

17. Ciencia, Tecnología e Innovación

Multiplicación clonal de *Cohniella cepula* (Orchidaceae) mediante el cultivo *in vitro* de ápices caulinares

Gimenez, Carla Anahí; Zorat, Ignacio; Dolce, Natalia Raquel

caarlagimenez64@gmail.com; angelignacioz@hotmail.com; nrdolce@gmail.com

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Nordeste

Resumen

El objetivo de este estudio fue desarrollar un sistema eficiente para la regeneración de plantas *in vitro* de *Cohniella cepula* a partir de ápices caulinares, con el propósito de multiplicar masivamente aquellos genotipos selectos, así como para su uso posterior en estudios de crioconservación. En este experimento se usaron ápices caulinares de plantas etioladas de *C. cepula*, obtenidas mediante la incubación de los cultivos en un cuarto climatizado y oscuridad permanente. Los ápices fueron cultivados individualmente en tubos conteniendo 3 ml de medio de cultivo semisólido. Se ensayaron 31 medios de cultivo con el propósito de evaluar el efecto del tipo, concentración y combinación de los reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio basal: citocininas [N6-bencilaminopurina (BAP) y cinetina (CIN)] y auxinas [ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA)]. A los 60 días del cultivo de los ápices, la regeneración de plántulas ocurrió en todos los medios de cultivo evaluados. Los porcentajes de regeneración oscilaron entre 85 y 95%, sin registrarse diferencias entre los distintos medios de cultivo, excepto en el medio basal MS donde dicho porcentaje fue de alrededor del 50%. Por otra parte, respecto al número promedio de plántulas registrado luego de 60 días de la transferencia de los cultivos a MS, los mayores valores se obtuvieron a partir de ápices cultivados en los medios constituidos por MS suplementado con CIN 1 mg/L + IBA 0,01 mg/L, CIN 3 mg/L + ANA 0,1 mg/L y BAP 1-3 mg/L + ANA 0,1 mg/L. En dichos medios de cultivo, se obtuvo un promedio de 5-6 plántulas/ápice cultivado, diferenciándose de los valores registrados en MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal (1 plántula/ápice).

Palabras clave: Micropropagación, citocininas, auxinas, orquídeas.

Introducción

El género *Cohniella* Pfitzer pertenece a la familia Orchidaceae, una de las familias botánicas más numerosas y diversas. Es un género Neotropical distribuido desde el norte de México hasta el sur de Brasil y norte de Argentina, principalmente en tierras bajas. En Argentina, este género cuenta con dos especies nativas que habitan en las provincias del norte: *C. cepula* y *C. jonesiana* (Carnevali et al., 2010; Cetzal-Ix et al., 2012; 2013). 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 (Insaurralde y Radins, 2007).

El uso de especies nativas en los programas de mejoramiento genético es una estrategia importante para garantizar mejor adaptabilidad de los cultivares obtenidos a las condiciones climáticas y de cultivo locales (Faria et al., 2015), lo que permite ofrecer al consumidor productos novedosos y de calidad. Asimismo, a partir de que una especie o grupo de especies se tornan útiles para el hombre, nace el interés por estudiarlas en profundidad y conservarlas.

Para la selección de plantas ornamentales de calidad superior, deben considerarse elementos ornamentales tales como el

color, el tamaño y la proporcionalidad de las flores, además del vigor vegetativo; y las características agronómicas tales como el crecimiento rápido y vigoroso, floración temprana, durabilidad de las flores, resistencia a plagas y enfermedades, entre otras (Cardoso, 2010).

Objetivos

El objetivo de este estudio fue desarrollar un sistema eficiente para la regeneración de plantas de *C. cepula* a partir de ápices caulinares de plantas *in vitro*, con el propósito de multiplicar masivamente aquellos genotipos selectos por sus características ornamentales y agronómicas, así como para su uso posterior en estudios de crioconservación de dicho germoplasma.

