



## CRECIMIENTO *ex vitro* DE PLÁNTULAS DE *Lycaste aromatica* (GRAHAM) LINDL.

### *Ex vitro* GROWTH OF *Lycaste aromatica* (GRAHAM) LINDL. SEEDLINGS

Flor Y. Solís-Zanotelli, Juan V. Hidalgo-Contreras  
y Obdulia Baltazar-Bernal\*

Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México.

\*Autor de correspondencia (obduliabb@colpos.mx)

#### RESUMEN

En la micropropagación vegetal la aclimatación es una etapa crucial para promover que en las plantas ocurran cambios morfológicos y fisiológicos para su adaptación *ex vitro*. El objetivo del presente estudio fue evaluar la supervivencia y desarrollo de plántulas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. obtenidas en dos sistemas de micropropagación (medio semisólido y medio líquido en biorreactor de inmersión por gravedad, BIG). Las plántulas se establecieron en sustratos diferentes (peat moss Premier® o musgo *Sphagnum* chileno) y recibieron diferentes fungicidas (PHC T-22®, Captan Plus® y Ridomil Bravo® 81, y plantas que no recibieron aplicación) en un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial  $2 \times 2 \times 4$ , resultando 16 tratamientos. Durante 28 semanas de aclimatación las plantas estuvieron en charolas de plástico transparente con los sustratos correspondientes, en invernadero con temperatura en el intervalo de 20 a 37 °C, irradiancia de  $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 70 % de humedad relativa. Los resultados mostraron que las plantas tuvieron diferencias significativas en supervivencia y número de brotes debido al sistema de micropropagación en que se obtuvieron, mientras que los sustratos influyeron en la supervivencia y clorofila total en hojas. Las plantas obtenidas en medio semisólido y establecidas en sustrato musgo *Sphagnum* chileno sobrevivieron en proporción del 88 al 100 %. Las plantas obtenidas en el sistema BIG fueron las más altas, con 7.2 cm. Las plantas obtenidas en medio semisólido y establecidas en peat moss Premier® formaron 1.25 brotes. Por otro lado, las plantas obtenidas en medio semisólido, establecidas en peat moss Premier® con aplicación de fungicida Captan Plus® tuvieron más clorofila total ( $0.43 \text{ mg g}^{-1}$  de peso fresco foliar). Los fungicidas no indujeron diferencias en la supervivencia de las plantas.

**Palabras clave:** *Trichoderma harzianum*, aclimatación, biorreactor de inmersión por gravedad, orquídea, *Sphagnum*.

#### SUMMARY

In plant micropropagation, acclimatization is a crucial step to promote morphological and physiological changes in plants for their *ex vitro* adaption. The objective of this study was to evaluate the survival and development of *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. seedlings obtained from two micropropagation systems (semi-solid medium and liquid medium in a gravity immersion bioreactor, BIG). The seedlings were established in different substrates (peat moss Premier® or Chilean *Sphagnum* moss) and received different fungicides (PHC T-22®, Captan Plus® and Ridomil Bravo® 81, and plants that did not receive application), in a completely randomized experimental design with  $2 \times 2 \times 4$  factorial arrangement, resulting in 16

treatments. During 28 weeks of acclimatization, the plants were in transparent plastic trays with the corresponding substrates, in a greenhouse with temperature in the range from 20 to 37 °C, irradiance of  $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 70 % relative humidity. Results showed that plants had significant differences in survival and number of shoots due to the micropropagation system in which they were obtained, while the substrates influenced survival and total chlorophyll in leaves. Plants obtained in semi-solid medium and established in Chilean *Sphagnum* moss substrate survived in proportions from 88 to 100 %. The plants obtained in the BIG system were the tallest with 7.2 cm. The plants obtained in semi-solid medium and established in peat moss Premier® formed 1.25 shoots. On the other hand, the plants obtained in semi-solid medium, established in peat moss Premier® with fungicide Captan Plus® applied, had more total chlorophyll ( $0.43 \text{ mg g}^{-1}$  of fresh leaf weight). Fungicides did not induce differences on plant survival.

**Index words:** *Trichoderma harzianum*, acclimatization, gravity immersion bioreactor, orchid, *Sphagnum*.

#### INTRODUCCIÓN

*Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. es una orquídea epífita litofítica y ocasionalmente es terrestre, se localiza en los bosques de robles de clima templado, selva tropical de alta elevación y bosques de neblina de selva lluviosa de montaña (Hágsater *et al.*, 2005); se distribuye en los estados de Chiapas y Veracruz, México (Fowlie, 1970). Las orquídeas como *L. aromatica* (Graham) Lindl. no tienen hojas durante la temporada seca del año, y en los pseudobulbos se realiza la fotosíntesis de tipo metabolismo ácido de las crasuláceas. Estas orquídeas desarrollan nuevas hojas durante la temporada de lluvias y, en condiciones de alta disponibilidad de agua, realizan un metabolismo fotosintético de tipo  $C_3$  (Hágsater *et al.*, 2005). Debido a la belleza de la flor y a que emite aroma agradable a canela, es muy apreciada en el mercado veracruzano, pero los ejemplares se obtienen por sustracción ilegal de su hábitat silvestre, por lo que sus poblaciones están amenazadas. En estas circunstancias, en un sendero de 4.5 km en Chocamán, Veracruz, en que se reportaban

ejemplares de esta especie, en años recientes no se encontraron individuos (Baltazar *et al.*, 2014); así mismo, *L. aromatica* (Graham) Lindl. no prolifera en ambientes secundarios como las plantaciones de café (Scheffknecht *et al.*, 2010).

