

## EFECTO DEL AMBIENTE DE DESARROLLO SOBRE LA ANATOMÍA FOLIAR DE *CATTLEYA JENMANII* ROLFE Y *C. LUEDDEMANNIANA* RCHB.F. (ORCHIDACEAE)

Effect of the development environment on the leaf anatomy of *Cattleya jenmanii* Rolfe and *C. lueddemanniana* Rchb.f. (Orchidaceae)

Jhonathan TORRES A. y María E. SANABRIA CH.

Postgrado de Agronomía. Decanato de Agronomía,  
Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

Apto. 400. Barquisimeto, Venezuela.  
jhonathantorres@ucla.edu.ve

### RESUMEN

Las orquídeas *Cattleya jenmanii* y *C. lueddemanniana* son especies ornamentales, endémicas de Venezuela. Su propagación comercial se logra por cultivo *in vitro* y durante la aclimatación suelen producirse pérdidas que implican costos adicionales. Es necesario comprender el efecto de tales actividades sobre la estructura anatómica de las vitroplantas para diseñar prácticas de manejo en vivero. El propósito del presente trabajo fue describir y comparar la anatomía de la lámina foliar de las dos especies de orquídeas mencionadas, provenientes de orquideario y en dos momentos diferentes de la propagación *in vitro* (multiplicación y aclimatación). Para ello se comparó la anatomía foliar de plantas cultivadas en orquideario y multiplicación *in vitro*, usando microscopía óptica. Los cultivos fueron realizados en medio Murashige-Skoog (1962). Las vitroplantas enraizadas fueron aclimatadas en un propagador de neblina durante una semana, en cámara húmeda por cuatro semanas y en orquideario durante tres semanas. Las muestras se procesaron mediante procedimientos de microtecnia clásica. El ambiente donde se desarrolló el proceso de multiplicación *in vitro* indujo la reducción del espesor de la lámina, de la epidermis y la cutícula; disminuyó la complejidad del mesofilo, con ausencia de hipodermis, nódulos de fibras, haces vasculares de segundo orden e idioblastos, mientras que en las hojas provenientes de vitroplantas recién aclimatadas hubo una tendencia a la adquisición de una organización similar a la de las cultivadas en orquideario, pero con características de hojas desarrolladas *in vitro*, lo que sugiere que la adaptación a las condiciones *ex vitro* no se completó durante las ocho semanas de aclimatación.

**Palabras clave:** Aclimatación, anatomía, *Cattleya*, orquídeas, propagación *in vitro*

### ABSTRACT

The orchids *Cattleya jenmanii* and *C. lueddemanniana* are important ornamental species, endemics of Venezuela. The commercial production is achieved by *in vitro* culture. During the acclimatization, there take place plant losses that imply additional costs. For the appropriate design of practices of culture in greenhouses, it is important to understand the effect of the acclimatization in the anatomy of *in vitro* plants. The intention of the present work was to describe and to compare the leaf anatomy of the two named species of orchids, grown in the orchidarium house and in two different moments of *in vitro* propagation (multiplication and acclimatization). Plants were cultured in the Murashige-Skoog medium

(1962). The rooted vitroplants were acclimatized in a mist propagator during a week, humid chamber for four weeks and orchidarium for three weeks. The samples were processed by means of classical microtechnique procedures. The *in vitro* environment induced the thickness reduction of the leaf blade, epiderm and cuticle; mesophyll complexity reduction, hypoderm, fiber nodules, vascular bundles and idioblast absence. In the acclimatization stage, there was a trend to the acquisition of an similar structural organization to orchids house stage, but with characteristics of *in vitro* leaves. This suggests that the adjustment to the *ex vitro* conditions was not completed during eight weeks of acclimatization.

