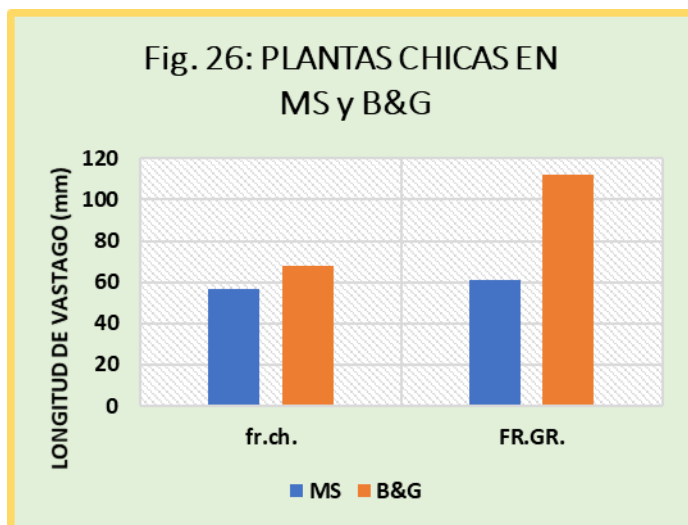
En **[PL.GR-FR.GR.]** fue semejante al caso anterior donde el mayor valor se obtuvo en “B&G” con 17 r/p seguido por “MS” con 10,3 r/p.

Con este experimento se evidenció que el medio “B&G” supera al “MS” en este parámetro de crecimiento y en ambos tamaños de frascos. Tanto las plantas chicas como las plantas grandes, enraízan mejor en B&G y la influencia del tamaño de frasco es debido a un mayor volumen de medio de cultivo explorado por las raíces.



1) (D) LONGITUD DE VÁSTAGOS (PSEUDOBULBO + HOJA DE MÁXIMA LONGITUD)

PLANTAS CHICAS (pl.ch.)



En el siguiente gráfico (Fig. 26) se observa que:

En [pl.ch.-fr.ch.] se obtuvo el mayor valor medio de longitud de vástago en "B&G" con 68,1 mm, seguido por "MS" con 56,9 mm.

En [pl.ch.-FR.GR.] el mayor valor también se da en "B&G" con 111,9 mm, seguido por "MS" con 61,2 mm.

En ambos tamaños de frascos el medio "B&G" fue superior, aunque en FR.GR. fue más notorio.

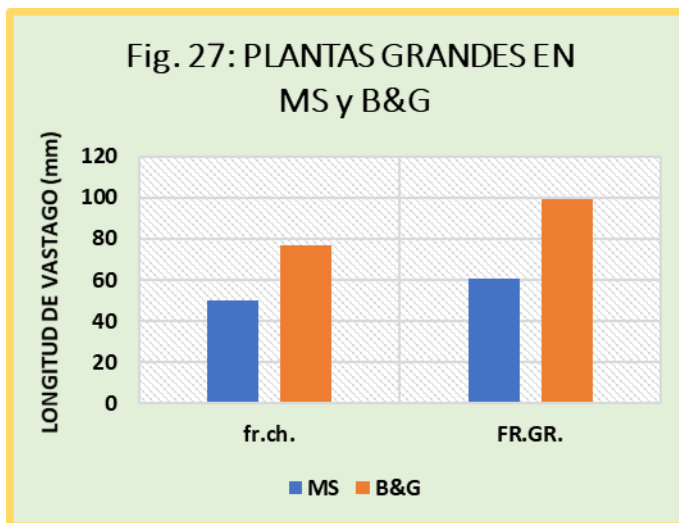
PLANTAS GRANDES (PL.GR.)

En la Figura 27 se puede observar que:

En [PL.GR.-fr.ch.] se obtuvo el mayor valor medio de longitud de vástago en "B&G" con un valor de 76,7 mm, seguido por "MS" con 50,3 mm.

En [PL.GR.-FR.GR.] el mayor valor también se da en "B&G" con 99 mm, seguido por "MS" con 60,7 mm.

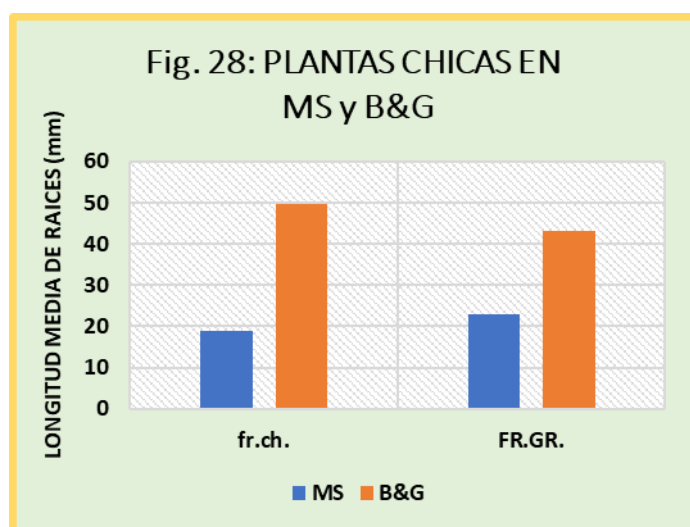
Para ambos tamaños de plantas y frascos se registraron los mayores valores en "B&G" respecto al "MS" y en particular en FR.GR.



2) (E) LONGITUD DE RAÍCES/PLANTAS

Este parámetro al igual que el número de raíces es muy importante para la supervivencia de las plantas al ser llevadas a condiciones *ex vitro*. La absorción de los nutrientes en plantas heterótrofas obligadas, como lo son las plantas *in vitro*, se ve ampliamente favorecida cuando las raíces de las mismas se encuentran en gran número y longitud.

PLANTAS CHICAS (pl.ch.)



Analizando este parámetro de crecimiento podemos observar lo siguiente en la Figura 28.