Dentro de la propagación *in vitro*, el interés en el uso de biorreactores de inmersión temporal ha aumentado durante la última década (Aragón *et al.*, 2014), ya que su uso garantiza un mejor desarrollo de las plántulas en la aclimatación (Aragón *et al.*, 2014; Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016), en comparación con plantas obtenidas en medio semisólido.

En un protocolo de micropropagación la aclimatación es la etapa final, consiste en la adaptación de las plántulas antes de pasar al invernadero o a un ambiente natural (Rabaiolli *et al.*, 2017). Las plántulas *in vitro* de orquídeas se desarrollan en condiciones controladas de baja intensidad luminosa, de 36 (Mengarda *et al.*, 2017) a 57  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Bello-Bello *et al.*, 2020); alta humedad relativa, de 85 (Dwiyani *et al.*, 2022) a 98 % (Chen, 2004) y bajo intercambio de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ; por ésto, sólo un 70 % de plantas micropropagadas de *Dendrobium chrysanthum* que se establecieron en condiciones de 70-80 % de humedad relativa y sustrato de pedazos de ladrillo, pedazos de carbón y hojarasca en descomposición (1:1:1) sobrevivieron en el periodo de aclimatación (Hajong *et al.*, 2010). Al lograr que las plántulas de orquídeas silvestres se aclimaten exitosamente en invernadero, se recomienda que se establezcan en su hábitat natural para contribuir a la repoblación de individuos.

El sustrato para orquídeas debe proporcionar las condiciones físicas apropiadas, un ejemplo es el sustrato turba-perlita (porosidad total de 93 %, de la cual 20 % es porosidad de aireación y 73 % es porosidad de retención de agua) (Cabrera, 1999), al mismo tiempo que debe garantizar las condiciones químicas y biológicas necesarias para el desarrollo de las plántulas (Macedo *et al.*, 2014). El musgo rubio *Sphagnum* en su hábitat natural conserva la humedad durante largos periodos, a pesar de estar en sitios escarpados, pues en él crecen abundantes orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005). El sustrato de *Sphagnum* es el más utilizado en la aclimatación de plantas producidas *in vitro*, debido a que tiene una retención de agua del 85-90 % y una textura esponjosa que evita daños en el sistema radicular de las plántulas (Macedo *et al.*, 2014). El uso de sustrato de *Sphagnum* en el proceso de aclimatación ha sido reportado en las orquídeas *Dendrobium primulinum* Lindl. (Pant y Thapa, 2012), *Brassavola tuberculata* Hook (Macedo *et al.*, 2014), *Cattleya guttata*, *Zygopetalum mackayi* (Manhães

*et al.*, 2015) y *Cattleya walkeriana* (Galdiano *et al.*, 2017).

En las orquídeas, para prevenir el ataque de hongos como *Rhizoctonia* (Seidel y Venturieri 2011) y *Fusarium*, y así obtener mayor porcentaje de sobrevivencia de plántulas durante la aclimatación, se utilizan fungicidas químicos como Captan 50 Plus® [Captan N-(triclorometiltio) ciclohex-4-en-1,2-dicarboximida] y Ridomil Bravo® 81 {Metalaxil-M: (R)-2-[(2,6-dimetil-fenil)-metoxiacetilamino]-ácido propiónico metil éster} (Srivastava *et al.*, 2018). Venturieri y de Arbierto (2011) reportaron que en plántulas de *Phalaenopsis amabilis* la supervivencia fue favorecida por el fungicida Manzate 800® [Complejo manganeso etileno bis(ditiocarbamato) (polimérico) con sal de zinc]. Srivastava *et al.* (2015) reportaron un 80 % de supervivencia en plántulas de *Aerides ringens* (Lindl.) al usar el fungicida Captan [Captan N-(triclorometiltio) ciclohex-4-en-1,2-dicarboximida] y Singh *et al.* (2021) señalaron un 76 % de supervivencia en plántulas de *Satyrium nepalense* al usar el fungicida Bavistin (Carbendazim).

Los trabajos sobre la aclimatación de *L. aromatica* son escasos, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar, durante la etapa de aclimatación, la supervivencia y desarrollo de las plantas producidas *in vitro* obtenidas de dos diferentes sistemas de propagación (medio de cultivo semisólido y medio de cultivo líquido en biorreactor), y que durante la aclimatación se establecieron en dos sustratos y les fueron aplicados diversos fungicidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y medios de cultivo

Plántulas de *L. aromatica* (Graham) Lindl. de aproximadamente 5-7 cm de longitud, cultivadas *in vitro* desde que las semillas fueron germinadas en medio de cultivo en laboratorio, utilizando medio de cultivo basado en las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 0.5 g  $\text{L}^{-1}$  de ácido nicotínico, 0.04 g  $\text{L}^{-1}$  de tiamina, 0.1 g  $\text{L}^{-1}$  de inositol, 0.002 g  $\text{L}^{-1}$  de glicina y 30 g  $\text{L}^{-1}$  de sucrosa. De este medio de cultivo se prepararon dos variantes: 1) medio de cultivo semisólido, que después de ajustar el pH a 5.7 se agregaron 2.5 g  $\text{L}^{-1}$  de Phytigel™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) y después de disolverlo se distribuyeron 100 mL en cada frasco de 1000 mL y 2) medio de cultivo líquido en biorreactor de inmersión por gravedad (BIG). Las plántulas se cultivaron *in vitro* durante 28 semanas expuestas a iluminación de 56  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad a  $24 \pm 1$  °C.

