



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

Trabajo Final de Graduación

Modalidad: Tesina

**“Micropropagación de *Cohniella*
cepsula (Orchidaceae)”**

Alumna: María Belén Herter

Asesora: Dra. Natalia Raquel Dolce

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, Departamento de Básicas Agronómicas, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Cátedra de Fisiología Vegetal.

2017

TÍTULO: “Micropropagación de *Cohniella cepula* (Orchidaceae)”.

RESUMEN

Cohniella cepula es una orquídea silvestre de Argentina con gran potencial ornamental que si bien era usualmente encontrada en su hábitat natural, actualmente está casi desaparecida. El cultivo in vitro de semillas de orquídeas constituye una valiosa herramienta, dado que posibilita la germinación asimbiótica de cientos de miles de semillas provenientes de una sola cápsula. Por ello, el objetivo de este estudio fue desarrollar un sistema eficiente para la micropropagación de *C. cepula* a partir del cultivo de semillas y la posterior aclimatación *ex vitro* de las plántulas. Respecto a la germinación de semillas, se estudió el efecto de la madurez fisiológica de la cápsula dadora de semillas, la composición del medio nutritivo y la condición de luz durante la incubación sobre dicho proceso. En cuanto a la aclimatación *ex vitro*, se evaluó la influencia del tamaño de las plantas al momento de ser removida del medio de cultivo, el acondicionamiento previo en una cámara húmeda mantenida bajo condiciones de luz y temperatura controladas versus la transferencia directa al ambiente exterior y la fertilización durante el período de aclimatación. Las semillas germinaron en todas las condiciones evaluadas, obteniéndose los mayores porcentajes de germinación en MS en su formulación completa o reducida al 50% y realizando la incubación en condiciones de luz, las plantas fueron exitosamente aclimatadas *ex vitro* sin necesidad de un periodo previo de pre-aclimatación en cámara con condiciones ambientales controladas. Este trabajo describe un protocolo simple y eficiente para la propagación a gran escala de esta orquídea amenazada.

ANTECEDENTES

El género *Cohniella* Pfitzer pertenece a la familia Orchidaceae, una de las familias botánicas más numerosas y diversas a la que pertenecen entre el 8 y 10% de todas las plantas con flores; con un número estimado de 880 géneros y más de 25.000 especies (Givnish et al., 2015). La distribución de las orquídeas es cosmopolita y se extiende por todos los continentes salvo la Antártida, con la mayor diversidad y el epifitismo concentrado en los trópicos y subtrópicos (Bechtel et al., 1986; Dressler, 1993). En Argentina, esta familia está representada por alrededor de 74 géneros y 280 especies (Johnson, 1992; Correa, 1996), con una distribución que va desde Tierra del Fuego hasta Misiones y Jujuy. La mayor diversidad se concentra en la región Subtropical (precisamente en la Selva Paranaense y las Yungas), donde se encuentran aproximadamente un 50% de las especies registradas para el país (Zuloaga et al., 1999; Johnson, 2001). Entre los géneros citados para el país se encuentra *Cohniella*, que cuenta con dos especies que habitan naturalmente en las provincias del norte argentino: *C. cepula* y *C. jonesiana* (Carnevali et al., 2010; Cetzal-Ix et al., 2012; 2013). Estas especies son hierbas epifitas con hojas teretes suculentas y pseudobulbos inconspicuos; crecen en diversos ambientes boscosos bajo condiciones sombrías a expuestas a una insolación directa, sobre ramas altas de los árboles. *Cohniella cepula* se caracteriza por presentar inflorescencias de mayor longitud que las hojas, con flores amarillas pequeñas para el género; mientras que *C. jonesiana* se caracteriza por tener las flores más grandes del género, con el labelo predominantemente blanco, y las inflorescencias son más cortas que las hojas (Johnson, 2001; Insaurrealde y Radins, 2007; Carnevali et al., 2010; Cetzal-Ix et al., 2012). Ambas especies presentan gran potencial ornamental y son comercializadas comúnmente en mercados, ferias y viveros locales (siendo la mayoría de los ejemplares en venta producto del extractivismo); por lo que actualmente están casi desaparecidas de sus hábitats naturales (Insaurrealde y Radins, 2007).

Si bien las orquídeas (consideradas altamente evolucionadas en comparación con otras plantas vasculares) habían sido abundantes en todo el mundo, actualmente todas las especies de orquídeas se encuentran incluidas en el Apéndice II o I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) (<http://www.cites.org>). Se consideran que las poblaciones naturales de orquídeas presentan serias amenazas de conservación debidas, principalmente, a dos presiones directas o indirectas ocasionadas por el hombre (Johnson, 1992). En orden de importancia son:

a) Destrucción o alteración de sus hábitats naturales: Las selvas tropicales y subtropicales son los ambientes con mayor diversidad de orquídeas (Dressler, 1981) y están desapareciendo vertiginosamente debido a las diferentes actividades expansionistas de la población humana en continuo crecimiento. Debido a las complejas interdependencias existentes entre las orquídeas y su hábitat y a la necesidad de asociarse a hongos micorrícicos para germinar, se considera que son uno de los grupos de plantas más vulnerables frente a cualquier alteración, por más insignificante que parezca, producida dentro de sus ambientes naturales. Consecuentemente, es lógico esperar un alto riesgo de extinción debido al elevado porcentaje de especies con distribución restringida o endémica (Withner, 1977; Koopowitz, 1992).

b) El comercio de plantas silvestres con características ornamentales: Por su alto valor estético, las orquídeas han poseído cierta popularidad desde tiempos remotos, si bien fue desde mediados del siglo XIX que se inicia su comercio masivo. Estados Unidos de América, importó durante el año 1985 cerca de 3 millones de plantas de las cuales se estima que la mitad habían sido colectadas de sus medios naturales (Fitzgerald, 1989).

Esta realidad puede observarse claramente en las especies del género *Cohniella* que habitan en nuestro país, las cuales si bien eran usualmente encontradas en su hábitat natural actualmente están casi desaparecidas (Insaurrealde y Radins, 2007). En consecuencia, es imperioso desarrollar medidas para la conservación de estos “pandas del mundo vegetal” (Wood, 1989); lo cual requiere una compleja integración de estrategias de conservación de los hábitats naturales (conservación *in situ*), el desarrollo y aplicación de metodologías de conservación *ex situ*, así como una mejor comprensión del comercio y las prácticas hortícolas de las orquídeas. También son necesarios conocimientos más profundos sobre la biología, evolución y ecología de las orquídeas (Popova et al., 2016).

Una de las acciones más deseables para salvaguardar estas especies en peligro es desarrollar procedimientos que hagan posible su propagación masiva, lo que proveerá de material para la reinserción de ejemplares en sus hábitats naturales, el intercambio con otras entidades, el abastecimiento a comerciantes de orquídeas para evitar extracciones de la naturaleza y la disponibilidad de material para futuras investigaciones. En lo que se refiere a la propagación de orquídeas, para la germinación de las semillas en condiciones naturales es fundamental la presencia de hongos micorrícicos (Hadley, 1997), los cuales proporcionan los elementos necesarios para el desarrollo de las plántulas, puesto que las semillas de orquídeas son pequeñas y no presentan endosperma ni cotiledones por lo que

contienen pocas o ninguna reserva para ser usada durante el período de germinación (Singh, 1981). Una vez establecida la simbiosis con hongos micorrícicos, se establece un flujo de carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos que contribuyen a la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas (Weber y Webster, 2001). Estos hongos micorrícicos están altamente adaptados a condiciones químicas del sustrato muy específicas y, por lo tanto, las orquídeas están también estrictamente limitadas a esas condiciones que se dan en nichos ecológicos muy limitados (Johnson, 2001). Es por ello que, aunque las semillas contenidas en una cápsula de orquídea pueden ser muy numerosas (2-3 millones), solo un 2-3% de las semillas pueden germinar en condiciones naturales (Luan et al., 2006). Por otra parte, los métodos convencionales de propagación vegetativa a partir de rizomas, separación de brotes generados del tallo o pseudobulbos, resulta muy lenta, además de obtenerse pocos brotes después de dos a tres años de iniciado el proceso (Mosqueda Mayo et al., 2010).

Debido a las limitaciones anteriores, el cultivo *in vitro* de semillas de orquídeas constituye una valiosa herramienta cuando se trata de propagar especies amenazadas, dado que posibilita la germinación asimbiótica de cientos de miles de semillas provenientes de una sola cápsula (Arditti y Ernst, 1993). Basándose en los trabajos de Moore (1849) y Bernard (1899), Knudson (1922) desarrolló métodos fiables para la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas utilizando medios nutritivos más complejos. Desde entonces, se han establecido protocolos para la germinación asimbiótica de semillas, el desarrollo de plántulas y la multiplicación a gran escala de numerosas especies de orquídeas utilizando diversos medios nutritivos y reguladores de crecimiento vegetal, para fines tanto comerciales como de conservación (Arditti y Ernst, 1993; Dasgupta et al., 2004; Teixeira da Silva, 2013). Sin embargo, aún no se reportan antecedentes bibliográficos referidos al uso de estas técnicas con especies del género *Cohniella*. Es por ello que en este trabajo se evaluó la posibilidad de desarrollar un sistema eficiente de germinación *in vitro* de semillas de *C. cepula*, que posibilitará luego poseer material idóneo para incursionar mediante su micropropagación, en la producción masiva de esta orquídea silvestre amenazada.