En [pl.ch.-fr.ch.] el mayor valor se obtuvo en el medio nutritivo “B&G” con 49,6 mm, sobre el obtenido en “MS” con 19 mm.

En [pl.ch.-FR.GR.] al igual que el caso anterior, el mayor valor se obtuvo en el medio “B&G” con 43,4 mm, seguido por “MS” con 22,8 mm.

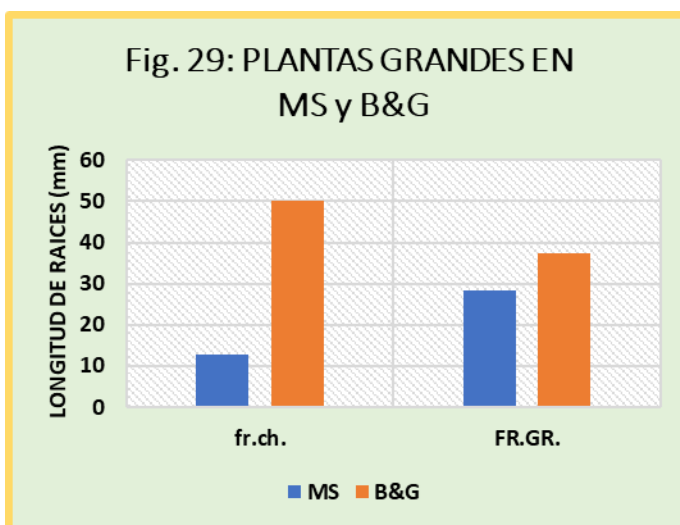
PLANTAS GRANDES (PL.GR.)

En la siguiente Figura 29 se aprecia lo siguiente:

En [PL.GR.-fr.ch.] se obtuvo el mayor valor de longitud media de raíces en “B&G” con un total de 50,1 mm, seguido por “MS” con 12,8 mm.

En [PL.GR.-FR.GR.] el mayor valor también se da en “B&G” con 37,5 mm, seguido por “MS” con 28,3 mm.

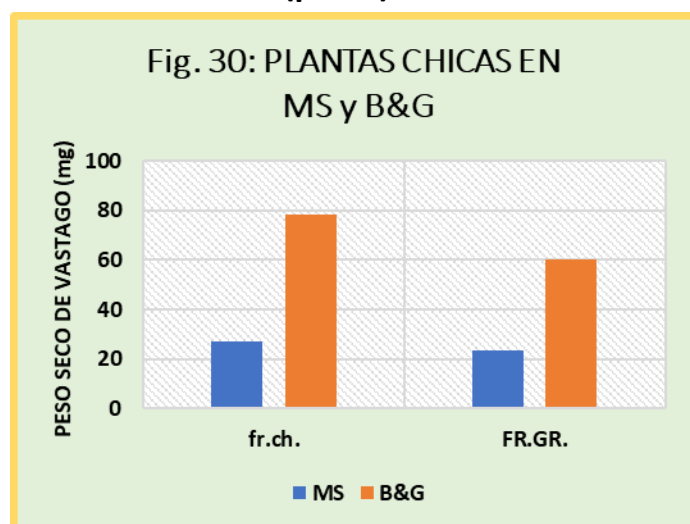
En ambos tamaños de plantas y frascos, el “MS” fue inferior al “B&G” probablemente debido a que se registró oxidación de su medio de cultivo, cosa que no ocurrió en el medio nutritivo “B&G” debido a la presencia del carbón activado.



3) (F) PESO SECO DE VÁSTAGOS/PLANTAS [mg]

El peso seco por planta es un parámetro muy útil para comparar el crecimiento de las plantas en los diferentes medios de cultivo. Es un parámetro cuantitativo, por lo que sus valores son de gran importancia en una planta. Está estrechamente relacionado con la absorción mineral y la capacidad de las plantas en transformarlos en materia seca. No siempre se relaciona en una planta *in vitro* que presente mucha masa vegetal (hojas, brotes, pseudobulbos y raíces), será la de mayor Peso Seco. Mucho del peso de esta “masa vegetal” es solamente agua que rápidamente puede ser eliminada al transferir las plantas a condiciones *ex vitro*. También existe una relación directa entre la absorción de los nutrientes y la calidad de las sales (formas iónicas en que éstas se encuentran disueltas en el medio nutritivo), por lo que indirectamente, se puede inferir como parámetro cualitativo nutricional. Existen trabajos publicados, como el de Stancato *et al*, 2008, que utilizan solamente este parámetro para medir el crecimiento de las plantas *in vitro* en *Laelia longipes*, *Laelia tenebrosa* y *Miltonia spectabilis*, tres especies de orquídeas brasileiras.

PLANTAS CHICAS (pl.ch.)



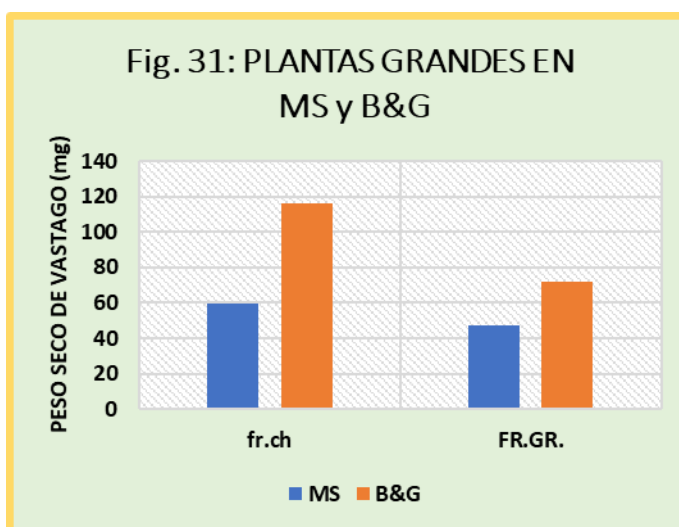
Observando la Figura 30 de Peso Seco de Vástagos/plantas, podemos apreciar que la combinación que dio el mayor valor fue “B&G” en **fr.ch.** con un valor promedio de 78,63 mg seguida por “B&G” en **FR.GR.** con un valor promedio de 60,37 mg.