**Key words:** Acclimatization, anatomy, *Cattleya*, *in vitro* propagation, orchids

## INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* de plantas ha experimentado un considerable incremento del número de materiales en que es aplicable y del conocimiento de los factores que determinan su éxito. Entre ellos destacan los relacionados con el ambiente de cultivo (Piqueras & Debergh 1999). En términos generales, a esta disciplina se le puede considerar una herramienta exitosa, pero en casos particulares presenta inconvenientes. Ciertas especies no se adaptan bien a la propagación *in vitro*. Otras logran superar exitosamente todas las fases, pero presentan dificultades en el momento de la aclimatación, hasta el punto de restringir la aplicabilidad de la micropropagación (Pospisilova *et al.* 1998). Algunos autores han atribuido esta situación a las condiciones particularmente benignas del interior de los recipientes de cultivo, que no existen en los ambientes de crecimiento natural, y que suprimen estímulos externos indispensables para el desarrollo normal. Esto causa la aparición de múltiples defectos y anomalías anatómicas y fisiológicas que afectan los mecanismos de regulación hídrica y de fotosíntesis, que en definitiva dificultan la adaptación al ambiente *ex vitro* (Masooma *et al.* 1998; Zobayed *et al.* 1999; Majada *et al.* 2000; Seon *et al.* 2000). La alta humedad relativa en el interior de los recipientes de cultivo *in vitro* promueve el crecimiento, pero también induce alteraciones en la estructura de las hojas (Apóstolo *et al.* 2005).

Las diferencias anatómicas entre individuos de una especie o entre especies de un mismo género son dependientes en gran medida del genotipo. Sin embargo, las condiciones ambientales tienen una fuerte influencia en la estructura de brotes y hojas, particularmente en las plantas sujetas a la propagación *in vitro*. Seon *et al.* (2000) señalan que las condiciones típicas de micropropagación causan alteraciones en el desarrollo normal de los estomas y reducen la capacidad de adaptación de las hojas a cambios ambientales.

Durante la aclimatación suelen producirse pérdidas debidas a fallas en la adaptación al ambiente *ex vitro* (Masooma *et al.* 1998; Zobayed *et al.* 1999; Majada *et al.* 2000; Seon *et al.* 2000). Para superar tal condición se generan costos adicionales y mayor complejidad de las labores de cultivo. Esto justifica la necesidad de estudiar el efecto del ambiente en las plantas cultivadas *in vitro* y del proceso de aclimatación sobre la estructura anatómica de las hojas de vitroplantas de

orquídeas, con la finalidad de diseñar prácticas efectivas de manejo temprano en vivero. Estudios con una orientación similar han sido llevados a cabo en diversos cultivos, como por ejemplo en *Rubus idaeus* L. (Donnelly *et al.* 1985), vid (Dami & Hughes 1995), tabaco (Pospisilova *et al.* 1998), papa (Zobayed *et al.* 1999), clavel (Majada *et al.* 2000, 2002), *Dendrobium* Sw. (Anita *et al.* 2000), alcachofa (Apóstolo *et al.* 2005) y *Cattleya jenmanii* (Torres *et al.* 2006).

El propósito del presente trabajo fue describir y comparar la anatomía de la lámina foliar de las orquídeas *Cattleya jenmanii* y *C. lueddemanniana*, provenientes de orquideario y en dos momentos diferentes de la propagación *in vitro* (multiplicación y aclimatización), por medio de microscopía óptica, dado que las vitroplantas de dichas especies presentan dificultades de adaptación al ambiente *ex vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Cultivo en orquideario de *Cattleya jenmanii* y *C. lueddemanniana***

Se cultivaron 12 plantas adultas de cada especie en el umbráculo del Posgrado de Horticultura de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), en Tarabana 10°05' N, 69°16' O y 510 m snm, estado Lara, Venezuela, bajo una irradiancia máxima de 180  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , temperatura promedio de 30°C y humedad relativa promedio de 71%. Se tomaron muestras de las 12 plantas de cada especie.