### Aclimatación de plántulas

Las plántulas se extrajeron de los frascos, se enjuagaron con agua corriente para eliminar el medio de cultivo adherido a las raíces y se establecieron tres de ellas en charola de plástico transparente de 14 × 14 × 9 cm que contenían una capa de 5 cm de espesor de alguno de los dos sustratos: turba (peat moss Premier®) esterilizada en autoclave durante 15 min a 121 °C, o musgo *Sphagnum* chileno. El total de plantas en cada sustrato se separó en cuatro grupos para aplicarles cada 20 días durante los dos primeros meses el fungicida correspondiente: 1) 1 g L<sup>-1</sup> de Captan 50 Plus®, fungicida químico de contacto [Captan N-(triclorometil) ciclohex-4-en-1,2-dicarboximida], 2) 1 g L<sup>-1</sup> de Ridomil Bravo® 81, fungicida químico y sistémico {Metalaxil-M: (R)-2-[(2,6-dimetil-fenil)-metoxiacetilamino]-ácido propiónico metil éster}, 3) 0.0135 g L<sup>-1</sup> de PHC T-22®, fungicida biológico (*Trichoderma harzianum*, cepa T-22 KRL-AG2), 4) testigo, sin aplicación de fungicida (Cuadro 1).

Las plantas en charolas fueron transferidas a un invernadero con fluctuación de temperatura de 20 a 37 °C, con una intensidad luminosa de 85 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 70 % de humedad relativa de las 8:00 a las 18:00 h. Estas variables ambientales se midieron cada 30 min con un registrador de datos (HOBO U12-012, Onset Computer Corporation, Bourne, Massachusetts, EUA). Las charolas se mantuvieron cubiertas por una estructura cerrada de polietileno transparente durante la primera semana para evitar deshidratación de las plantas durante su aclimatación, y después, el riego fue cada tercer día; posteriormente, las plántulas aclimatadas de *L. aromatica* se utilizaron en un programa de reintroducción estableciéndose en árboles de *Inga* sp. (Figura 1) en el bosque mesófilo de Chocamán, Veracruz.

### Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial con tres factores en los tratamientos: sistema de propagación [medio semisólido y medio líquido en biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)], sustratos (peat moss Premier® y musgo *Sphagnum* chileno) y fungicidas [PHC T-22®, Captan Plus® y Ridomil Bravo® 81 y los cuatro testigos sin fungicida, con tres repeticiones (Cuadro 1), resultando un total de 16 tratamientos.

### Variables evaluadas

A las 28 semanas después del trasplante y en la estación de invierno se evaluaron: porcentaje de supervivencia, altura de planta (cm), número de hojas y número de brotes. Para extraer y cuantificar las clorofilas totales presentes en

las hojas se procedió según Harborne (1998) y se realizó a la sexta semana; utilizando una balanza granataria (ADAM Core® CQT 202, Oxford, Mississippi, EUA) se pesaron 0.25 g de hojas y éstas se picaron finamente utilizando un bisturí; posteriormente, ese material se colocó en tubos de ensayo de vidrio cubiertos con papel aluminio y se añadieron 2.5 mL de acetona 80 % (Fermont®, México), los tubos se almacenaron en oscuridad a 4 °C durante 24 h; después, la muestra se molió totalmente en un mortero, se filtró en papel filtro en un embudo y se aforó a 6.25 mL con acetona 80 %; de esta solución, se tomó una muestra de 2 mL que se colocó en una celda de plástico para leer su absorbancia a 645 y 663 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) utilizando acetona 80 % como blanco. Con los datos de absorbancia se obtuvieron las cantidades de clorofilas totales (mg g<sup>-1</sup> peso fresco, PF) de tres repeticiones por tratamiento con la fórmula:

$$\text{Clorofila total} = \{[8.20 (A_{663}) - 20.2 (A_{645})] \times V\} / (1000 \times P)$$

Donde A663 es la absorbancia en la longitud de onda de 663 nm, A645 es la absorbancia en la longitud de onda de 645 nm, V es el volumen aforado (mL) y P es el peso de la muestra (g).

### Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). En el caso del porcentaje de sobrevivencia, previo al análisis estadístico se realizó transformación de los datos con la función arcoseno para normalizar su distribución y estabilizar las varianzas. Los análisis se realizaron con el programa SAS versión 9.3 (SAS Institute, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los sistemas de cultivo *in vitro* (SCv) tuvieron efectos significativos ( $P = 0.0364$ ) en el porcentaje de sobrevivencia de plantas y en el número de brotes ( $P = 0.0401$ ). Los sustratos (Sust) tuvieron efectos significativos en el porcentaje de sobrevivencia ( $P = 0.0010$ ) y clorofilas totales en hojas ( $P = 0.0097$ ). Los fungicidas (Fung) aplicados tuvieron efectos significativos en altura de planta ( $P = 0.0404$ ) y en clorofilas totales en hojas ( $P = 0.0001$ ). Las interacciones SC × Sust y SC × Fung tuvieron efectos significativos ( $P = 0.0001$ ) en clorofilas totales en hojas. La interacción SC × Sust × Fung tuvo efectos significativos ( $P = 0.0005$ ) en clorofilas totales en hojas (Cuadro 1).

Los efectos factoriales en la supervivencia de la planta fueron estadísticamente significativos en el sistema de cultivo *in vitro* ( $P = 0.0364$ ), donde el mejor sistema fue el

Cuadro 1. Efecto del sistema de cultivo *in vitro* en que se obtuvieron las plántulas, el sustrato en que se establecieron y fungicida que se les aplicó en la aclimatación de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. a las 28 semanas.

| SCv               | Sust | Fung | Supervivencia (%)      | Altura (cm)   | Número de hojas | Número de brotes | Cltot (mg g <sup>-1</sup> peso fresco) |
|-------------------|------|------|------------------------|---------------|-----------------|------------------|--|
| MSS               | Pm   | NA   | 66.7 ± 15.2 abc        | 5.1 ± 0.9 abc | 1.0 ± 0.4 a     | 1.2 ± 0.4 a      | 0.2 ± 0.0 cdefg                        |
|                   | Pm   | PHC  | 77.8 ± 15.2 ab         | 3.6 ± 0.8 c   | 1.4 ± 0.3 a     | 1.0 ± 0.4 a      | 0.1 ± 0.0 efg                          |
|                   | Pm   | CP   | 100.0 ± 15.2 a         | 5.3 ± 0.8 abc | 0.9 ± 0.4 a     | 0.6 ± 0.4 a      | 0.4 ± 0.0 a                            |
|                   | Pm   | RB   | 88.9 ± 15.2 a          | 5.4 ± 0.8 abc | 1.3 ± 0.3 a     | 0.9 ± 0.4 a      | 0.1 ± 0.0 efg                          |
|                   | Ms   | NA   | 100.0 ± 15.2 a         | 5.6 ± 0.8 abc | 0.9 ± 0.4 a     | 0.9 ± 0.4 a      | 0.1 ± 0.0 defg                         |
|                   | Ms   | PHC  | 100.0 ± 15.2 a         | 4.5 ± 0.8 bc  | 0.9 ± 0.4 a     | 1.0 ± 0.4 a      | 0.1 ± 0.0 fg                           |
|                   | Ms   | CP   | 88.9 ± 15.2 a          | 7.0 ± 0.8 a   | 1.0 ± 0.4 a     | 1.0 ± 0.4 a      | 0.3 ± 0.0 abcd                         |
|                   | Ms   | RB   | 100.0 ± 15.2 a         | 5.6 ± 0.8 abc | 0.7 ± 0.4 a     | 1.1 ± 0.3 a      | 0.2 ± 0.0 bcdefg                       |
| BIG               | Pm   | NA   | 31.5 ± 15.2 c          | 6.1 ± 0.9 ab  | 1.1 ± 0.4 a     | 0.6 ± 0.5 a      | 0.2 ± 0.0 defg                         |
|                   | Pm   | PHC  | 66.7 ± 18.6 abc        | 5.1 ± 0.9 abc | 1.2 ± 0.4 a     | 1.1 ± 0.4 a      | 0.2 ± 0.0 cdefg                        |
|                   | Pm   | CP   | 44.4 ± 15.2 bc         | 7.2 ± 0.9 a   | 1.1 ± 0.4 a     | 0.7 ± 0.5 a      | 0.1 ± 0.0 g                            |
|                   | Pm   | RB   | 66.7 ± 15.2 abc        | 5.9 ± 0.8 ab  | 1.2 ± 0.3 a     | 0.5 ± 0.4 a      | 0.2 ± 0.0 bcdef                        |
|                   | Ms   | NA   | 100.0 ± 15.2 a         | 6.6 ± 0.8 ab  | 0.7 ± 0.4 a     | 0.3 ± 0.5 a      | 0.2 ± 0.0 bcdefg                       |
|                   | Ms   | PHC  | 77.8 ± 15.2 ab         | 5.9 ± 0.8 ab  | 0.6 ± 0.4 a     | 0.3 ± 0.5 a      | 0.3 ± 0.0 bcde                         |
|                   | Ms   | CP   | 100.0 ± 15.2 a         | 6.4 ± 0.8 ab  | 0.4 ± 0.5 a     | 0.2 ± 0.5 a      | 0.3 ± 0.0 abc                          |
|                   | Ms   | RB   | 100.0 ± 15.2 a         | 5.3 ± 0.8 abc | 0.8 ± 0.4 a     | 0.4 ± 0.5 a      | 0.3 ± 0.0 ab                           |
| FV                |      |      | ANOVA (significancias) |               |                 |                  |  |
| SCv               |      |      | 0.0364                 | 0.0597        | 0.4792          | <b>0.0401</b>    | 0.1135                                 |
| Sust              |      |      | 0.0010                 | 0.3534        | 0.0513          | 0.4106           | 0.0097                                 |
| Fung              |      |      | 0.6112                 | <b>0.0404</b> | 0.9194          | 0.9249           | <b>0.0001</b>                          |
| SCv × Sust        |      |      | 0.0772                 | 0.2794        | 0.5558          | 0.2584           | <b>0.0001</b>                          |
| SCv × Fung        |      |      | 0.9651                 | 0.6591        | 0.9476          | 0.9145           | <b>0.0001</b>                          |
| Sust × Fung       |      |      | 0.3991                 | 0.7806        | 0.9281          | 0.8671           | 0.5566                                 |
| SCv × Sust × Fung |      |      | 0.3814                 | 0.7033        | 0.7391          | 0.8465           | <b>0.0005</b>                          |