Los menores valores se registraron en “MS” y **FR.GR.** con 23,48 mg seguido por “MS” **fr.ch.** con 27,2 mg. Con este experimento queda demostrado la mayor eficiencia del medio “B&G” para lograr plantas con mayor peso seco respecto al “MS”.

PLANTAS GRANDES (PL.GR.)

En plantas grandes (Fig. 31), el tratamiento que dio el mayor valor fue “B&G” y en **fr.ch.** con un valor promedio de 116,08 mg seguida por “B&G” **FR.GR.** con un valor de 71,73 mg. Los menores valores se registraron en “MS” en **FR.GR.** con 46,98 mg seguido por **fr.ch.** con 59,51 mg.

El medio basal “B&G” logra los mayores pesos seco/plantas en ambos tamaños de frascos, aunque es muy

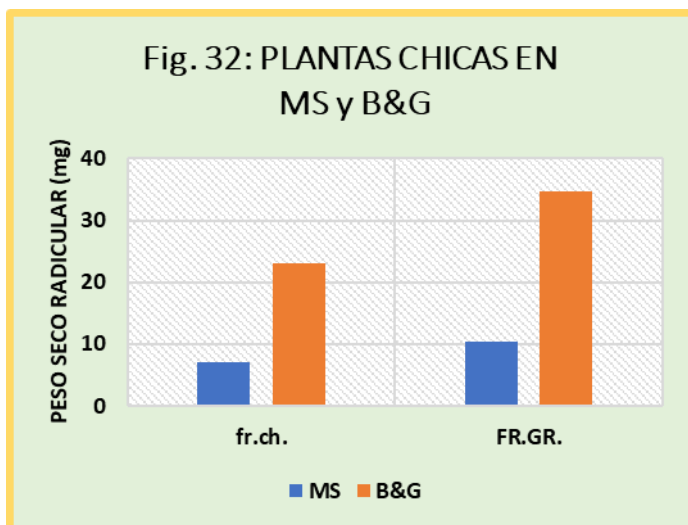


notorio en los frascos chicos.

3) (G) PESO SECO DE RAÍCES [mg/p]

Este parámetro es una medida directamente relacionada con los parámetros de longitud y número de raíces por planta.

PLANTAS CHICAS (pl.ch.)



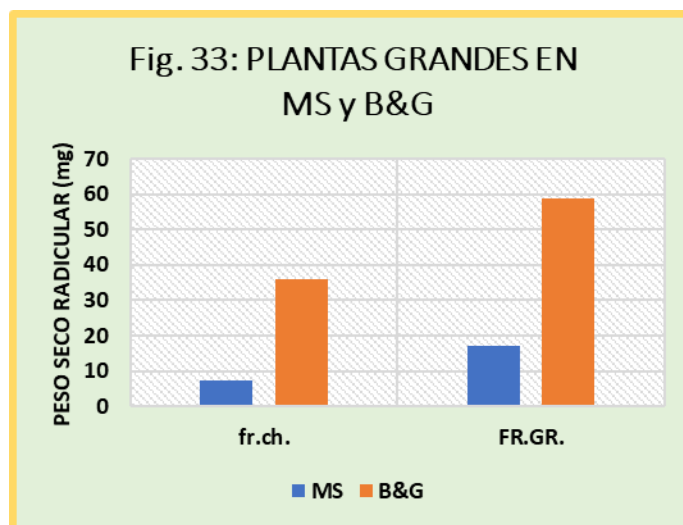
Como se observa en la Figura 32, el tratamiento que dio el mayor valor fue “B&G” con 23,07 mg/p y 34,76 mg/p, tanto en **fr.ch.** como en **FR.GR.** sucesivamente y los menores valores se registraron en “MS” **fr.ch.** con 7,14 mg/p seguido por “MS” **FR.GR.** con 10,31 mg/p.

En ambos tamaños de frascos el “B&G” supera al “MS”, siendo notoriamente mayor en el recipiente que tenía mayor volumen de medio nutritivo.

PLANTAS GRANDES (PL.GR.)

En plantas grandes (Fig. 33) fue el experimento que dio el mayor valor en peso seco radicular/planta con un promedio de 58,98 mg/p para el medio nutritivo “B&G” en **FR.GR.**, seguido por “B&G” en **fr.ch.** cuyo valor fue de 36 mg/p. Los menores valores se registraron en “MS” **fr.ch.** con 7,23 mg/p seguido por “MS” **FR.GR.** con 17,07 mg/p.

De los parámetros analizados pude observar que la mejor alternativa es **B&G-FR.GR.**, seguido por **B&G-fr.ch.** En ambos tamaños de frascos y partiendo de plantas chicas y plantas grandes, el medio basal “B&G” fue el que mejor respuesta ofrece para lograr mayor peso seco radicular.



Similares conclusiones fueron encontradas por Stancato *et al*, 2008, obteniendo los menores valores de peso seco de raíces en un medio MS tanto en la especie *Laelia longipes*, *Laelia tenebrosa* como en *Miltonia spectabilis*.