### **Micropropagación y aclimatización de *Cattleya jenmanii* y *C. lueddemanniana***

En la etapa de micropropagación se trabajó con 24 individuos de cada especie, provenientes de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la UCLA. Se cultivaron en el medio de Murashige-Skoog (1962), modificado para el cultivo de *Cattleya* Lindl. por Torres & Mogollón (1997), con 2 mg/l de Bencil Adenina (BA). La irradiación en el cuarto de crecimiento fue de 37,84  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , el fotoperíodo de 16 h y la temperatura de 25±2°C. Se usaron recipientes de cristal con tapa translúcida precintada con film plástico para el empaqueo. Al final del período de propagación *in vitro* se realizó un muestreo y el resto de las vitroplantas cultivadas se transfirieron a la fase de aclimatización. Durante esta última fase de cultivo, las vitroplantas enraizadas fueron tratadas con una solución de 3 g/l de Ridomil y plantadas en maceteros de 8 cm de diámetro con un sustrato compuesto por fibra de helecho arborescente. Posteriormente fueron colocadas en propagador de neblina, con una frecuencia de aspersión de 5 min cada 24 h, durante una semana. Luego fueron transferidas a una cámara húmeda con una irradiancia de 40-60  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , durante 4 semanas y al umbráculo durante 3 semanas, al cabo de las cuales se realizó la toma de muestras a 24 vitroplantas por especie.

### **Estudios de microscopía óptica**

Para los estudios se emplearon 48 muestras, que representaban 12 hojas para las plantas adultas en umbráculo y 24 para las plantas *in vitro* y en aclimatización.

Las mismas consistieron en secciones extraídas del tercio medio de hojas adultas del simpodio más reciente. Éstas fueron posteriormente subdivididas y fijadas en FAA (Roth 1964). Se realizaron secciones transversales de forma manual y con micrótopo de acuerdo a los métodos de microtecnia clásica descritos por Sass (1958) y Roth (1964). El montaje de los cortes se hizo con Permount.

Las observaciones se realizaron en el Laboratorio de Microscopía del Instituto de Biología Molecular y Celular de las Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, España. Se utilizó un microscopio óptico Nikon Eclipse E600. Las variables: grosor de epidermis adaxial y abaxial, grosor de la cutícula adaxial y abaxial, grosor de la lámina foliar, grosor de mesofilo, área de haces vasculares, área de xilema y área de floema, se midieron en fotomicrografías tomadas con una cámara digital Color View 12 de la casa Soft Imaging System y el procesamiento de imágenes con el programa analySIS 3.1. Se tomaron datos de 2 a 5 campos de cada muestra en cada ambiente. Los datos fueron analizados mediante el programa Statgrafics Plus 5.1. Para ello se realizaron transformaciones de datos, análisis de varianza y pruebas de medias de Duncan, para aquellos datos que se ajustaban a la distribución normal (área promedio de haces vasculares, xilema y floema en secciones transversales de hojas de *Cattleya jenmanii*). Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para analizar los datos que no se ajustaban a dicha distribución (resto de las variables estudiadas), de acuerdo a lo señalado por Corder & Foreman (2009).