Materiales y Métodos

Se trabajó con plantas *in vitro* de *Cohniella cepula* (Hoffmanns.) Carnevali & G. Romero obtenidas a partir del cultivo de explantes florales, de acuerdo a la metodología descrita por Dolce et al. (2016). Las plantas madres usadas como fuente de explantes para el establecimiento *in vitro* fueron obtenidas en ferias y viveros locales y luego mantenidas en un umbráculo perteneciente a la cátedra de Fisiología Vegetal de la FCA-UNNE (Fig. 1A). Los ejemplares fueron identificados en el

Herbario CTES.

Para la ejecución de este experimento se usaron ápices caulinares de plantas etioladas de *C. cepula* (Fig. 1B y 1C), obtenidas mediante la incubación de los cultivos en un cuarto climatizado a 27 ± 2 °C y oscuridad permanente. Los ápices fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio de 11 ml de capacidad conteniendo 3 ml de medio de cultivo semisólido. Se ensayaron 31 medios de cultivo con el propósito de evaluar el efecto del tipo, concentración y combinación de los reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio basal: citocininas [N6-bencilaminopurina (BAP) y cinetina (CIN)] y auxinas [ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA)]. El medio basal utilizado fue el de Murashige&Skoog, 1962 (MS), con 3% de sacarosa y 0,65% de agar. En todos los casos, el pH de los medios fue ajustado a 5,6 con el agregado de KOH o HCl. Previo al cultivo de los ápices, los tubos conteniendo los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 1,45 kg.cm⁻² y 120 °C durante 20 min.

La incubación de los ápices se realizó en un cuarto climatizado a 27 ± 2 °C con fotoperíodo de 14 h e intensidad lumínica de $116 \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Al cabo de 60 días de cultivo, todos los explantes fueron transferidos a MS libre de reguladores de crecimiento vegetal suplementado con carbón activado (250 mg/L), para la

subsecuente regeneración de plantas.

Los tratamientos fueron arreglados en un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones de 10 ápices para la determinación de los porcentajes de regeneración (entendida como la obtención de al menos una planta entera a partir de un ápice cultivado). Posteriormente, se trabajó con 10 unidades experimentales para la determinación del número promedio de plantas regeneradas por cada ápice. 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 Duncan ($P < 0,05$).

Resultados y Discusión

Al cabo de 60 días del cultivo de los ápices, la regeneración de plántulas ocurrió en todos los medios de cultivo evaluados, incluso en MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal. Los porcentajes de regeneración oscilaron entre 85 y 95%, sin registrarse diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo, excepto en el medio basal MS donde el porcentaje de regeneración de plántulas fue de alrededor del 50%.

Por otra parte, respecto al número promedio de plántulas registrado luego de 60 días de la transferencia de los cultivos a MS con carbón activado (120 días desde el inicio del experimento), los mayores valores se obtuvieron a partir de

ápices cultivados en los medios de inducción constituidos por MS suplementado con CIN 1 mg/L + IBA 0,01 mg/L, CIN 3 mg/L + ANA 0,1 mg/L y BAP 1-3 mg/L + ANA 0,1 mg/L (Fig. 1D y 1E). En dichos medios de cultivo, se obtuvo un promedio de 5-6 plántulas por cada ápice cultivado, diferenciándose significativa-mente de los valores registrados en MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal (1 planta/ápice) o suplementado única-mente con una citocinina (2 plantas/ápice).