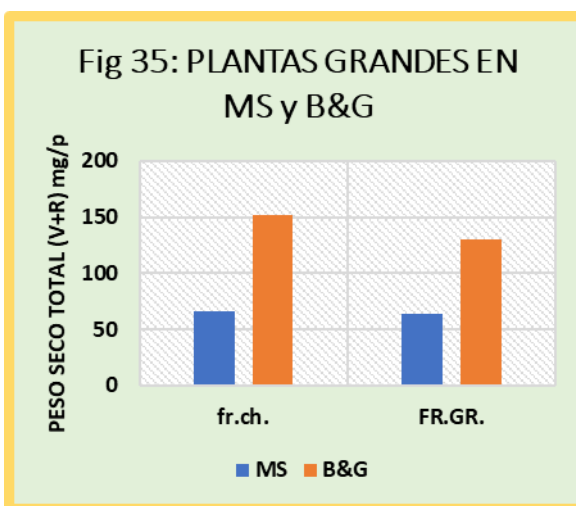
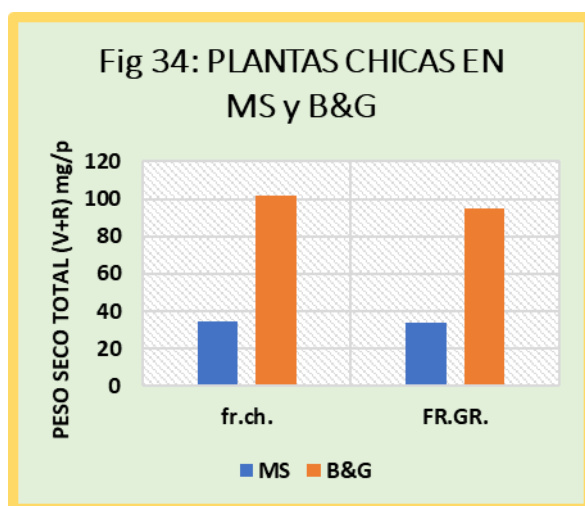
Los mejores valores obtenidos con el medio basal B&G puede ser debido al carbón activado (CA) en su composición. Al respecto, Pindel y Pindel, 2004 citan el efecto promotor del CA en explantes de 5 especies de orquídeas, destacándose su efecto positivo por la adsorción de

compuestos fenólicos y oxidantes naturales como así también otras sustancias inhibitorias. Arditti y Ernst, 1993 plantean que el efecto positivo del CA en el cultivo de tejidos de orquídeas se encuentra en el aumento de la aireación dentro del medio de cultivo y la adsorción del 5-hidroxymetylfurfural que se forma por la deshidratación de la sacarosa durante el autoclavado o calentamiento de medios conteniendo este disacárido.

PARÁMETROS COMBINADOS

Una interesante forma de relacionar los parámetros obtenidos es sumando los pesos secos de Vástagos + Raíces para cada categoría de explantes: Planta Chica (Fig. 34) y Planta Grande (Fig. 35) discriminados en función al medio de cultivo: MS o B&G

PLANTAS CHICAS		
PESO SECO TOTAL (VASTAGO + RAÍCES) (mg/p)	FRASCOS CHICOS (fr.ch.)	FRASCOS GRANDES (FR.GR.)
MS	34,34	33,79
B&G	101,7	95,13
PLANTAS GRANDES		
PESO SECO TOTAL (VASTAGO + RAÍCES) (mg/p)	FRASCOS CHICOS (fr.ch.)	FRASCOS GRANDES (FR.GR.)
MS	66,74	64,05
B&G	152,08	130,71



El Cociente o relación del peso seco por frasco nos permite entender ¿cuánto creció una planta cultivada en B&G respecto al MS en un frasco chico? y ¿cuánto creció una planta cultivada en B&G respecto al MS en un frasco grade?

Relación: B&G/MS [fr.ch.: $101,7/34,34 = 2,96$] [FR.GR.: $95,13/33,79 = 2,81$]

De acuerdo a lo calculado, podemos afirmar que Plantas Chicas incubadas en frascos chicos (150 mL) tienen una mayor ganancia en Peso Seco Total al ser cultivadas en B&G; **[2,96]**. Lo mismo sucede al utilizar frascos grandes de 350 mL **[2,81]**.

¿Qué incidencia genera esta relación de frasco chico versus frasco grande? No nos olvidemos que el frasco chico lleva 30 mL de medio de cultivo y un frasco grande, 80 mL de medio

de cultivo (2,6 veces más costo de medio nutritivo) o lo que es lo mismo a pensar que podríamos tener 2,6 frascos más (30 mL/fr.ch) por cada frasco grande de 80 mL.

Si lo relacionamos desde el concepto de Número de plantas/frasco, tendríamos 26 plantas en los frascos chicos versus 10 plantas en frasco grande.

Relación: B&G/MS [**fr.ch.**: $152,08/66,74 = 2,28$] [**FR.GR.**: $130,71/64,05 = 2$]

Al igual que en el análisis anterior, Plantas Grandes cultivadas en B&G tienen mayor Peso Seco Total al ser cultivadas en frascos chicos [**2,28**] que en frascos grandes [**2**]

4) (H) SOBREVIVENCIA DE LAS PLANTAS A CONDICIONES DE INVERNADERO

Las plantas *in vitro* de *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA fueron lavadas cuidadosamente para eliminar la totalidad del MS y del B&G adherido a sus raíces. Esta tarea se llevó a cabo el día 21 de diciembre de 2016. Se utilizaron vasos térmicos de 50 mL perforados en su parte inferior y rellenos con 1/3 de su volumen con piedras como drenaje y 2/3 restante con una mezcla de musgo *Sphagnum* + cáscara de pino en trozos pequeños (proporción 70:30). Las plantas fueron plantadas firmemente en cada recipiente (Fig. 36) y regadas con una solución fungicida conteniendo 3 mL/L de Kasumín + 2 mL/L de Carbendazim. Esta misma solución fue utilizada cada 15 días durante los 3 primeros meses.

Paralelamente y 1 vez por semana, los plantines se pulverizaron con una mezcla de 6 mL/L de Inicium + 1 g/L de 10-30-20 como fertilizante foliar y promotor de raíces.