HIPÓTESIS

✦ La micropropagación de *C. cepula* es posible si se determinan las condiciones óptimas para la germinación asimbiótica de semillas y el ulterior desarrollo de los protocormos en medios de cultivo adecuadamente formulados para la regeneración de plantas.

- ✦ Las plantas de *C. cepula* regeneradas *in vitro* pueden ser transferidas a las condiciones de crecimiento *ex vitro* si se regulan los factores que afectan su aclimatación.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- ✦ Generar los conocimientos necesarios para la micropropagación de *C. cepula*, a partir del cultivo *in vitro* de semillas.

Objetivos Específicos:

- ✦ Desarrollar una metodología de cultivo *in vitro* que permita la regeneración de plantas de *C. cepula* a partir de la germinación asimbiótica de semillas, evaluando diferentes factores que afectan dicho proceso.
- ✦ Determinar las condiciones más adecuadas para la aclimatación y ulterior crecimiento *ex vitro* de las plantas de *C. cepula* regeneradas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con plantas de *Cohniella cepula* (Hoffmanns.) Carnevali & G. Romero que se mantienen en el umbráculo de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE (Figura 1). Las plantas madres, a partir de las cuales se obtuvo el material vegetal para la realización de los experimentos, fueron obtenidas en diferentes ferias y viveros locales e identificadas en el Herbario CTES.

Para el mantenimiento de las plantas en el umbráculo se realizaron tareas de riego y control permanente de la sanidad de las plantas (aplicación de fertilizantes y fitosanitarios en general). En la época de floración se realizó la polinización manual de flores de diferentes ejemplares de *C. cepula* con el objeto de obtener cápsulas con semillas viables para llevar a cabo los experimentos de germinación *in vitro*. Para ello se debe contar con flores en óptimo estado, presentando la morfología típica del ejemplar a polinizar. En el proceso de polinización, el polinario se trasladó desde la parte masculina de una flor hasta la parte femenina de una flor perteneciente a otro ejemplar (estudios previos indican que se trata de una especie alógama), utilizando pinzas y agujas histológicas limpias. Los cruzamientos se registraron en cada caso rotulando las plantas con etiquetas de PVC y lápiz negro de grafito.



Figura 1. Plantas madre de *Cohniella cepula*. **A)** Ejemplares mostrando una inflorescencia y dos cápsulas en diferente estado de desarrollo (indicadas con flechas) . **B)** Detalle de una inflorescencia. **C)** Vista general de un grupo de plantas mantenidas en el umbráculo de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la FCA-UNNE.

Germinación in vitro de semillas y regeneración de plantas

Con el objeto de desarrollar sistemas eficientes para la germinación asimbiótica de semillas de *C. cepula*, se realizaron estudios tendientes a evaluar el efecto de la madurez fisiológica de la cápsula dadora de las semillas, la composición del medio nutritivo y la condición de luz durante la incubación de los cultivos, sobre dicho proceso. Para ello se utilizaron cápsulas de 85 a 100 días posteriores a la polinización manual, las cuales fueron colectadas cerradas y luego desinfectadas superficialmente mediante inmersión en una

solución de NaClO 2,5% + Triton[®] X-100 0,1% durante 45 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. A continuación, trabajando en una cabina de flujo laminar de aire estéril, las cápsulas fueron abiertas sobre placas de Petri y se tomaron las muestras de semillas (Figura 2 A-B).

Para evaluar la germinación, las semillas fueron sembradas en frascos de vidrio de 100 cm³ de capacidad conteniendo 25 ml de medio de cultivo semisólido (6,5 g L⁻¹ de agar Sigma[®] A-1296). Los medios nutritivos estaban constituidos por el medio basal de Murashige y Skoog (1962) -MS- en su formulación completa o reducida al 50 o 25%, con 3% de sacarosa en todos los casos. El pH fue ajustado a 5,6 mediante el empleo de soluciones de KOH y/o HCl antes de la adición del agar. Los recipientes conteniendo los medios de cultivo fueron obturados con papel aluminio y esterilizados en autoclave a 1,45 kg cm⁻² y 120 °C durante 20 minutos. Para la siembra de las semillas, éstas fueron suspendidas en una solución estéril de agua destilada a pH=6 con 2 g L⁻¹ de agar y luego, con una micropipeta graduada de 100-1000 µl, se dejaron caer 300 µl de la mezcla (conteniendo alrededor de 200 semillas cada gota) por frasco con medio de cultivo (Figura 2C). Una vez realizada la siembra de las semillas, los frascos fueron obturados con Resinite[®] e incubados en un cuarto climatizado a 27±2 °C bajo dos regímenes lumínicos: uno con fotoperíodo de 14 horas e intensidad lumínica de 116 µm.m⁻².s⁻¹ PPFD y otro con oscuridad permanente.

Al cabo de 60 días de realizada la siembra de las semillas, se registró el porcentaje de germinación (semillas hinchadas que contenían el embrión de color verde claro) y el desarrollo de protocormos (estructura tuberosa que se forma tras la germinación de las semillas de orquídeas y a partir de la cual se desarrolla una planta completa). Una vez finalizada la etapa de germinación, los protocormos obtenidos en las diferentes condiciones evaluadas fueron transferidos a MS suplementado con 500 mg L⁻¹ de carbón activado (CA) e incubados en condiciones de luz para propiciar el subsecuente crecimiento de las plántulas.

Adicionalmente, se evaluó la viabilidad de las semillas provenientes de cada cápsula mediante la técnica de reducción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (tetrazolio). La misma consistió en exponer las semillas a una solución de tetrazolio al 1% (p/v) durante 24 horas en oscuridad a 30°C (Singh, 1999). A continuación, se procedió al recuento de las semillas viables (aquellas que se tiñeron de rojo) utilizando un microscopio estereoscópico.



Figura 2. Proceso de desinfección de cápsulas y siembra de las semillas de *Cohniella cepula*. A) Desinfección superficial de una cápsula mediante inmersión en una solución de NaClO 2,5% + Triton[®] X-100 0,1%. B) Abertura de la cápsula en condiciones de asepsia y obtención de las muestras de semillas. C) Semillas cultivadas *in vitro* (mediante la suspensión en una solución estéril de agua destilada a pH=6 con 2 g L⁻¹ de agar).

Aclimatación de las plántulas a las condiciones de crecimiento ex vitro

Con el propósito de desarrollar sistemas eficientes para la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones de crecimiento *ex vitro*, se realizaron estudios tendientes a evaluar la influencia del tamaño de las plántulas al momento de ser removidas del medio de cultivo, el acondicionamiento previo en una cámara húmeda mantenida bajo condiciones de luz y temperatura controladas *versus* la transferencia directa al ambiente exterior (umbráculo), y la fertilización semanal de las plantas durante el periodo de aclimatación.

Las plántulas fueron removidas de los frascos y lavadas cuidadosamente con agua corriente para eliminar completamente el medio de cultivo, evitando dañar las hojas y raíces. Se seleccionaron dos tamaños de plantas: pequeñas (4 a 6 cm) y grandes (8 a 10 cm). Para el transplante se utilizaron vasos de plástico de 200 cm³ conteniendo en el fondo una capa de piedra de cantera de grano fino (para mejorar el drenaje), seguida de una capa de musgo *Sphagnum* (para incrementar la retención de humedad) y, finalmente, otra capa de piedras sobre la que se colocaron las plantas (para permitir la sujeción de las mismas) (Figura 3C).

Una vez transplantadas, un lote de plantas fue llevado directamente a las condiciones ambientales externas en un umbráculo (Figura 3D) mientras otro lote fue colocado en una cámara húmeda (la cual consistía en una estructura de madera cubierta con un plástico transparente para conservar en un nivel elevado la humedad relativa del ambiente) y mantenido en un cuarto de incubación a 27±2 °C bajo un fotoperíodo de 14 horas e

intensidad lumínica de $116 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figura 3A,B) por un período de 2 meses. A continuación, las plantas fueron transferidas a las condiciones externas en un umbráculo, donde son mantenidas hasta el presente.

Finalmente, se evaluó el efecto de la fertilización de las plantas durante el periodo de aclimatación. Para ello, durante los primeros cuatro meses posteriores a la transferencia de las plantas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*, se realizó la fertilización semanal de un lote de plantas asperjándolas con una solución de Inicium® (Bioibérica S.A., Argentina) al 0,6% (v/v), un bioestimulante órgano-mineral compuesto por péptidos de bajo peso molecular al 40% p/p, N total al 5,5% p/p y P (P_2O_5) al 5,5 % p/p; mientras otro lote era asperjado sólo con agua.

Luego de 2 meses de ser transferidas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*, se determinó la sobrevivencia de las plantas en todas las condiciones evaluadas. Adicionalmente, en el lote de plantas que fue llevado directamente a las condiciones ambientales externas en el umbráculo, se evaluó la influencia del tamaño inicial de las plántulas y el efecto de la fertilización durante el periodo de aclimatación sobre la ganancia de peso seco (PS) y la Tasa de Crecimiento Relativo (TCR) en los períodos comprendidos entre 0 a 4 meses y 4 a 8 meses luego de iniciado el experimento de aclimatación, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{TCR} = \frac{1}{\text{PS}_2} \frac{\text{PS}_2 - \text{PS}_1}{T_2 - T_1}$$

Donde:

PS₁: representa el PS al inicio del periodo considerado (día 1 o 120 de iniciado el experimento).