## RESULTADOS

### *Cattleya jenmanii* Rolfe

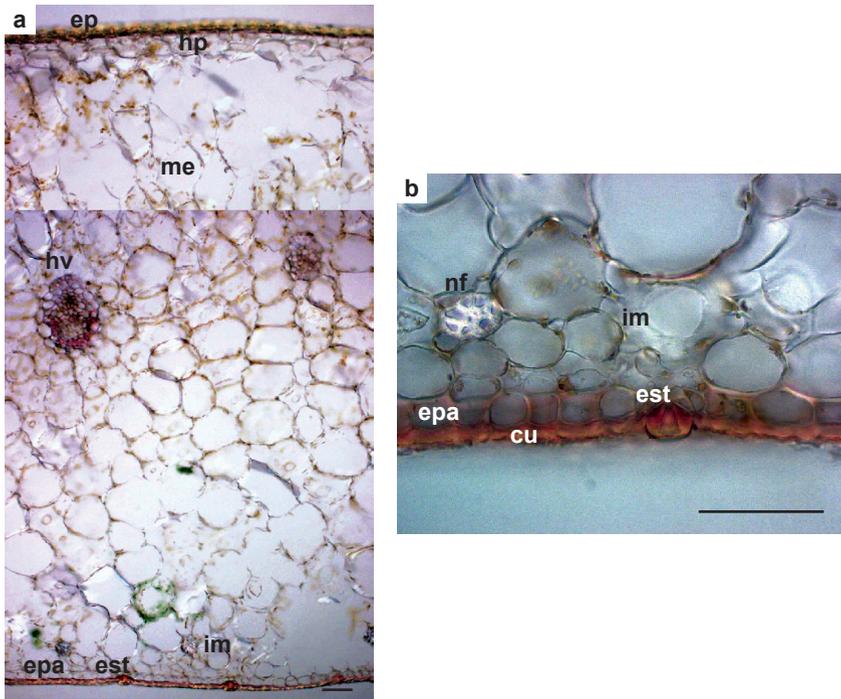
Caracteres anatómicos de la hoja desarrollada en orquideario (Tabla 1, Fig. 1)

Lámina foliar glabra e hipoestomática. Tamaño de las células epidérmicas similar en ambas superficies (Fig. 1a). Cutícula engrosada con abundantes depósitos de ceras, más delgada en la epidermis abaxial que en la adaxial, la primera con numerosos estomas ubicados a nivel de la superficie foliar (Fig. 1b). Hipodermis formada por una capa de células de contenido hialino, ubicada por debajo de la epidermis adaxial. Mesofilo bifacial, con ligera diferenciación de las células en la mitad adaxial y abaxial. La primera con células alargadas ricas en cloroplastos y con pocos espacios intercelulares, y la segunda con células isodiamétricas o ligeramente alargadas, con paredes delgadas, cloroplastos y escasos espacios intercelulares. Las secciones presentan 20-22 estratos de células, incluyendo la hipodermis. Nódulos de fibras esclerenquimáticas no ligados al tejido vascular, formando una fila adyacente a la epidermis abaxial. Haces vasculares rodeados por una vaina de fibras de esclerénquima ubicadas frente al floema, con paredes más engrosadas que el resto. Los haces vasculares dispuestos en dos niveles, los de mayor tamaño en la parte central de la lámina, los menores, adyacentes a la epidermis adaxial. Los de primer orden son colaterales y están rodeados de una vaina de fibras y células es-

tegmáticas con cuerpos silícicos. Células rafidiíferas escasas, adyacentes a ambas epidermis, abundantes idioblastos mucilaginosos (Fig. 1a, b).

**Tabla 1.** Caracteres anatómicos en hojas de *Cattleya jenmanii*.

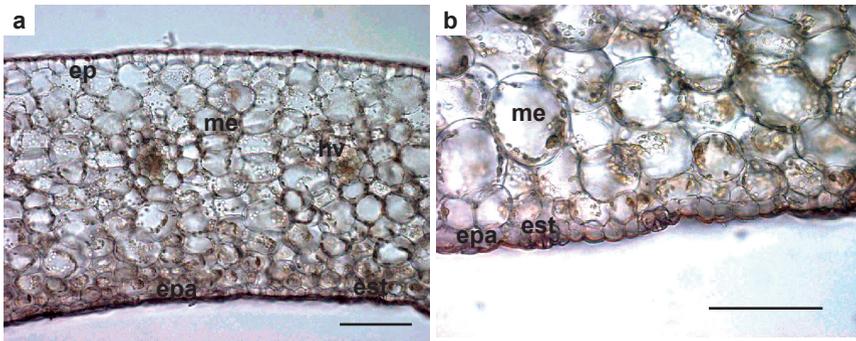
Ambiente	Distribución de estomas	Cutícula		Nº estratos	Nº haces vasculares	Nódulos de fibras	Otras células
		Epidermis adaxial	Epidermis abaxial				
Orquideario	hipostomática	engrosada	engrosada	20-22	2 niveles	presentes 1 nivel	estegmáticas y rafidiíferas
Multiplicación <i>in vitro</i>	anfiestomática	poco engrosada	poco engrosada	9-12	1 nivel	ausentes	estegmáticas
Aclimatación	anfiestomática	poco engrosada	poco engrosada	11-12	2 niveles	ausentes	estegmáticas y rafidiíferas