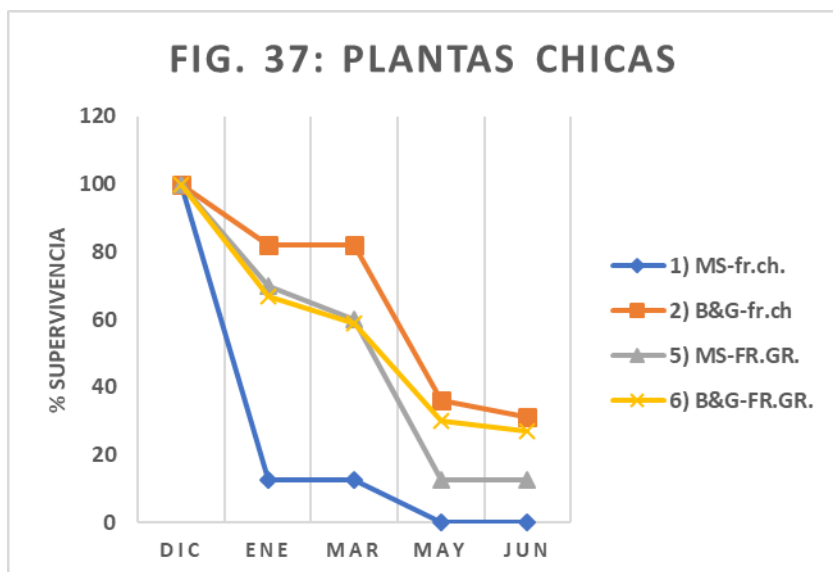
Los plantines se colocaron en un sector del invernadero con una malla de sombreado aluminizada de 80% y buena ventilación y se controló la humedad del sustrato en forma periódica como así también los riegos necesarios.



Fig. 36: Plantas de *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA recién trasplantadas a vasos térmicos

Al cabo de 180 días de trasplantadas se obtuvieron los siguientes resultados de acuerdo a lo planteado en el Diseño del Experimento

PLANTAS CHICAS (pl.ch.)

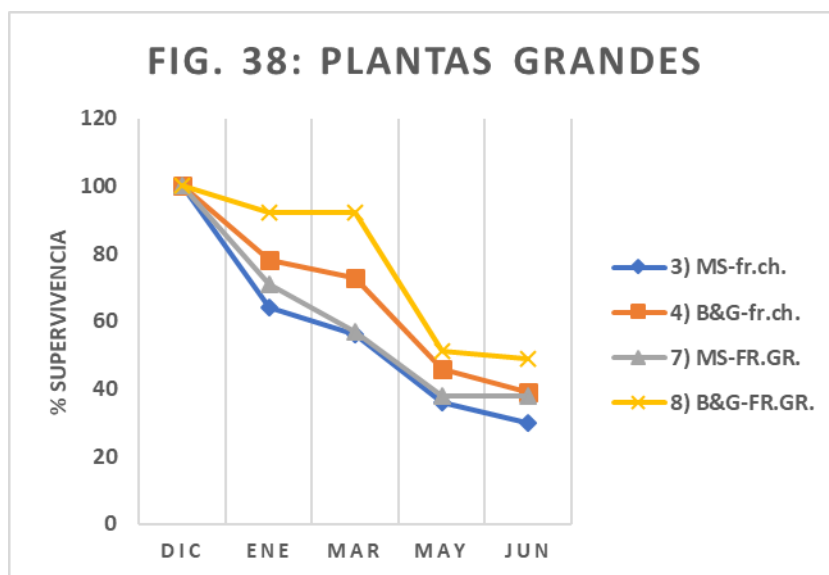


Podemos observar que en “plantas chicas” el tratamiento que mayor % de supervivencia tuvo al cabo de 6 meses fue el **2) [B&G-fr.ch.]** con un valor de 31% seguido por el **6) [B&G-FR.GR.]** con un 27%, y los menores valor se registraron en **5) [MS-FR.GR.]** con un valor del 12,5% y en **1) [MS-fr.ch.]** con 0%, el cual en mayo ya no tuvo sobrevivientes (Fig. 37)

PLANTAS GRANDES (PL.GR.)

En cambio, en “plantas grandes” el tratamiento que mayor % de supervivencia tuvo al cabo de 6 meses fue el **8) [B&G-FR.GR.]** con un valor de 49% seguido por el **4) [B&G-fr.ch.]** con un 39%, el **7) [MS-FR.GR.]** con un valor de 38% y por último el **3) [MS-fr.ch.]** con un 30% (Fig. 38).

Tanto en “pl.ch.” (plantas chicas) como en “PL.GR.” (plantas grandes)



los mayores porcentajes de supervivencia se obtuvieron en el medio de cultivo “B&G”. En cuanto al tamaño de frasco podemos decir que en “pl.ch.” el mejor resultado se visualizó en “fr.ch.”, en cambio, en “PL.GR.” lo fue “FR.GR.”

COMPARACIÓN EN EL COSTO DE PREPARACIÓN DE 1L DE MEDIO DE CULTIVO MS Y B&G

Para dichos cálculos, se utilizó el Catálogo de la empresa Sigma-Aldrich que vende el MS en distintas presentaciones (FOB Estado Unidos).