PS₂: representa el PS al final del periodo considerado (día 120 o 240 de iniciado el experimento).

T₁: representa el tiempo inicial del periodo considerado (0 o 120 días).

T₂: representa el tiempo final del periodo considerado (120 o 240 días).

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con 3 repeticiones de 2 frascos para cada tratamiento evaluado en los ensayos de germinación de semillas y 2 repeticiones de 10 unidades experimentales para cada condición evaluada en los ensayos de aclimatación de plantas. Los datos fueron sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) y la

comparación de las medias fue realizada usando el test de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$).

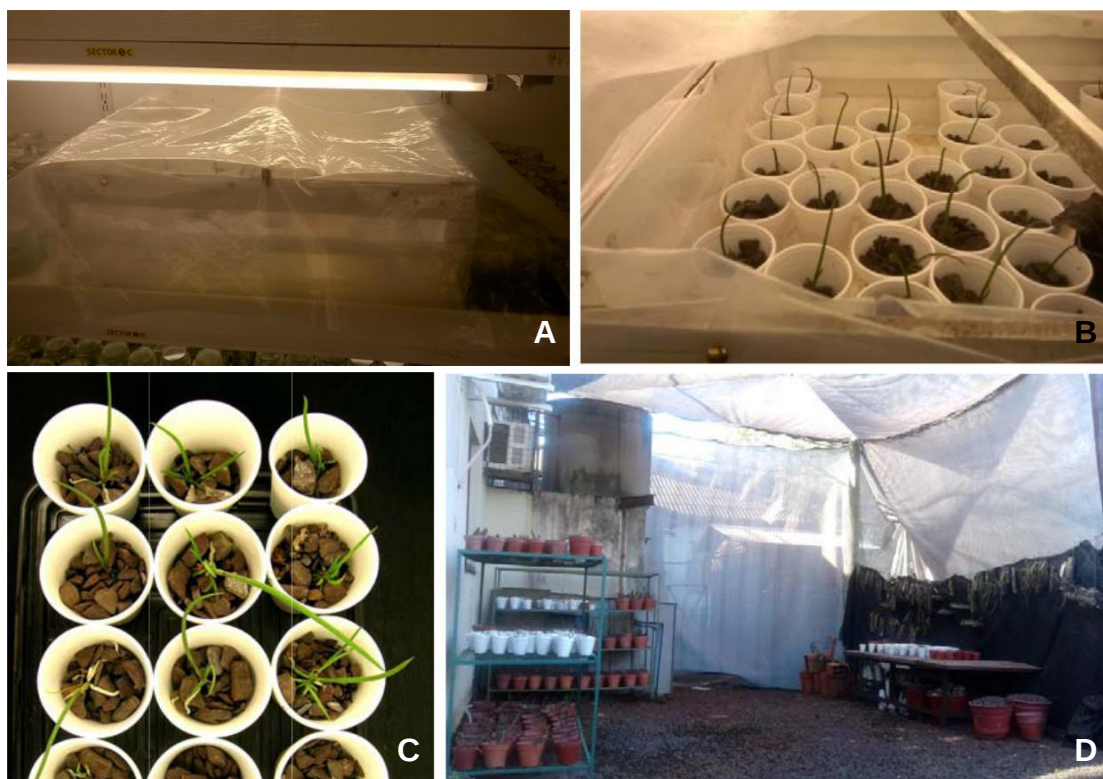


Figura 3. Aclimatación *ex vitro* de plantas de *Cohniella cepula* regeneradas *in vitro*. A- B) Plantas preacondicionadas en cámara húmeda mantenida bajo condiciones de luz y temperatura controladas; se muestra una vista exterior (A) e interior (B) de la cámara húmeda. C) Plantas transferidas directamente al ambiente exterior (umbráculo). D) Vista general del umbráculo de la Cátedra de Fisiología Vegetal (FCA-UNNE).

RESULTADOS

Germinación in vitro de semillas y regeneración de plantas

En la Figura 4 se presentan los porcentajes de germinación y desarrollo de protocormos obtenidos al cabo de 60 días de realizada la siembra de las semillas. Ambos procesos ocurrieron en todos los medios nutritivos y condiciones de incubación evaluados. Los mayores porcentajes de germinación (94,2 - 98,6%) se obtuvieron en los medios de cultivo constituidos por MS en su formulación completa o reducida al 50% y realizando la incubación en condiciones de luz; aunque no se registraron diferencias significativas entre cualquiera de los tratamientos, incluso en lo que respecta al grado de madurez de la cápsula de la que provenían las semillas. Por su parte, el desarrollo de protocormos fue significativamente afectado tanto por la edad fisiológica de la cápsula de la que provenían

las semillas como por la condición de luz bajo la cual que fueron incubados los cultivos, obteniéndose los mayores porcentajes de protocormos (82,7 – 91,8%) a partir del cultivo de semillas provenientes de cápsulas de 100 días post-polinización (el mayor grado de madurez evaluado, dado que a partir de este momento la mayoría de las cápsulas iniciaban el proceso natural de dehiscencia) y realizando la incubación bajo un fotoperíodo de 14 horas e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. En cuanto a la composición del medio de cultivo, si bien el desarrollo de protocormos presentó valores superiores en MS en su formulación completa (91,8%), seguido por MS reducido al 50% (85,1%) y finalmente al 25% (82,7%), no se registraron diferencias significativas entre los valores obtenidos en las tres concentraciones evaluadas del medio basal MS.

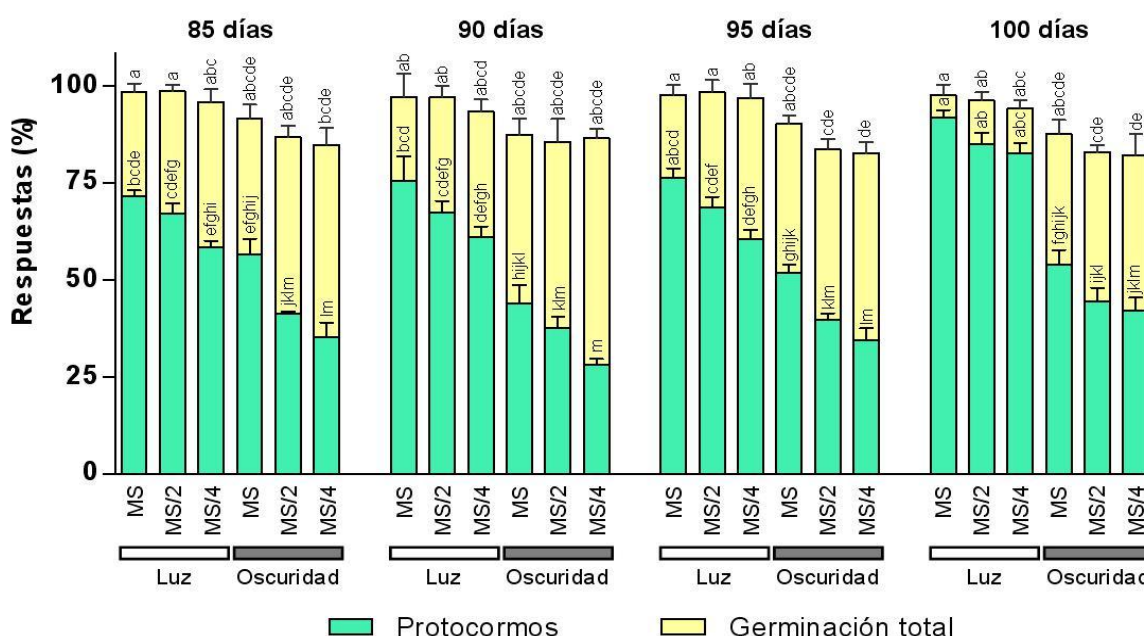


Figura 4. Germinación (%) y desarrollo de protocormos (%) a partir de semillas de *Cohniella cepula* provenientes de cápsulas de 85, 90, 95 y 100 días post-polinización, luego de 60 días de ser cultivadas en MS en su formulación completa (MS) o reducida al 50% (MS/2) o 25% (MS/4) e incubadas en condiciones de luz (fotoperíodo de 14 horas e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) u oscuridad permanente. Las barras representan el error estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)

Luego de transferir los protocormos obtenidos en los diferentes tratamientos a MS suplementado con 500 mg L^{-1} de CA e incubados en condiciones de luz, el subsecuente crecimiento y desarrollo completo de las plántulas no presentó inconvenientes. Al cabo de ~180 días de iniciado el experimento, se contaba con plántulas de más de 4 cm de altura

provistas de un adecuado sistema radicular, las cuales fueron utilizadas en los experimentos de aclimatación a las condiciones de crecimiento *ex vitro*.

En cuanto al análisis de la viabilidad de las semillas, el test de tetrazolio reveló una viabilidad elevada (~95) en las semillas provenientes de todas las cápsulas evaluadas, lo cual es concordante con el elevado poder germinativo observado en todos los tratamientos.