FV: fuentes de variación, SCv: sistema de cultivo *in vitro*, MSS: medio semisólido, BIG: bioreactor de inmersión por gravedad, Sust: sustrato, Fung: fungicida, Cltot: clorofilas totales. Medias ± error estándar. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05). Las significancias en negrita indican diferencias significativas. Pm: peat-moss Premier®, Ms: musgo *Sphagnum* chileno, NA: no aplicación, PHC: PHC T-22®, CP: Captan Plus®, RB: Ridomil Bravo® 81, Clorofila total a las seis semanas.

medio semisólido (Figura 2A); en el sustrato, en plantas provenientes de ambos sistemas el musgo *Sphagnum* chileno mostró los valores mayores (Figura 2C). Estas diferencias posiblemente se debieron a que el sustrato de peat moss Premier® se observaba con mayor humedad, lo que provocó la muerte de las raíces y de la planta. Por otra parte, las plantas en los tratamientos con el sustrato de musgo *Sphagnum* chileno presentaron un mayor porcentaje de supervivencia, porque el sustrato tiene 95-98 % de porosidad total, del cual 85-90 % es capacidad de retención de agua, mientras que el peat moss Premier® tiene un 63 % de porosidad (Macedo *et al.*, 2014).

La totalidad de las plántulas obtenidas en ambos sistemas de cultivo *in vitro* y establecidas en el sustrato musgo *Sphagnum* chileno sobrevivió, lo que coincide con los experimentos en plántulas de *Bletia purpurea* (Dutra *et al.*, 2008) y *Phalaenopsis amabilis* (Venturieri y de Arbieta, 2011) en el sustrato de *Sphagnum*; sin embargo, 67.7 % de plántulas de *Brassavola tuberculata* Hook sobrevivieron cuando se establecieron en sustrato *Sphagnum* (Macedo *et al.*, 2014). Plantas de *L. aromatica* que se establecieron en el sustrato formado por la mezcla de corteza de pino, carbón de roble y piedra pómez (3:1:1) tuvieron supervivencia de 90 % transcurridas 12 semanas



(Mata-Rosas *et al.*, 2010), el cual es similar a los valores altos de supervivencia observados en este estudio, aunque la composición del sustrato fue diferente. Por otro lado, las plántulas obtenidas de BIG establecidas en sustrato peat moss Premier® sin fungicida tuvieron 31 % de supervivencia (Figura 2B), pero Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016) reportaron 80 % en *Vanilla planifolia* propagada en BIG y aclimatada en peat moss Premier®-Agrolita® (1:1). Mathur *et al.* (2008) registraron un 95 % de establecimiento con *Trichoderma harzianum* y *Piriformospora indica*, mientras que con *Azospirillum* sp. (CIM-azo) el establecimiento fue del 85 %, indicaron

que una alta tasa de mortalidad durante la transferencia a condiciones *ex vitro* se debe a la disfunción estomática, sistemas de raíz débiles y un desarrollo deficiente de la cutícula.

Las plantas obtenidas del sistema de medio semisólido y establecidas en sustrato peat moss Premier® con aplicación de Captan Plus® sobrevivieron al 100 %; sin embargo, Srivastava *et al.* (2015) no observaron diferencias significativas en los fungicidas con respecto al testigo, aunque las plantas sin aplicación de fungicidas en el sustrato peat moss Premier® sobrevivieron en menor



Figura 1. Plántulas aclimatadas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. establecidas en campo en árboles de *Inga* sp. Barra = 1 cm.