Código del MS: (M5519) Conteniendo los macro y micronutrientes, y las vitaminas descritas por Murashige y Skoog (1962). Formulado para contener 4.4 gramos de polvo por litro de medio. Se debe adicionar sacarosa (3%=30g/L) y agar (7g/L)

Moneda: Dólares americanos US\$

Presentaciones para 1L= US\$ 33,14 10L= US\$ 108,11 50L= US\$ 167,71

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m5519?lang=es®ion=AR&gclid=CjwKC-AiAoNTUBRBUEiwAWje2lp1lgBwcu42InJbpYo6ZwmJ-feUiab83UPwHwvhVJ6c5WZXZZ7WlahoCgAYQAvD_BwE

Sacarosa S9378 ≥99.5% (GC) (Sigma)

1Kg=183,33 US\$

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=saccharose&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=es®ion=AR&focus=product>

La sacarosa puede sustituirse por azúcar común tipo A para reducir costos: 1Kg=\$20

En ambos medios se usó agar “Doña Clara”

1Kg=\$1100

Cálculo del costo de preparación de 1L de MS (Cotización del US\$: \$20,5)

Si se compra para 50L, 1L saldría $167/50 = 3,35$ US\$ * 20,5\$/US\$ = **\$ 69**

Sacarosa 1000g = 183,33 US\$; 30g/L = $(30g * 183,33 \text{ US\$}) / 1000g = 5,5$ US\$ * 20,5\$/USD = **\$112,75**

Agar 1000g = \$1100; 7g = $(7g * \$1100) / 1000g = \$7,7$

Sumamos: \$69 + \$112,75 + \$7,7 = **\$189,54/litro de solución**

Si reemplazamos la sacarosa por azúcar común tipo A: 1000g = \$20; 30g = $(30g * \$20) / 1000g = \$0,6$

Sumamos: \$69 + \$0,6 + \$7,7 = **\$77,3***

(*) Ambos valores sin sumar costo de envío desde EEUU más permisos de importación que se estiman un 85-90% más.

También se podría reducir costos si, en lugar de comprar el MS ya formulado, se compraran las drogas por separado y prepararlo como se describe en esta Pasantía, aunque de esta manera el trabajo resulta más laborioso y sujeto a mayores equivocaciones ya que se requieren mayores conocimientos y pasos a seguir, y esto repercute de manera negativa a la hora de transferir la técnica a los orquideófilos aficionados.

B&G

Formato de Presentación: Paquete de 940 g con 20 sobres de 47g cada uno (Ver Fig. 13 y Fig. 14).

Costo: \$1200 (Costo puesto en Corrientes).

Cada sobre de 47g de B&G se utiliza para preparar 1 L de medio nutritivo.

Se debe suministrar agar a razón de 14 g/L.

Cálculo del costo de preparación de 1L de B&G

Si 940g = 20 sobres = \$1200; 1 sobre (47g) = $(1 \text{ sobre} * \$1200) / 20 \text{ sobres} = \60 c/u

Agar 1000g = \$1100; 14g = $(14g * \$1100) / 1000g = \$15,4$

Sumamos: \$60 + \$15,4 = **\$75,4**

Precio final contemplando el costo de envío.

CONCLUSIONES

La formulación y elección de medios nutritivos en biotecnología y en especial en orquídeas, muchas veces se realiza para mejorar la germinación y crecimiento del cultivo *in vitro*, donde la falta de información en relación a la nutrición de orquídeas y en especial al híbrido estudiado *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA, lleva a los orquicultores a emplear medios complejos, con nutrientes de calidad dudosa, vitaminas y reguladores del crecimiento muy caros que elevan los costos de la micropropagación (Cunha *et al*, 2011).

En este sentido, el medio de cultivo MS ha sido extensamente utilizado en cultivo *in vitro* de orquídeas, pero debido a la complejidad de su preparación y/o adquisición, es costoso y poco práctico.

El nuevo medio B&G Orquídeas es sencillo de preparar (al utilizar un sobre de 47 g por litro de agua y sin la necesidad de corrección de pH) y se adquiere a un menor precio con respecto al MS y por ello lo hace interesante para posibilitar la transferencia de la metodología del cultivo *in vitro* de orquídeas a otras áreas (pequeños laboratorios y empresas, cooperativas o productores).

Debido a ello, el medio B&G resulta muy atractivo y competitivo, ya que ha dado muy buenos resultados *in vitro* (ver ANEXOS, Fig. 39), fácil de preparar y, principalmente asequible en el mercado local con un representante en la ciudad de Resistencia (Chaco).

La elección del tamaño del explante –como inóculo inicial, es de fundamental importancia para que las respuestas a estudiar se desarrollen en concordancia con los resultados esperados y en *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA se evidenció que las plantas comprendidas entre 1 y 2 cm de largo (Plantas Grandes) resultaron muy adecuadas seguidas de Plantas Chicas (0,5 a 1 cm) para comenzar esta Pasantía (ver ANEXOS, Fig. 40).

También podemos concluir que el medio “MS” fue beneficioso solamente en:

- a) Plantas con mayor Número de hojas en plantas chicas y frascos chicos.
- b) Plantas con mayor Número de brotes en plantas chicas. En plantas grandes también fue beneficioso para este parámetro, pero en frascos grandes.

Además, debemos remarcar que el medio de cultivo “MS” presentó en varios tratamientos oxidación del medio nutritivo. Esta producción de fenoles por parte de la planta generalmente ocurre en medios orgánicos y con altos contenidos de N como lo es el MS. La oxidación del medio de cultivo es muy perjudicial para la planta.

Del “B&G” podemos inferir que fue muy favorable en los siguientes parámetros:

- a) Mayor número de hojas/planta en plantas grandes y recipientes grandes
- b) Mayor número de brotes/planta en plantas grandes y frascos chicos.
- c) Mayor número de raíces/planta en todos los tamaños de plantas y frascos.
- d) Mayor longitud de vástagos en todos los tamaños de plantas y frascos.
- e) Mayor longitud de raíces/planta en ambos tamaños de plantas y frascos.
- f) Mayor peso seco de vástagos/planta en ambos tamaños de explantes y frascos.
- g) Mayor peso seco de raíces/planta para ambos explantes y frascos.
- h) En el parámetro combinado de Peso Seco Total/Planta, el “B&G” fue marcadamente superior al “MS”, primeramente, en Frasco Chico y seguido por Frasco Grande.