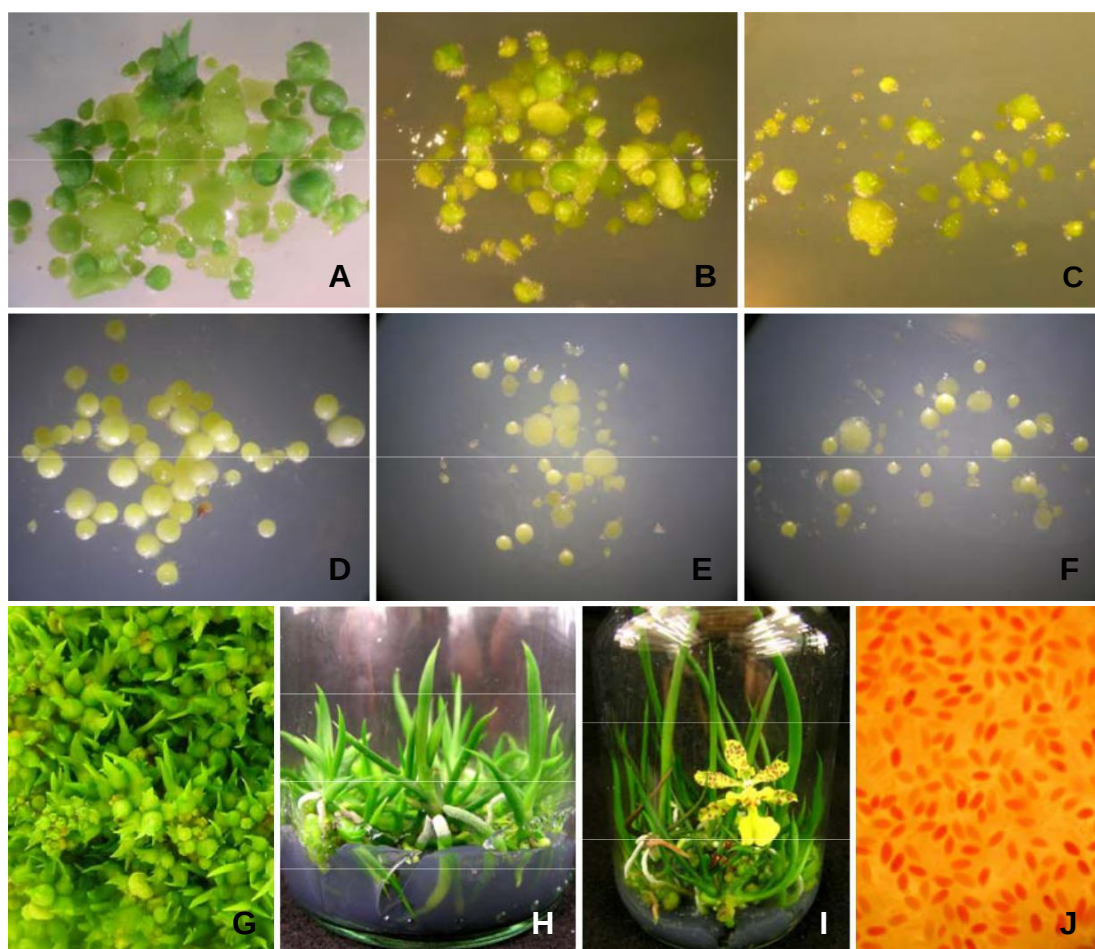


Figura 5. Regeneración de plantas de *Cohniella cepula* a partir del cultivo *in vitro* de semillas. A-F) Germinación de semillas provenientes de cápsulas de 90 días post-polinización, luego de 60 días de ser cultivadas en MS en su formulación completa (A,D) o reducida al 50% (B,E) o 25% (C,F) e incubadas en condiciones de luz (A-C) u oscuridad permanente (D- F). G-I) Desarrollo de protocormos y plántulas en MS + CA luego de 90 (G), 150 (H) y 180 (I) días de iniciado el cultivo de las semillas. J) Evaluación de la viabilidad de las semillas mediante la técnica de reducción con tetrazolio.

Aclimatación de las plántulas a las condiciones de crecimiento ex vitro

En la Tabla 1 se presenta la sobrevivencia de las plantas luego de 2 meses de ser transferidas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*. Se observa que los porcentajes de sobrevivencia fueron elevados (80 - 100%) en todas las condiciones evaluadas, no

registrándose diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En cuanto al análisis sobre la necesidad de un periodo de acondicionamiento previo en cámara con condiciones ambientales controladas, no se encontraron diferencias entre las plantas mantenidas en una cámara húmeda y aquellas llevadas directamente a las condiciones ambientales externas en el umbráculo. Tampoco se registraron diferencias significativas (de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey) en lo que respecta a la sobrevivencia de las plantas con diferente tamaño inicial, ya sea que hayan recibido o no fertilización semanal.

Tabla 1. Sobrevivencia (%) de plántulas de *Cohniella cepula* luego de 60 días de ser transferidas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*, en una cámara húmeda mantenida bajo condiciones de luz y temperatura controladas o directamente en las condiciones ambientales externas en un umbráculo.

Tratamientos ¹		Sobrevivencia (%) ²	
Plantas	Fertilización	cámara húmeda	umbráculo
Pequeñas	sin Inicium [®]	85 ± 5	85 ± 15
	con Inicium [®]	90 ± 0	80 ± 10
Grandes	sin Inicium [®]	90 ± 10	100 ± 0
	con Inicium [®]	85 ± 15	85 ± 15

(¹) Plantas pequeñas = 4-6 cm; plantas grandes = 8-10 cm; Fertilización con solución de Inicium[®] (0,6% v/v), de la empresa Bioibérica S.A.

(²) Los valores representan las medias ± EE.

En la Figura 6 se representa la ganancia de PS luego de 4 y 8 meses de iniciada la aclimatación. Se puede observar muy poca diferencia entre el PS inicial de las plántulas (al momento de ser sacadas de *in vitro*) y el PS acumulado durante los primeros 4 meses de su transferencia a las condiciones de crecimiento *ex vitro*. Sin embargo, el PS registrado en plantas luego de 8 meses de su establecimiento en el umbráculo muestra valores mayores. Analizando los distintos tratamientos, se puede observar un efecto positivo de la fertilización semanal de las plantas durante los primeros cuatro meses de aclimatación, tanto en plantas pequeñas como en grandes, comparada con aquellas sin fertilización.

En la Tabla 2 se presenta la TCR para los períodos comprendidos entre 0-4 meses y 4-8 meses de iniciado el experimento de aclimatación. Durante la primera etapa (0-4 meses), la TCR tuvo valores mayores en las plantas de tamaño pequeño que recibieron fertilización. En la segunda etapa (4-8 meses) se observaron valores muy superiores en la TCR de todas

las plantas aclimatadas, indicando que es a partir de este período donde se inicia el crecimiento neto de las plántulas, una vez superada la etapa de aclimatación. Los mayores valores de TCR lo presentaron las plántulas de tamaño grande que recibieron fertilización, seguido por las plantas pequeñas que fueron fertilizadas.

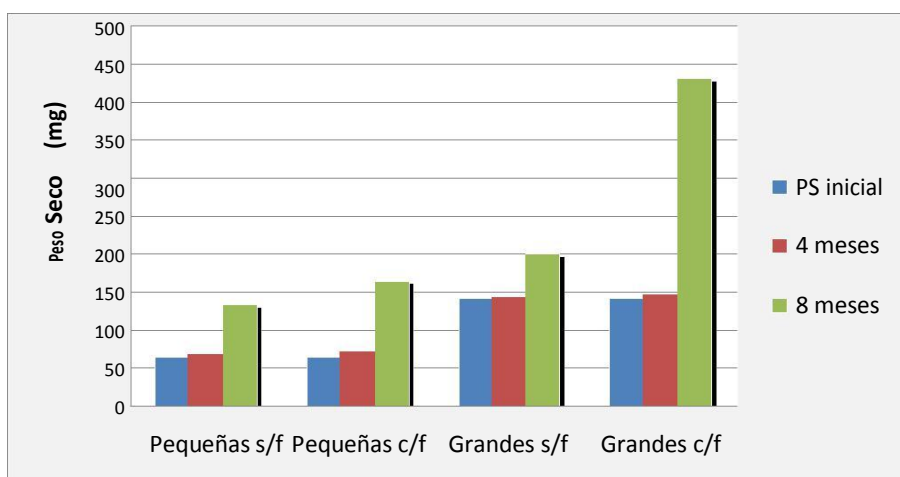


Figura 6. Peso seco (mg) promedio de las plántulas (pequeñas: 4- 6 cm y grandes: 8 -10 cm) al momento de ser removidas de los frascos de cultivo y luego de 4 y 8 meses de ser transferidas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*, siendo fertilizadas semanalmente (c/f) o no (s/f) con Inicium[®] durante los primeros cuatro meses de aclimatación directa en el umbráculo.

Tabla 2. Tasa de crecimiento relativo (TCR) obtenida a partir de plántulas de *Cohniella cepula* de diferente tamaño inicial llevadas directamente a las condiciones ambientales externas en un umbráculo, fertilizadas o no semanalmente durante los primeros cuatro meses de aclimatación. Se indican los valores obtenidos para los intervalos de tiempo entre 0 a 4 meses y 4 a 8 meses de iniciado el experimento.