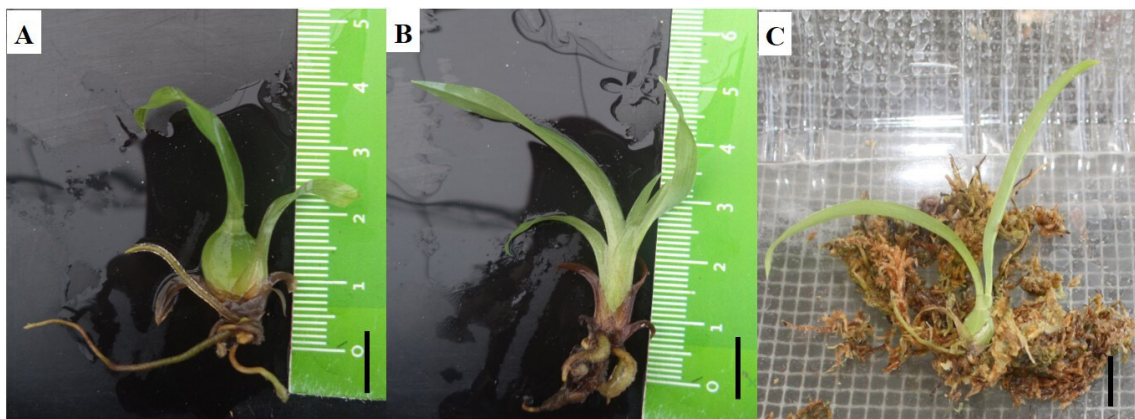


Figura 2. Plántulas de *Lycaste aromatica* (Graham) Lindl. A) obtenidas en medio semisólido, B) obtenidas en medio líquido en biorreactor de inmersión por gravedad, C) aclimatada en musgo *Sphagnum* chileno a las 28 semanas. Barra = 1 cm.

proporción (31 %), sobre todo las plántulas que provenían de BIG; por otro lado, el fungicida biológico PHC T-22® tuvo la misma efectividad que los fungicidas químicos Captan Plus® o Ridomil Bravo® 81 en cuanto a supervivencia durante la aclimatación, lo cual es muy importante porque en futuros estudios se podría usar el control biológico y así evitar el uso de agroquímicos. Venturieri y de Arbierto (2011) reportaron que el 100 % de plántulas de *Phalaenopsis amabilis* establecidas en musgo *Sphagnum* sobrevivió con y sin el uso de Manzate 800®. Las plantas que se establecieron en sustrato peat moss Premier® con aplicación de fungicida PHC T-22® tuvo supervivencia de 77 %, resultados que son consistentes con los reportados por Gutierrez-Miceli *et al.* (2008), ya que en la aclimatación de *Guarianthe skinnerii* el 79 % de plantas sobrevivió cuando se establecieron en mezcla de suelo y agrolita (3:1) inoculada con *T. harzianum*; sin embargo, Srivastava *et al.* (2015) reportaron que 80 % de plantas de *Aerides ringens* (Lindl.) sobrevivió al desinfectar las plántulas con Captan. El uso de fungicidas favorece la supervivencia porque previene el ataque de hongos como *Rhizoctonia*, que causa marchitamiento (Seidel y Venturieri 2011) y *Fusarium* (Srivastava *et al.*, 2018).

Se observaron diferencias significativas entre los fungicidas para las variables altura de planta ( $P = 0.0404$ ) y clorofilas totales en hojas ( $P = 0.0001$ ). Las plantas más altas fueron las que recibieron Captan Plus®. En el número de hojas no se detectaron diferencias significativas debido a los factores evaluados ni en sus interacciones ( $P \geq 0.0512$ ). Los resultados de este experimento confirman los obtenidos por Gutierrez-Miceli *et al.* (2008), que estudiaron *G. skinnerii* sin mostrar diferencias significativas en el número de hojas con o sin la aplicación de *T. harzianum*. Hwang y Jeong (2007) reportaron que plantas de dos variedades de *Phalaenopsis* desarrollaron tres hojas cuando se establecieron en musgo *Sphagnum*; sin embargo, en este estudio las plantas obtenidas en medio semisólido y establecidas en sustrato musgo *Sphagnum* chileno tuvieron una hoja cuando habían transcurrido 28 semanas. El bajo número de hojas se debe a que *L. aromatica* (Graham) Lindl. es caducifolia en invierno (Scheffknecht *et al.*, 2010).

En la variable número de brotes se observaron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo *in vitro*, ya que las plantas obtenidas en el sistema de cultivo medio semisólido tuvieron mayor número de brotes pequeños y vigorosos al inicio de la aclimatación en comparación con las plantas obtenidas en el sistema BIG. Bello-Bello *et al.* (2020) reportaron que, en plántulas de *Myrmecophila grandiflora* Lindl. bajo aclimatación, obtenidas en dos sistemas de cultivo *in vitro*, medio de cultivo semi sólido y medio líquido en biorreactor de flujo y reflujo no

presentaron diferencias significativas en número de brotes.