Otra conclusión surgida de esta Pasantía es que el mayor Peso Seco de la parte aérea se obtienen usando Frascos Chicos, para ambos explantes y que el mayor Peso Seco radicular se logra en Frascos Grandes cuando utilizamos “B&G”.

El uso del B&G también está siendo utilizado en la siembra de especies y de híbridos de orquídeas. En la mayoría de ellos está resultando y está en camino de ser una alternativa factible de ser transferida para la propagación de especies de orquídeas de difícil reproducción y en peligro de extinción posibilitando salvaguardar su germoplasma (ver ANEXOS, Fig. 41 y Fig. 42).

Con respecto a la aclimatación de las plantas de *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA a condiciones de invernadero, el tratamiento que más plantas logro sobrevivencia a los 6 meses fueron los explantes grandes cultivadas en frascos grandes en el medio de cultivo B&G.

La sobrevivencia fue seriamente afectada por las condiciones climáticas dentro del invernadero por lo que a futuro no deberá elegirse el verano como estación para el pasaje a macetas.

Otros ensayos de aclimatación fueron realizados al finalizar esta Pasantía a partir de primavera y utilizando bandejas de 50 celdas con musgo *sphagnum* sólo como sustrato que mejoraron esta etapa en la producción de plantas de *Gomonia* Don Aurelio Schinini FCA (ver ANEXOS, Fig. 43).

ANEXOS

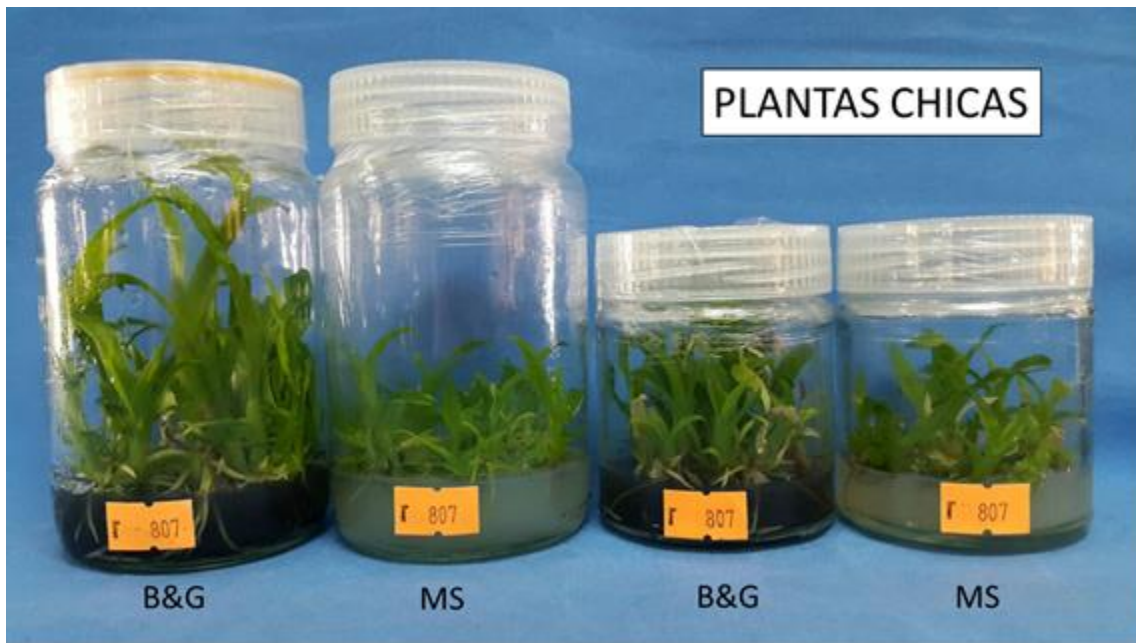


Fig. 39: Plantas Chicas cultivadas en MS y B&G en dos frascos diferentes.

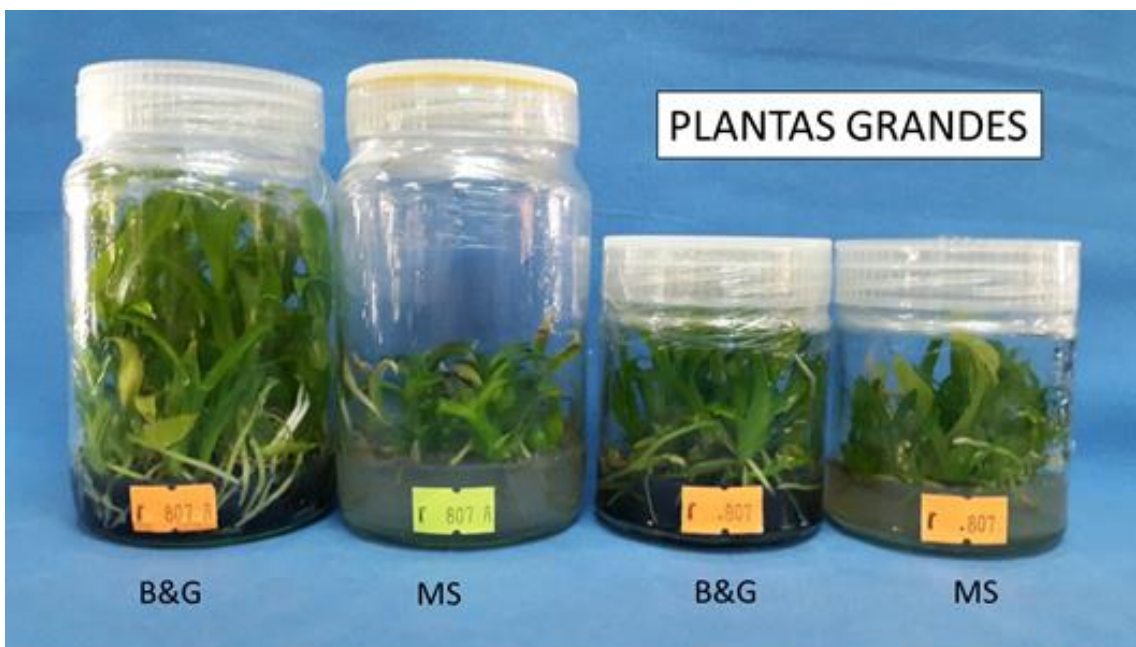


Fig. 40: Plantas Grandes cultivadas en MS y B&G en dos frascos diferentes.