Tratamientos ⁽¹⁾		TCR (mg.mg ⁻¹ .día ⁻¹)	
Plantas	Fertilización	0 - 4 meses	4 - 8 meses
Pequeñas	sin Inicium [®]	6,9	72,6
	con Inicium [®]	13,2	126,5
Grandes	sin Inicium [®]	1,7	97,2
	con Inicium [®]	5,7	1022,4

⁽¹⁾ Plantas pequeñas = 4-6 cm; plantas grandes = 8-10 cm; Fertilización con solución de Inicium[®] (0,6% v/v), de la empresa Bioibérica S.A.

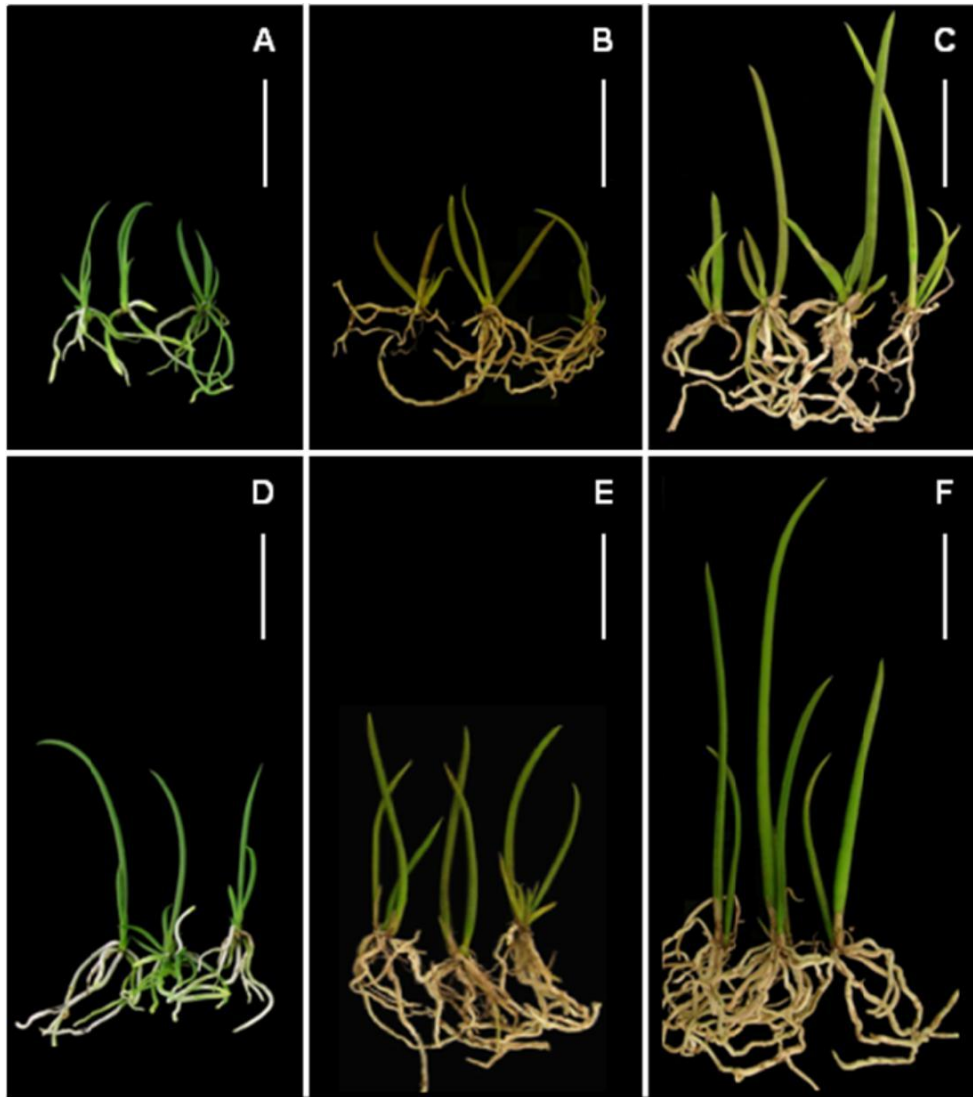


Figura 7. Aclimatación de plantas de *Cohniella cepula* a las condiciones de crecimiento *ex vitro*. **A-C)** Plántulas pequeñas: **(A)** al momento de ser removidas de los frascos de cultivo y **(B,C)** luego de 8 meses de iniciada la aclimatación, con los tratamientos sin fertilización **(B)** y con fertilización **(C)**. **D-F)** Plántulas grandes: **(D)** al momento de ser removidas de los frascos de cultivo y **(E,F)** luego de 8 meses de iniciada la aclimatación, con los tratamientos sin fertilización **(E)** y con fertilización **(F)**. Las barras representan 5 cm.

DISCUSIÓN

Germinación in vitro de semillas y regeneración de plantas

Con este estudio fue posible desarrollar una metodología de cultivo *in vitro* que permite la regeneración de plantas de *C. cepula* a partir de la germinación asimbiótica de semillas, evaluando diferentes factores que afectan dicho proceso.

En cuanto al establecimiento *in vitro* de un determinado material vegetal, evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto de suma importancia para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino también en su ulterior incubación y manipulación durante las etapas de crecimiento y multiplicación. En tal sentido, el uso de cápsulas cerradas es muy conveniente a la hora de establecer *in vitro* semillas de orquídeas, porque pueden ser fácilmente desinfectadas superficialmente, manteniendo estéril su interior. La ventaja de este método es que no se requiere de la desinfección de las semillas, lo que podría provocar su deterioro. Sin embargo, es necesario determinar para cada especie el nivel de madurez fisiológica adecuado al momento de la recolección con el fin de garantizar un alto porcentaje de viabilidad y germinación de las semillas. En algunas especies, las semillas tomadas de cápsulas inmaduras podrían germinar más rápido que las provenientes de cápsulas maduras, debido a que se evitan de esta manera los mecanismos de dormancia. La desventaja de este método es que al abrir una cápsula inmadura, todas las semillas en su interior deben ser utilizadas inmediatamente o ser eliminadas (mientras que las semillas provenientes de cápsulas maduras podrían secarse adecuadamente y luego ser almacenadas hasta su uso posterior). También debe considerarse que en ciertas especies, las semillas sembradas a partir de cápsulas que no han madurado lo suficiente podrían germinar lentamente o simplemente no germinar. Por el contrario, al esperar a que la cápsula esté completamente madura se corre el riesgo de la apertura del fruto con la consecuente pérdida de semillas, así como también la contaminación del interior de la cápsula y una mayor dificultad posterior en la desinfección de las semillas (Mosqueda, 2010). En relación a esto, Dalzotto et al. (2013) reportaron la presencia de protocormos blancos (muertos) luego de 77 días del cultivo *in vitro* de semillas de *Isochilus linnearis*, *Oceoclades maculata* y *Oncidium viperinum* que fueron desinfectadas directamente utilizando una solución de NaClO 0,5% + Tween 20 0,1%.

En este trabajo, fue posible tanto la germinación como el desarrollo de protocormos y la posterior regeneración de plantas a partir de semillas provenientes de cápsulas cerradas con los diferentes grados de madurez evaluados (85 a 100 días post-polinización). Si bien

no se registraron diferencias significativas en lo que respecta a la germinación de las semillas, el desarrollo de protocormos fue significativamente afectado por la edad fisiológica de la cápsula de la que provenían las semillas; obteniéndose los mayores porcentajes de protocormos, al cabo de 60 días de cultivo, a partir de semillas provenientes de cápsulas con mayor grado de madurez. Lo et al. (2004), al evaluar la influencia de la edad de la cápsula (8 a 14 semanas post-polinización manual) en la germinación de semillas de *Dendrobium tosaense*, obtuvo el mayor porcentaje de germinación y desarrollo de plántulas a partir de semillas provenientes de cápsulas de 12 semanas (84 días). Por su parte, Hossain et al. (2013) buscaron un protocolo para la germinación asimbiótica de embriones inmaduros (28 semanas post-polinización) de *Acampe papillosa*, basándose en informes que aseguran que al madurar las semillas de muchas especies de orquídeas muestran disminución en su capacidad para germinar.

En cuanto a la composición del medio de cultivo para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas, se reportan en la literatura diferentes medios de uso generalizado como Knudson C (Knudson, 1946), MS (Murashigue y Skoog, 1962), Hutner (Hutner, 1953), Dalla Rosa y Laneri (Dalla Rosa y Laneri, 1977), VW (Vacin y Went, 1949) y Lindemann (Lindemann, 1970). Sin embargo, la complejidad del medio de cultivo varía según los requerimientos de las distintas especies, que pueden ser muy diversos incluso en especies de un mismo género (Mosqueda Mayo et al., 2010). En algunos casos es suficiente el uso de un medio basal solo y en otros es necesaria la combinación con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y/o aditivos orgánicos de composición no bien definida, como ser el agua de coco, puré de bananas, peptona de soja, extracto de malta. Por otra parte, debido al pequeño tamaño de las semillas de orquídeas, es factible utilizar los medios basales diluidos a la mitad o incluso a un cuarto de su concentración salina estándar para mejorar la germinación, proliferación y transformación de los protocormos en plantas, evitando exponer a los embriones a medios salinos concentrados. Finalmente, a la hora de desarrollar un protocolo de micropropagación, es importante tener en cuenta que el criterio de “complejidad” de un medio de cultivo depende no solo de su composición química, sino también de su disponibilidad y precio en el mercado.