En la concentración de clorofila en las hojas se detectó efecto diferente significativo ( $P = 0.0097$ ) de los sustratos. Las plantas establecidas en *Sphagnum* chileno tuvieron hojas con la mayor cantidad de clorofila total ( $0.22 \text{ mg g}^{-1}$  peso fresco), ésto puede ser atribuido a un mejor desarrollo de las plántulas en este sustrato, por su excelente amortiguación de la humedad (Macedo *et al.*, 2014); en fungicidas ( $P = 0.0001$ ), Captan Plus® produjo los mejores resultados, lo que se puede atribuir a que éste es de contacto; es decir, no ingresa al sistema de la planta, por lo que no modifica su metabolismo; por otro lado, Wigand y Stevenson (1994) reportaron altos contenidos de clorofila *a* en plantas de *Vallisneria americana*, a las que se aplicó Captan y fósforo, y lo atribuyeron a que la asociación con micorrizas presentes contribuye a una mayor disponibilidad de nutrimentos para las plantas terrestres, las que aumentan la producción de clorofila. También hubo efecto significativo en las interacciones SCv × Sust ( $P = 0.0001$ ) en la cantidad de clorofilas totales en hojas ( $P = 0.0001$ ), mostrando que las plantas obtenidas del sistema BIG establecidas en sustrato musgo *Sphagnum* chileno representan el mejor tratamiento para la supervivencia de plantas. La interacción SC × Fung fue significativa ( $P = 0.0001$ ) para el contenido de clorofilas totales en hojas, donde el mejor tratamiento fue el medio semisólido con la aplicación de Captan Plus®. La interacción SC × Sust × Fung tuvo efecto altamente significativo ( $P = 0.0005$ ) en la clorofila total en hojas, por lo que las plantas obtenidas en sistema de medio semisólido, establecidas en sustrato peat moss Premier® y que recibió el fungicida Captan Plus® sobrevivieron en su totalidad y tuvieron mayor contenido de clorofila total,  $0.4 \text{ mg g}^{-1}$  de peso fresco de hoja (Cuadro 1). Los resultados son consistentes con los reportados por Lando *et al.* (2016), donde las plántulas de *Cattleya xanthina* tuvieron  $0.5 \text{ mg}$  de clorofila total  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco foliar a los 90 días, datos más altos que en *L. aromatica* (Graham) Lindl. debido a que el incremento en la concentración de clorofila está en función del tiempo. Jeon *et al.* (2005) mencionaron que en los diversos grupos de plantas de *Doritaenopsis* el aumento de la concentración de clorofila ocurrió al aplicar  $150\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones fotosintéticos por inducir las enzimas necesarias para la biosíntesis de la clorofila.

## CONCLUSIONES

Los diferentes sistemas de micropropagación, los sustratos en que se establecieron las plantas y los fungicidas que se aplicaron durante la aclimatación de las plantas de *L. aromatica* (Graham) Lindl. tuvieron efecto sobre la mayoría de variables evaluadas en plántulas, con excepción del número de hojas. Las plantas obtenidas en