Fig. 41: Híbrido 945 *Laelia flava* x *BLC* Durigan cultivadas en B&G y MS.

Fig. 42: Especie 1097 *Cattleya tigrina* germinando en B&G y MS.

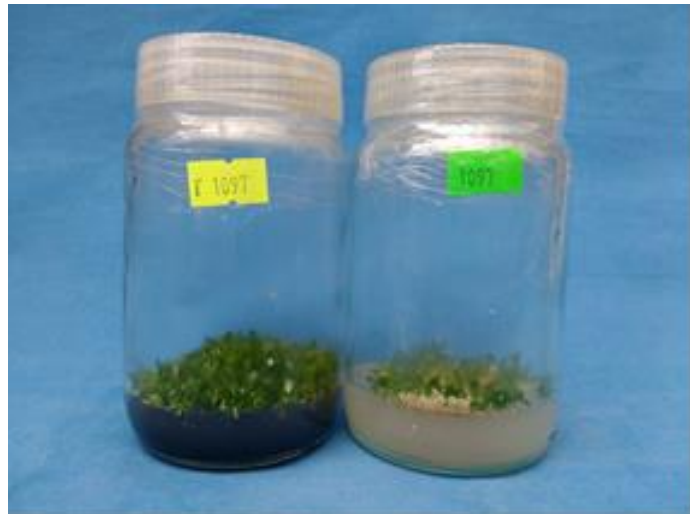




Fig. 43: Plantas de *Gomonía* Don Aurelio Schinini FCA plantados en bandejas de germinación de 72 celdas y con musgo *Sphagnum* [datos no publicados].

BIBLIOGRAFÍA

- Arditti, J. 1982. Introduction, north american terrestrial orchids. En: Orchids biology. II. Reviews and perspectives. Orchids seed germination and seedling culture – a manual. Ithaca, Nueva York: Cornell University Press. p. 245-73, 278-93.
- Arditti J. y Ernst R. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley-Sons, Inc. New York. 682pp.
- Atwood, J. T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. Selbyana 9: 171 – 186.
- Bechtel, H. *et al.* 1986. The manual of cultivated orchid species. The Mitt Press, Mass.
- Benzing, D. H. 1981. Vascular Epiphytes. General biology and related biota. 354 pags. Cambridge University Press. New York.
- Carlini-Garcia, L. A.; Van Den Berg; C. & Martins, P. S. 2002. A morphometric analysis of floral characters in *Miltonia spectabilis* and *Miltonia spectabilis* var. *moreliana* (Maxillarieae: Oncidiinae). Lindleyana 17(3): 122-129.
- Cunha, T.; Cordeiro, G.M.; Massaro, R.; Dezan, L.F. y Pedroso de Moraes C. 2011. Desenvolvimento in vitro de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. Scientia Plena Vol. 7, Num. 8.
- Dressler, R.L. 1981. The Orchids. Natural History and Classification. Harvard University Press, USA.
- Dressler, R. L. 1983. Phylogeny and classification of the orchid family. DIOSCORIDES PRESS. Hong Kong. pp. 314.
- Fast, G. 1980. Propagation and cultivation. En: Fast, G., Ulmer, Stuttgart (eds.). Orchid culture. Botanical principles, cultural practices, plant descriptions. p. 207 – 23.
- Hammel, B. 1990. The distribution of diversity among families, genera, and habit types in La Selva flora. In: Gentry, A. (ed.) Four Neotropical Forests. Yale University Press. Connecticut. pp. 75-84.
- Knudson, L. 1921. La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. Bol. Real Soc. Española Hist. Nat. 21:250 – 260.
- Knudson, L. 1946. A nutrient for germination of orchids seeds. Am orchid Soc Bull 15:214 – 217.
- Koopowitz, H. 1991. A stochastic model for the extinction of tropical epiphytes. Presented at: 2° International Symposium on the Biology and Conservation of Epiphytes. Sarasota, Florida. USA.
- Lugo, E. A. 1988. Estimating reduction in the diversity of tropical forest species. In: E.O. Wilson (ed.) Biodiversity, National Academy Press, Washington. pp. 58-70.

- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:437 – 497.
- Olfield, S. 1985. Whither international trade in plants. *New Scient.* 106: 10-11.
- Pindel, A. y Pindel, Z. 2004. Initiation of in vitro cultures of chosen endangered European species of orchids. *Folia Horticulturae* 111-117.
- Schinini, A. 2008. *Orchidaceae* En: Zuloaga y Morrone. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Eds. Missouri Botanical Garden Press. Volumen 1. Monocotyledoneae. Pag. 472-609.
- Stancato, G. C.; Ferreira, M. y Cangiani, M. 2008. Crescimento de Orquídeas Epífitas in vitro: Adicao do polpa de frutos. *Bragantia: Revista de Ciencias Agronómicas*. Vol. 67. Núm. 001. Campinas, Brasil. pp 51-57.
- Yam, W.; Nair, H.; Hew, S.; & Arditti, J. 2002. Orchid seeds and their germination: An historical account. In: Kull T, Arditti J (eds.). *Orchid biology: reviews and perspectives*. Kluwer Dordrecht. vol. 8:387 – 504.