En este estudio se empleó un medio nutritivo de uso frecuente en los laboratorios de micropropagación de plantas, como es el MS, en su formulación completa o diluida al 50% y 25%, sin el agregado de RCV ni aditivos orgánicos. Al cabo de 60 días del cultivo, tanto la germinación como el desarrollo de protocormos ocurrieron en las tres concentraciones

del medio basal evaluadas. Si bien el desarrollo de protocormos presentó valores superiores en MS en su formulación completa, no se registraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos; por lo cual puede recomendarse el uso de MS en concentraciones más diluidas para la germinación de semillas de esta especie a gran escala.

Resultados similares a los obtenidos con semillas de *C. cepula* fueron reportados con *Cattleya lundii* y *Dendrobium kingeanum* (Billard y Lallana, 2009), así como con semillas de *Dendrobium lindleyi* y *D. nobile* (Flachsland et al., 1996) empleando el medio basal MS al 50% desprovisto de RCV y aditivos orgánicos. Por su parte, los mayores porcentajes de germinación de semillas de *Brassavola perrinii*, *B. tuberculata*, *Broughtonia sanguinea*, *Cattleya amethystoglossa*, *C. forbesii*, *C. intermedia*, *C. velutina*, *C. walkeriana*, *Miltonia flavescentes*, *Oncidium bifolium*, *O. jonessianum* y *O. varicosum* fueron obtenidos en MS 50% suplementado con puré de bananas verdes, mientras que con semillas de *Epidendrum pseudoepidendrum* y *Phalaenopsis amboinensis*, los mejores resultados se lograron en MS 50% con puré de bananas verdes y carbón activado (Flachsland et al., 1996). Roy et al. (2011) alcanzaron los mayores porcentajes de germinación de semillas de *Vanda coerulea* en el medio PhytamaxTM (Sigma) seguido por MS, siendo la principal diferencia entre ambos medios el contenido de peptona de soja presente en PhytamaxTM, lo cual podría ser el componente que marque la diferencia en la germinación de esta especie. Algo similar ocurre con semillas de *Conhiella jonesiana*, las cuales presentaron los mayores porcentajes de germinación en MS suplementado con peptona de soja (Dolce et al., 2014).

Considerando el posterior desarrollo de los protocormos, una ventaja que presentan las semillas de *C. cepula* es que no requieren un cambio de medio nutritivo luego de la germinación para que continúe el proceso de diferenciación y crecimiento; mientras que para ciertas especies se reporta la necesidad de suplementar el medio de cultivo con RCV (citocininas o auxinas) para la multiplicación de protocormos y posterior desarrollo de plántulas (Roy et al., 2011).

En lo que respecta a la incubación de los cultivos, es conveniente que la misma se realice en ambientes controlados al menos en lo que se refiere a las condiciones de luz y temperatura (Mroginski y Roca, 1991). En muchos casos, las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la calidad, intensidad y duración de la luz (Seibert et al., 1980; Hughes, 1981). Para el caso particular de las orquídeas, se ha reportado que la germinación es diferente según se trate de especies epífitas (las cuales necesitan luz durante el proceso) o terrestres (las cuales germinan en oscuridad) (Barbery Knaudt y Morales Benarent,

2011). De todos modos, las necesidades de luz u oscuridad en la incubación durante la germinación y posterior desarrollo de protocormos difieren de una especie a otra. En este estudio, la germinación de semillas de *C. cepula* se vio favorecida por la incubación en condiciones de luz (fotoperíodo de 14 horas e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), registrándose diferencias significativamente superiores en lo que se refiere al desarrollo de protocormos en dicha condición lumínica comparado con lo ocurrido en oscuridad permanente. Por otra parte, en un estudio realizado con semillas de la orquídea *Masdevallia auropurpurea* Reich evaluando el efecto de la luz blanca, luz roja filtrada, luz roja lejana filtrada y oscuridad sobre la germinación *in vitro*, Pedroza-Manrique (2007) demostró que el mayor número de semillas germinadas se presentó en condiciones de luz roja, seguida por la luz roja lejana y la oscuridad. A diferencia de lo observado en *C. cepula*, la luz blanca fue la menos efectiva en promover la germinación y, adicionalmente, se encontró que esta calidad de luz aunque promovió la producción de protocormos robustos y alargados, estimuló una amplia proliferación de callos friables, evitando la continuación del desarrollo morfogénico de los protocormos y su conversión en plántulas.

En cuanto al posterior desarrollo de los protocormos obtenidos a partir de los diferentes tratamientos, luego de ser transferidos a MS suplementado con CA e incubados en condiciones de luz, el subsecuente crecimiento y desarrollo completo de plántulas ocurrió sin inconvenientes. Al cabo de ~180 días de iniciado el experimento, se contaba con plantas de *C. cepula* con un tamaño y un sistema radicular adecuados para ser transferidas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*. El beneficio que ofrece el CA para el desarrollo de protocormos y posterior conversión a plantas fue evidenciado previamente en *Brassavola perrinii* e híbridos intergenéricos (Vidoz et al., 1998), *Phalaenopsis* sp., *Dendrobium* sp. y *Ophrys* sp. (Thomas, 2008) y *Vanda coerulea* (Roy et al., 2011). Este efecto promotor del CA ha sido atribuido a su capacidad de actuar como antioxidante, adsorbiendo etileno y fenoles liberados por las plantas y mejorando el enraizamiento (Arditti y Ernst, 1993; Pan y van Staden, 1998; Fridborg et al., 1978). Zhou et al. (1995) reportaron que el uso de CA en los medios de cultivo favorece un mayor crecimiento del sistema radical en las orquídeas debido a que el oscurecimiento del medio de cultivo estimula la formación de un mayor número de raíces positivamente geotrópicas. Asimismo, George y Ravishankar (1997) observaron que la presencia de CA en el medio de cultivo estimula el enraizamiento en *Vanilla planifolia*. Pedroza-Manrique et al. (2009),

trabajando con *Epidendrum elongatum*, demostraron que la tasa media de crecimiento, el desarrollo caular, foliar y radicular fue mucho mayor en los tratamientos con CA. Adicionalmente, Chang y Chang (2000) y Thomas y Michael (2007) informaron que la presencia de CA en el medio de cultivo promueve el crecimiento de plántulas *in vitro* de *Cymbidium sinense* y *Rhynchostylis retusa*, respectivamente.

Por su parte, Lo et al. (2004) trabajando con *Dendrobium tosaense*, observaron que las plántulas provenientes de la germinación de semillas de dicha especie transferidas a MS desprovisto de aditivos mostraban un crecimiento limitado. Por lo tanto, para conseguir un crecimiento adicional, añadieron al medio de cultivo varios aditivos orgánicos, como ser banana homogeneizada, extracto de papa y/o agua de coco, los cuales han demostrado favorecer el crecimiento de plántulas en muchas especies de orquídeas (Kusumoto y Furukawa, 1977; Kusumoto, 1979; Kim et al., 1970; Arditti, 1977; Juang y Lee, 1986; Lu y Lee, 1990; Chen y Chen, 1998; Shiau et al., 2002). La evaluación visual de los cultivos sugirió que la adición de banana homogeneizada fue óptima para el crecimiento de las plántulas de *Dendrobium tosaense*.

Aclimatación de las plántulas a las condiciones de crecimiento ex vitro

La etapa de aclimatación involucra la transferencia de las plantas desde las condiciones de crecimiento *in vitro* a las condiciones *ex vitro* en un invernadero. Esta fase es crítica y representa, en algunos casos, un factor limitante en el proceso de micropropagación. En condiciones *in vitro*, las plantas se encuentran en un ambiente con humedad relativa elevada (cercana al 100%), intensidad lumínica baja ($100\text{--}120\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura constante ($27\pm 2\ ^\circ\text{C}$), además de contar con nutrientes disponibles. Una vez retiradas de los frascos y llevadas a las condiciones de un invernadero, las plantas sufren un marcado estrés debido a que la situación cambia drásticamente. Una planta aparentemente perfecta en condiciones *in vitro* presenta una serie de deficiencias anatómicas que dificultan el control de la transpiración y permiten una rápida pérdida de agua. Los estomas no son funcionales y responden muy lentamente al estrés hídrico, a la vez que la cera protectora sobre las hojas es mínima o inexistente. Debido a ello, durante la etapa de la aclimatación es muy importante mantener la humedad relativa elevada en el ambiente en que se encuentren las plantas y suministrarles luz difusa para mejorar la funcionalidad de las hojas. Por otra parte, las plantas deben cambiar su condición de heterótrofas a totalmente autótrofas. En tal sentido, es de esperar que la aplicación de fertilizantes ayude a transitar dicho cambio

de condición durante la aclimatación. En la actualidad, existe la posibilidad de emplear productos comerciales a base de péptidos de bajo peso molecular que permiten superar el estrés que sufren las plántulas al momento del trasplante y que fueron probados en diversas especies hortícolas, frutícolas y forestales (Botta *et al.*, 2009; Cañete *et al.*, 2012). En particular, el producto Inicium[®] se ha citado como un activador del desarrollo de las raíces de plántulas en las etapas iniciales de su crecimiento, asegurando su establecimiento cuando son transferidas a un nuevo entorno productivo (Botta *et al.*, 2009) y que frente a una situación de estrés, induce a las plantas a activar la expresión de proteínas de estrés que tienen como función proteger a las células (Ruz *et al.*, 2004).