el medio de cultivo semisólido tuvieron mayor cantidad de sobrevivencia y desarrollaron más brotes durante la aclimatación. Las plantas establecidas en el musgo *Sphagnum* chileno mostraron la mayor supervivencia y tuvieron más clorofilas totales en hojas. Los diversos fungicidas utilizados tuvieron la misma efectividad en la supervivencia de las plántulas micropropagadas; por lo tanto, se puede utilizar el fungicida biológico PHC T-22® en el protocolo de establecimiento de la orquídea *L. aromatica* (Graham) Lindl., aunque las plantas a las que se aplicó Captan Plus® mostraron la mayor altura y concentración de clorofila en sus hojas.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada a la primera autora, y al Colegio de Postgraduados por financiar esta investigación a través de la Línea de Investigación Eficiencia y Sustentabilidad en la Producción Primaria en Sistemas Agroalimentarios de la Maestría en Innovación Agroalimentaria Sustentable.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aragón C. E., C. Sánchez, J. Gonzalez-Olmedo, M. Escalona, L. Carvalho and S. Amâncio (2014) Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum* 58:29-38, <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0381-6>
- Baltazar B. O., J. Zavala R., F. Y. Solís Z., J. A. Pérez S. y O. Sánchez E. (2014) Sendero interpretativo de orquídeas y bromelias en Tepexilotla, Chocamán, Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9:1687-1699, <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i9.1057>
- Bello-Bello J. J., J. Zavala-Ruiz, N. Cruz-Huerta and O. Baltazar-Bernal (2020) *In vitro* germination and development of the trumpet orchid (*Myrmecophila grandiflora* Lindl.) using ebb-and-flow bioreactor. *Propagation of Ornamental Plants* 20:88-95.
- Cabrera R. I. (1999) Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en maceta. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:5-11, <https://doi.org/10.5154/rchsh.1998.03.025>
- Chen C. (2004) Humidity in plant tissue culture vessels. *Biosystems Engineering* 88:231-241, <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2004.02.007>
- Dutra D., T. R. Johnson, P. J. Kauth, S. L. Stewart, M. E. Kane and L. Richardson (2008) Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94:11-21, <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9382-0>
- Dwiyaní R., Y. Fitriani and I. S. Mercuriani (2022) The alternative media supporting the protocorm and plantlet growth of the Indonesian black orchid (*Coelogyne pandurata* Lindl.) grown *in vitro*. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture* 37:152-160, <https://doi.org/10.20961/carakatani.v37i1.55956>
- Fowlie J. A. (1970) The Genus *Lycaste*. Day Printing Corporation. Pomona, California, USA. 90 p.
- Galdiano R. F., W. A. Vendrame, C. Moretto, R. T. de Faria and E. G. M. Lemos (2017) Seed cryopreservation, *in vitro* propagation and *ex vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner, a vulnerable ornamental orchid. *Australian Journal of Crop Science* 11:485-490, <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.04.384>
- Gutiérrez-Miceli F. A., T. Ayora-Talavera, M. Abud-Archila, M. Salvador-Figueroa, L. Adriano-Anaya, M. L. Arias H. and L. Dendooven (2008) Acclimatization of micropropagated orchid *Guarianthe skinnerii* inoculated with *Trichoderma harzianum*. *Asian Journal of Plant Sciences* 7:327-330, <https://doi.org/10.3923/ajps.2008.327.330>
- Hágsater E., M. A. Soto A., G. A. Salazar C., R. Jiménez M., M. A. López R. y R. L. Dressler (2005) Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín. México, D. F. 304 p.
- Hajong S., S. Kumaria and P. Tandon (2010) *In vitro* propagation of the medicinal orchid *Dendrobium chrysanthum*. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 76:1-6.
- Harborne J. B. (1998) *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Third edition. Chapman & Hall. London, UK. 302 p.
- Hwang S. J. and B. R. Jeong (2007) Growth of *Phalaenopsis* plants in five different potting media. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 76:319-326, <https://doi.org/10.2503/jjshs.76.319>
- Jeon M. W., M. B. Ali, E. J. Hahn and K. Y. Paek (2005) Effects of photon flux density on the morphology, photosynthesis and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. *Plant Growth Regulation* 45:139-147, <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0337-8>
- Lando A. P., M. R. Wolfart, P. C. P. Fermino and M. Santos (2016) Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. *Biologia Plantarum* 60:219-225, <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0589-3>
- Macedo M. C., D. B. C. J. Rosa, J. S. Soares, M. B. Tatará, N. T. K. Hoffmann and Y. B. C. J. Rosa (2014) Seed storage and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. *Semina: Ciências Agrárias* 35:2883-2894, <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p2883>
- Manhães N. E., J. M. Jasmim, L. A. A. Silva, B. B. Castro, N. L. Motta, V. R. Pereira and A. P. R. C. Erthal (2015) Loofah fiber and *Sphagnum* moss in the acclimatization of *Cattleya guttata* and *Zygopetalum mackayi* inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Acta Horticulturae* 1076:113-118, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1076.12>
- Mata-Rosas M., R. J. Baltazar-García, P. Moon, P. Hietz and V. E. Luna-Montero (2010) *In vitro* regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. *Plant Biotechnology Reports* 4:157-163, <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0132-5>
- Mathur A., A. K. Mathur, P. Verma, S. Yadav, M. L. Gupta and M. P. Darokar (2008) Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum* Sant. et Fernand. *African Journal of Biotechnology* 7:1046-1053.
- Mengarda L. H. G., G. P. A. Cola, S. C. de Oliveira and A. R. de Freitas (2017) Multiplication, rooting *in vitro*, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae), an orchid endemic to the Brazilian atlantic rainforest. *Bioscience Journal* 33:730-738, <https://doi.org/10.14393/BJ-v33n3-32987>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pant B. and D. Thapa (2012) *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology* 11:9970-9974, <https://doi.org/10.5897/AJB11.3106>
- Rabaioli S. M. S., L. R. S. Reiniger, C. M. Stefanel, K. B. da Silva, A. F. Paim and A. C. F. Ziegler (2017) Agar does not affect *in vitro* rhizogenesis and *ex vitro* acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. *CERNE* 23:185-192, <https://doi.org/10.1590/01047760201723022289>
- Ramírez-Mosqueda M. A. and L. G. Iglesias-Andreu (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 52:154-160, <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- SAS Institute (2011) SAS/STAT® 9.3 User's Guide. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, USA. 8621 p.
- Scheffknecht S., M. Winkler, K. Hülber, M. Mata R. and P. Hietz (2010) Seedling establishment of epiphytic orchids in forests and coffee plantations in Central Veracruz, Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 26:93-102, <https://doi.org/10.1017/>

- S0266467409990332
- Seidel J. D. and G. A. Venturieri (2011) *Ex vitro* acclimatization of *Cattleya forbesii* and *Laelia purpurata* seedlings in a selection of substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy* 33:97-103, <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i1.3939>
- Singh D. K., B. A. Mir, S. Babbar and S. B. Babbar (2021) Cost-effective *in vitro* multiplication and phenolic profile of an important medicinal orchid, *Satyrium nepalense* D. Don. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 11:162-182, <https://doi.org/10.1080/22311866.2021.1911681>
- Srivastava D., M. C. Gayatri and S. K. Sarangi (2015) *In vitro* seed germination and plant regeneration of an epiphytic orchid *Aerides ringens* (Lindl.) Fischer. *Indian Journal of Biotechnology* 14:574-580.
- Srivastava S., C. Kadooka and J. Y. Uchida (2018) *Fusarium* species as pathogen on orchids. *Microbiological Research* 207:188-195, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.002>
- Venturieri G. A. and E. A. M. de Arbiato (2011) *Ex-vitro* establishment of *Phalaenopsis amabilis* seedlings in different substrates. *Acta Scientiarum. Agronomy* 33:495-501, <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.3950>
- Wigand C. and J. C. Stevenson (1994) The presence and possible ecological significance of mycorrhizae of the submersed macrophyte, *Vallisneria americana*. *Estuaries* 17:206-215, <https://doi.org/10.2307/1352570>