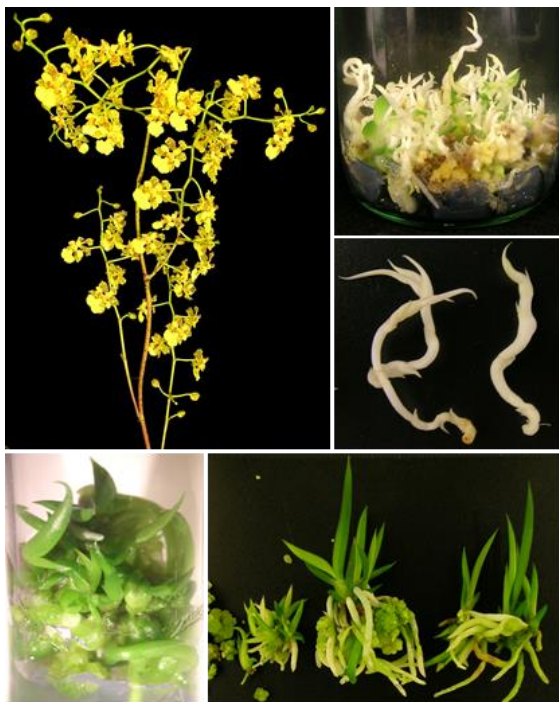


Fig. 1. A) Inflorescencia de un ejemplar de *Cohniellacepula* mantenido en un umbráculo de la FCA-UNNE. B-C) Plantas madres in vitro creciendo en condiciones de oscuridad permanente, a partir de las cuales se aislaron los ápices caulinares. D-E) Regeneración de plantas a partir de un ápice caulinar inducido en MS suplementado con CIN 1 mg/L + IBA 0,01 mg/L luego de 60 (D) y 120 días de iniciado el cultivo (E).

Es bien conocido que el equilibrio entre los reguladores de crecimiento vegetal,

particularmente las citocininas y auxinas, en el medio de inducción es un determinante para la regeneración de plantas mediante la vía organogénica (Evans et al., 1981). En este estudio, los ápices caulinares mostraron respuestas diferenciales de acuerdo a la combinación y concentración hormonal utilizada en los medios de inducción. Si bien los ápices cultivados en MS libre de reguladores de crecimiento vegetal o suplementado únicamente con BAP o CIN fueron capaces de regenerar plantas, se logró una mayor tasa de multiplicación cuando las citocininas se usaron en combinación con auxinas.

Conclusiones

Este trabajo constituye un interesante aporte biotecnológico dado que la regeneración de plantas a partir de ápices caulinares, además de permitir la clonación de genotipos selectos tanto por sus características ornamentales como agronómicas, brinda un explante muy apropiado a la hora de encarar estudios para la crioconservación de su germoplasma, dado que se constituye de tejidos organizados y potencialmente estables desde el punto de vista genético, lo que garantiza el almacenamiento seguro de germoplasma.

Bibliografía

Cardoso, J.C. (2010). *Laeliocattleya*

“BrazilianGirl Rosa”: cultivar de orquídea para cultivo en vaso. *Horticultura Brasileira*, 28: 378-381.

Carnevali Fernández-Concha, G., Cetzallx, W., Balam Narváez, R., Romero-González, G. (2010). A synopsis of *Cohniella* (Orchidaceae, Oncidiinae). *Brittonia*, 62: 153-177.

Cetzal-Ix, W., Carnevali, G., 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., Romero-González, G. (2013). What is *Cohniella cebolleta*? Recircumscription and new and reinstated species and combinations (Orchidaceae). *Systematic Botany*, 38: 606-623.

Dolce N., Dávalos S., Medina R., Mroginski L. (2016). Micropropagación clonal de *Cohniella cepula* (Orchidaceae) mediante el cultivo *in vitro* de explantes florales. Acta XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, p. 197.

Evans, D.A., Sharp, W.R., Flick, C.E. (1981). Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T.A. (ed.) Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press, New York, pp. 45-113.

Faria, R.T., Colombo, R.C., Hoshino, R.T. (2015). *Oncidium sarcodes* x *Oncidium Aloha* ‘Iwanaga’: nova opção de híbrido de *Oncidium*. *Horticultura*

Brasileira, 33: 131-134.

Insaurralde, I.S., Radins, J.A. (2007). Misiones Orquídeas. Buenos Aires Golden Company, Buenos Aires, 192 pp.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Financiamiento

Proyecto 16A010 de la SGCyT-UNNE “Biotecnología aplicada a la propagación y conservación de germoplasma de especies vegetales de interés ornamental, alimenticio o industrial”, aprobado por el Consejo Superior de la UNNE. Resolución N° 970/16. Directora: Dra. Natalia R. Dolce