De acuerdo a los resultados de sobrevivencia de las plántulas de *C. cepula*, en este estudio no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos evaluados, logrando valores altos en todos los casos (promedio general 87,5%), descartando para esta especie la necesidad de un periodo previo de adaptación a las condiciones *ex vitro* en cámaras húmedas mantenidas bajo condiciones de luz y temperatura controladas. Distinto fue el caso de las plántulas de *Laelia speciosa* (Gonzalez Castellanos, 2014), cuyo porcentaje de sobrevivencia pasó de 70% a 97-100% cuando recibieron un periodo de pre-adaptación a las condiciones *ex vitro*, manteniéndolas en cámaras de aclimatación con elevada humedad relativa y condiciones de luz y temperatura controladas durante los primeros 20 días, luego de lo cual la cámara se trasladó a un invernadero. Este proceso de aclimatación gradual favorece la adaptación de la apertura de los estomas y mitiga la pérdida de agua (Gonzalez Castellanos, 2014).

La influencia que ejercen el tamaño inicial de la plántula y la fertilización durante la etapa de aclimatación fueron evaluadas empleando una medida directa del crecimiento, como lo es la acumulación de materia seca durante períodos de 4 meses y 8 meses, y una medida indirecta, como lo es la TCR (índice que permite evaluar la acumulación de materia seca en el tiempo, lo cual resulta importante para el análisis del crecimiento de una planta en estadios tempranos de desarrollo). La escasa acumulación de materia seca observada en plántulas de *C. cepula* durante los primeros 4 meses se puede explicar debido al tiempo de adaptación que requieren las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* a las condiciones *ex vitro*, donde además, se pudo observar el reemplazo de algunos órganos foliares y radicales, secándose las antiguas y generando nuevas, dando un balance apenas positivo. Pasada esta etapa, se observa una acumulación de materia seca mucho mayor (PS acumulado a los 8 meses). Lo mismo ocurrió con la TCR, la cual durante los primeros 4

meses presentó valores bajos, correspondiéndose con que este primer período se trata más de una adaptación a las nuevas condiciones de vida que al crecimiento en sí, y pasado este período la TCR incrementó.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, tanto el tamaño de las plántulas de *C. cepula* al momento de ser removidas de las condiciones de crecimiento *in vitro* como la fertilización durante el periodo de aclimatación, no fueron factores determinantes para la sobrevivencia de las plantas a lo largo de los 8 meses evaluados. Sin embargo, ambas variables tuvieron importancia creciente a medida que se prolonga el periodo de crecimiento en condiciones *ex vitro*, lo cual es comprobable al analizar la TCR luego de 4 y 8 meses de ser transferidas al umbráculo. Una vez superada la etapa de aclimatación (4 meses), la TCR incrementó considerablemente, especialmente en aquellas plantas de tamaño grande que recibieron aplicación semanal de Inicium[®], resultando además en plantas de mejor estado en general. Por lo tanto, en un sistema productivo, el tamaño adecuado de las plántulas al momento del transplante dependerá de las necesidades del productor, ya que tanto las plantas de tamaño pequeño (4-6cm) como grande (8-10 cm) pueden ser exitosamente aclimatadas a las condiciones *ex vitro*, aunque presentando marcadas diferencias en la TCR. El efecto positivo de un mayor tamaño inicial de las plántulas también fue comprobado por van Ginderdeuren Raveschot (2009), quien en su trabajo sobre aclimatación de la especie *Chloraea virescens* observó que las plántulas mayores a 3 cm presentaban, además de una mayor sobrevivencia, una mayor altura, número de hojas y de raíces al cabo del periodo de aclimatación, que aquellas plántulas de 2-3 cm y las de 1-2 cm de altura. Según experiencias previas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la FCA-UNNE, las únicas plantas que pueden ser exitosamente aclimatadas y posteriormente transferidas a sustratos *ex vitro* son las que tienen como mínimo 2 cm de altura (Flachsland, no publicado).

Por lo tanto, en este estudio las plántulas de *C. cepula* mostraron una gran rusticidad al ser transferidas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*, lo que permite realizar la aclimatación de manera sencilla sin necesidad de un período previo de rusticación en cámaras con condiciones ambientales controladas. Para su cuidado *ex vitro* basta con no descuidar el abastecimiento de agua (2 riegos por semana o más según condiciones ambientales) y evitar la exposición directa de las plantas al sol.

CONCLUSIONES

TM Estos estudios permitieron desarrollar una metodología de cultivo *in vitro* para la regeneración de plantas de *C. cepula* a partir de la germinación asimbiótica de semillas.; así como también un sistema eficiente para la aclimatación de las plántulas obtenidas a las condiciones de crecimiento *ex vitro*.

TM La germinación y posterior desarrollo de protocormos fueron posibles en todas las condiciones evaluadas, a partir del cultivo *in vitro* de semillas provenientes de cápsulas de 85-100 días posteriores a la polinización manual.

TM Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron en los medios de cultivo constituidos por MS en su formulación completa o reducida al 50% y realizando la incubación en condiciones de luz; aunque no se registraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, incluso en lo que respecta al grado de madurez de la cápsula de la que provenían las semillas.

TM El desarrollo de protocormos fue significativamente afectado tanto por la edad fisiológica de la cápsula de la que provenían las semillas como por la condición de luz bajo la cual que fueron incubados los cultivos, obteniéndose los mayores porcentajes de protocormos a partir del cultivo de semillas provenientes de cápsulas de 100 días post-polinización y realizando la incubación bajo un fotoperíodo de 14 h e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. En cuanto a la composición del medio de cultivo, no se registraron diferencias significativas entre los valores obtenidos en las tres concentraciones evaluadas del medio basal MS.

TM Las plantas regeneradas *in vitro* fueron exitosamente aclimatadas a las condiciones de crecimiento *ex vitro* siguiendo una metodología sencilla y sin necesidad de un período previo de rusticación o de pre-aclimatación en cámara con condiciones ambientales controladas. Se recomienda el uso de plántulas de 8-10 cm de longitud y la fertilización semanal con solución de Inicim[®] durante los 4 primeros meses de aclimatación.

TM Este trabajo aporta información sobre el efecto de diferentes factores que afectan la germinación asimbiótica de semillas de *C. cepula* y describe un protocolo simple y eficiente para la propagación a gran escala de esta orquídea amenazada. Asimismo, estos procedimientos proveerán una valiosa herramienta para evaluar la sobrevivencia de las semillas almacenadas a la hora de poner en marcha programas de conservación de germoplasma de orquídeas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arditti J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture – A manual. En: Arditti J. (ed.) *Orchid biology: reviews and perspectives Vol I*, New York: Cornell University Press; pp 203-293.
- Arditti J. y Ernst R. 1993. *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 682 pp.
- Barbery Knaudt R. y Morales Benarent I. 2011. Manual para el cultivo *in vitro* de la orquídea *Cattleya nobilior* “Flor símbolo de Concepción”. Centro para la participación y el desarrollo humano sostenible CEPAD, Santa Cruz, Bolivia, pp. 31-32.
- Bechtel H., Cribb P. y Launert E. 1986. *The manual of cultivated orchid species*. The Mitt Press, Massachusetts, 444 pp.
- Bernard N. 1899. Sur la germination de *Neottia nidus-avis*. *Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences* 128: 1253-1255
- Billard C.E. y Lallana V.H. 2009. Aclimatación de plantas de orquídeas obtenidas por germinación *in vitro*. Resúmenes de ponencias pag. 18. VI Reunión de comunicaciones científica y técnicas y IV de Extensión. Facultad de Ciencias Agropecuarias –UNER, Oro Verde.
- Botta A., Marín C., Piñol R., Ruz L., Badosa E. y Montesinos E. 2009. Study of the mode of action Inicium[®], a product developed specifically to overcome transplant stress in strawberry plants. *Acta Horticulturae* 842: 721–724.
- Cañete M., Kosciak R., Burgos A., Medina R. y Cenóz P. 2012. Efecto del sombreado y de la aplicación de un iniciador de la actividad radicular sobre el crecimiento de plantines de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). 23^{ra}. Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas, FCA-UNNE. Corrientes Argentina. <http://agr.unne.edu.ar>
- Carnevali Fernández-Concha G., Cetzal-Ix W., Balam Narváez R. y Romero-González G. 2010. A synopsis of *Cohniella* (Orchidaceae, Oncidiinae). *Brittonia* 62: 153-177.
- Cetzal-Ix W., Carnevali G. y Paiva Castro V. 2012. *Cohniella* (Orchidaceae: Oncidiinae) South of the Amazon River. *Systematic Botany* 37: 58-77.
- Cetzal-Ix W., Carnevali G., Noguera-Savelli E. y Romero-González G. 2013. What is *Cohniella cebolleta*? Recircumscription and new and reinstated species and combinations (Orchidaceae). *Systematic Botany* 38: 606-623.
- Chang C. y Chang W.C. 2000. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Wild *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 30: 171–175.
- Chen F.C. y Chen T.C. 1998. Effect of salt strength and organic additives on the *in vitro* growth of protocorm-like bodies and plantlets of *Oncidium* “Grower Ramsey”. *Journal of the Chinese Society for Horticulture Science* 44: 403–412.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). n.d (<http://www.cites.org>)
- Correa M.N. 1996. Orchidaceae. Zuloaga F.O. y Morrone O. (eds) *Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina I. Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae Monocotyledoneae*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 60: 242-271.