**Fig. 1.** *Cattleya jenmanii*. **a.** Sección transversal de la lámina foliar de hojas maduras cultivadas en orquideario. **b.** Detalle de la epidermis abaxial. cu = cutícula; ep = epidermis adaxial; epa = epidermis abaxial; est = estoma; hp = hipodermis; hv = haz vascular; im = idioblasto mucilaginoso; me = mesofilo; nf = nódulo de fibras. Escala = 100  $\mu$ m.

Caracteres anatómicos de la hoja desarrollada *in vitro* (Tabla 1, Fig. 2)

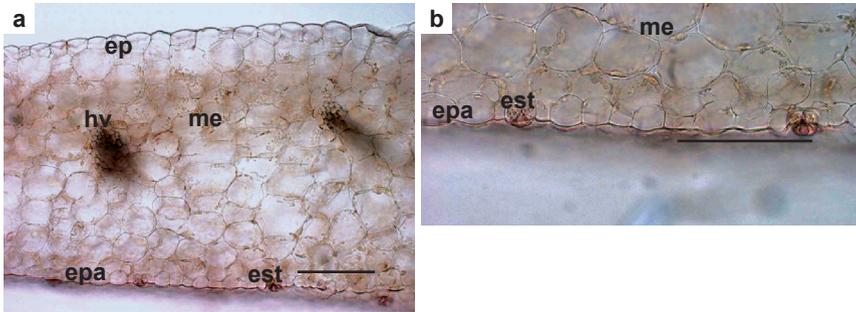
Lámina foliar anfiestomática. Epidermis adaxial con células ligeramente más grandes que en la abaxial, cutícula poco engrosada, tricomas glandulares tricelulares caedizos y estomas aislados (Fig. 2a). Epidermis abaxial con estomas numerosos y cutícula poco engrosada (Fig. 2b). Hipodermis ausente. Mesofilo isofacial con 9-12 estratos de células isodiamétricas con paredes delgadas y espacios intercelulares. Haces vasculares colaterales dispuestos en una fila paralela, equidistante a ambas epidermis y rodeados por una vaina de esclerenquima constituida por fibras con paredes poco engrosadas y células estegmáticas escasas.



**Fig. 2.** *Cattleya jenmanii*. **a.** Sección transversal de la lámina foliar de hojas maduras en la fase de multiplicación *in vitro*. **b.** Detalle del anterior con vista de la epidermis abaxial. ep = epidermis adaxial; epa = epidermis abaxial; est = estoma; hv = haz vascular; me = mesofilo. Escala = 100 µm.

Caracteres anatómicos de la hoja desarrollada durante la aclimatación (Tabla 1, Fig. 3)

Lámina foliar anfiestomática y tricomas glandulares tricelulares. Epidermis adaxial compuesta por células más grandes que la adaxial, cutícula poco engrosada y estomas aislados (Fig. 3a). Epidermis abaxial con numerosos estomas ubicados al nivel de la superficie foliar, cutícula poco engrosada (Fig. 3b). Hipodermis ausente. Mesofilo isofacial compuesto por 11-12 estratos de células isodiamétricas con paredes delgadas, sin diferenciación morfológica y con espacios intercelulares. Haces vasculares dispuestos en dos niveles, los de primer orden equidistantes a ambas epidermis y los de segundo, próximos a la adaxial y rodeados por una vaina de fibras de esclerenquima con paredes poco engrosadas. Los haces de primer orden son colaterales y están rodeados de células estegmáticas escasas, con cuerpos silíceos. Células rafiidióferas adyacentes a ambas epidermis.