- Dalla R.M y Laneri U. 1977. Modification of nutrient solutions for germination and growth “*in vitro*” of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. American Orchids Society Bulletin 46: 813- 820.
- Dalzotto C.A. y Lallana V.H. 2013. Viabilidad, germinación asimbiótica y vigor de tres especies de orquídeas nativas. Revista Científica Agropecuaria 17(1-2): 39-47.
- Dasgupta M., Mohapatra U., Nayak N.R., Rath S.P. y Patnaik S.N. 2004. En: Britto S.J. (ed.) Orchids: Biodiversity and Conservation - A Tissue Culture Approach. INR, St Joseph's college, India, Tiruchirappalli, pp. 17-33.
- Dolce N., Kettler B., Mroginski L. y Rey H. 2014. Germinación asimbiótica de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Rchb.f.) M.W. Chase & N.H. Williams (Orchidaceae). Actas XXXVII Congreso Argentino de Horticultura.
- Dressler R.L. 1981. The Orchids: Natural History and Classification. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 332 pp.
- Dressler, R.L., 1993. Phylogeny and classification of the Orchid family. Dioscorides Press. Hong Kong. 314 pp.
- Fitzgerald S. 1989. Whose business is it? World Wildlife Fund, Washington DC.
- Flachsland E.A., Terada G., Rey H.Y. y Mroginski L.A. 1996. Medios de cultivo para la germinación *in vitro* de 41 especies de orquídeas. FACENA 12: 93-97.
- Fridborg G., Pedersen M., Landstorm L.E. y Eriksson T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue culture; absorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiologia Plantarum 43: 104–106.
- George P.S. y Ravishankar G.A. 1997. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. Plant Cell Reports 16: 490–494.
- Givnish T., Spalink D., Ames M., Lyon S., Hunter S., Zuluaga A., Iles W., Clements M., Arroyo M., Leebens-Mack J., Endara L., Kriebel R., Neubig K., Whitten W., Williams N. y Cameron K. 2015. Proceedings of the Royal Society. London, Series B 282, 20151553.
- Gonzalez Castellanos L.A. 2014. Propagación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Orchidaceae) nativa de Aguascalientes. Trabajo final de graduación, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas. Aguascalientes, México.
- Hadley G. 1997. Orchid mycorrhiza. In: Orchid Biology: Reviews and perspective Vol. II. New York: Cornell University Press. Arditti J. y Pridgeon A.M. (eds.). Ithaca, 424 pp.
- Hossein P., Promila P. y Bhanwra R.K. 2013. Asymbiotic germination of immature embryos of a medicinally important epiphytic orchid *Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl. African Journal of Biotechnology 12(2): 162-167.
- Hughes K.W. 1981. *In vitro* ecology; exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. Environmental and Experimental Botany 21: 281–288.
- Hutner S.H. 1953. Comparative physiology of heterotrophic growth in plants. Growth and differentiation in plants. LOOMIS WE. (ed). Iowa State College Press. Ames, USA, 458 pp.
- Insaurralde I.S. y Radins J.A. 2007. Misiones Orquídeas - Orchids. 1^a ed. Buenos Aires Golden Company, Buenos Aires, 192 pp.

- Johnson A.E. 1992. Listado tentativo de las orquídeas de la Argentina. (Abundancia - Distribución - Conservación). Boletín Técnico Fundación Vida Silvestre Argentina 11: 1-82.
- Johnson, A.E. 2001. Las Orquídeas del Parque Nacional Iguazú, LOLA, Buenos Aires, 296 pp.
- Juang J.H., Lee N. 1986. Effect of niacin, coconut milk and banana homogenate on seed germination and seedling growth of *Pleione formosana*. Journal of the Chinese Society for Horticulture Science 32: 132-138.
- Kim K.K., Kunisaki J.T. y Sagawa Y. 1970. Shoot tip culture of *Dendrobium*. American Orchid Society Bulletin 39: 1077-1080.
- Koopowitz H. 1992. A stochastic model for the extinction of the tropical orchids. Selbyana 13: 115-122.
- Knudson L. 1922. Non symbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette 73: 1-25.
- Knudson L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin 15: 214-217.
- Kusumoto M. y Furukawa J. 1977. Effect of organic matter on the growth of *Cymbidium* protocorms cultured *in vitro*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 45(4): 421-426.
- Kusumoto M. 1979. Effects of combinations of growth regulators, and of organic supplements on the growth of *Cattleya* plantlets cultured *in vitro*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 47(4): 492-501.
- Lindemann E.G.P., Guncke J. E. y Davidson W.O. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. American Orchid Society Bulletin 39: 1002-1004.
- Lo S.F., Nalawade S.M., Kuo C.L., Chen C.L. y Tsay H.S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 4: 528-535.
- Lu I.L. y Lee N. 1990. *In vitro* germination of *Cymbidium dayanum*. Journal of the Chinese Society for Horticulture Science 36: 198-209.
- Luan V.Q., Thien N.Q., Khiem D.V. y Nhut D.T. 2006. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. Nong Lam University Ho Chi Minh City, pp. 175-177.
- Moore D. 1849. On growing orchids from seeds. The Gardeners' Chronicle 35: 549.
- Mosqueda Mayo A., Cázares Camero J.G., De la Cruz L.E. y Flores Hernández A. 2010. Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. Colección José N. Rovirosa, Biodiversidad, Desarrollo Sustentable y Trópico Húmedo. Villahermosa, Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 32 pp.
- Mroginski L.A. y Roca W.M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. pp. 19-40.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Pan M.J. y Van Staden J., 1998. The use of charcoal *in vitro* culture – a review. *Plant Growth Regulation* 26: 155–163.
- Pedroza-Manrique J.A. 2007. Efecto del medio básico, carbón activado, ácido giberélico y calidad de luz en la germinación *in vitro* de *Masdevallia auropurpurea* Reich. *Revista Científica de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas* 9: 117-114.
- Pedroza-Manrique J.A. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq. bajo condiciones *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11(1): 17-32.
- Popova E., Kim H.H., Saxena P.K., Engelmann F., Pritchard H.W. 2016. *Biotechnology Advances* 34: 380-403.
- Roy A.R., Patel R.S., Patel V.V., Sajeev S. y Bidyut C.D. 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae* 128: 325-331.
- Ruz L., Badosa E. y Montesinos E. 2004. Las proteínas de estrés en las plantas. *Phytoma* 159: 49-51.
- Seibert, M. y Kadkade, P.G. 1980. Environmental factors. A: Light. En: Staba E.J. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E. U. pp. 123-141.
- Shiau Y.J., Sagare A.P., Chen U.C., Yang S.R. y Tsay H.S. 2002. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial crosspollination and *in vitro* culture of seeds. *Botanical Bulletin- Academia Sinica* 43: 123-130.
- Singh F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin* 50: 416-418.
- Teixeira da Silva J.A. 2013. Orchids: Advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 7: 1-52.
- Thomas D.T., Michael A. 2007. High frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa* Blume., an exquisite orchid. *Plant Biotechnology Reports* 1: 243-249.
- Thomas D.T. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618-631.
- Vacin F. y Went F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette* 110: 605-613.
- van Ginderdeuren Raveschot V. 2009. Aclimatación de plántulas de *Chloraea virescens* (Willd.) Lindl. cultivadas *in vitro*. Trabajo Final de Graduación, Universidad Austral de Chile, Escuela de Agronomía. Valdivia, Chile.
- Vidoz M.L., Flachsland E.A., Rey H.Y. y Mroginski L.A. 1998. Obtención de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de híbridos intergenéricos a través del cultivo *in vitro* de semillas. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste*, tomo III, Ciencias Agrarias y Ciencias Biológicas, pp. 30-32.
- Weber W.S. y Webster J. 2001. Teaching techniques for mycology: 14. Mycorrhizal infection of orchid seedlings in the laboratory. *MYCOLOGIST*, Volume 15, part 2, May.

- Withner C.L. 1977. Threatened and endangered species of orchids. En: Prance G.T. y Elias T.S. (eds.) Extinction is forever. New York Botanical Garden, USA, pp. 314-322.
- Wood J.J. 1989. En: Pritchard H.W. (ed.) Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management. Cambridge University Press, UK, pp. 141-145.
- Zhou H., Li S., Qian X.H. y Gong H.F. 1995. Effect of some factors on plantlet growth of *Dendrobium* in tissue culture. Journal of Zhejiang Agricultural University 21: 622-624.
- Zuloaga F.O., Morrone O. y Rodríguez D. 1999. Análisis de la biodiversidad de las plantas vasculares de la Argentina. Kurtziana 27: 17-167.