**Fig. 3.** *Cattleya jenmanii*. **a.** Sección transversal de la lámina foliar de hojas maduras en aclimatación. **b.** Detalle del anterior con vista de la epidermis abaxial. ep = epidermis adaxial; epa = epidermis abaxial; est = estoma; hv = haz vascular; me = mesófilo. Escala = 100  $\mu$ m.

### *Cattleya lueddemanniana* Rchb. f.

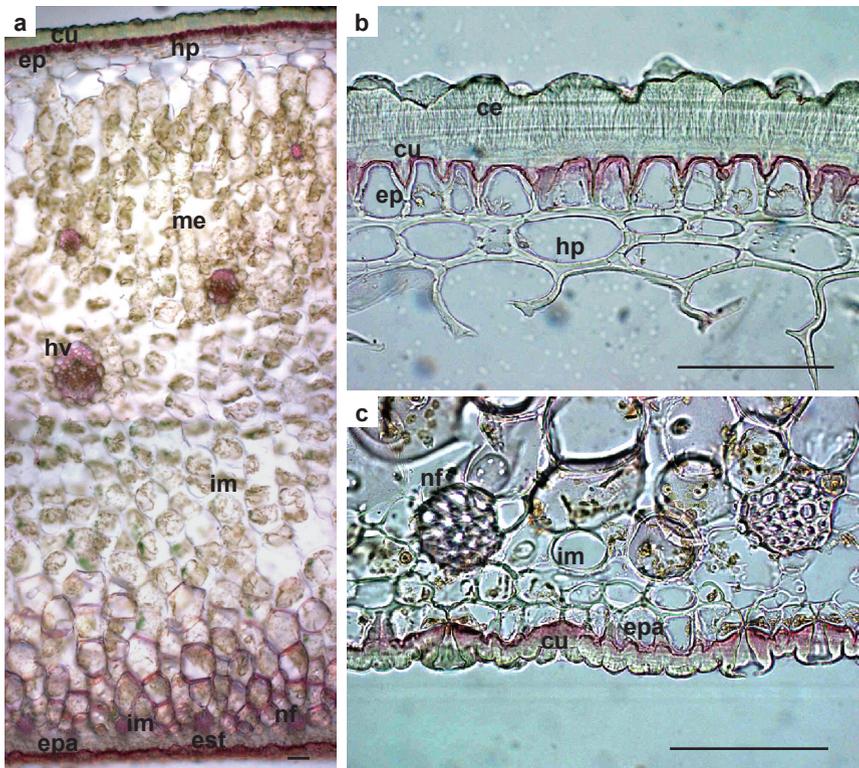
Caracteres anatómicos de la hoja desarrollada en orquideario (Tabla 2, Fig. 4)

Lámina foliar glabra e hipoestomática (Fig. 4a). Epidermis adaxial (Fig. 4b) con células más grandes que en la abaxial. Cutícula más gruesa en la epidermis adaxial que en la abaxial con abundante depósito de ceras epicuticulares. La epidermis abaxial con numerosos estomas que sobresalen ligeramente de la superficie foliar (Fig. 4c). Hipodermis formada por una capa de células ubicada por debajo de la epidermis adaxial y constituida por células con contenido hialino. Mesofilo bifacial, con ligera diferenciación entre las células de la mitad adaxial y la abaxial. En la mitad adaxial, las células son alargadas, ricas en cloroplastos y con pocos espacios intercelulares, y en la mitad abaxial son isodiamétricas o ligeramente alargadas, con espacios intercelulares y pocos cloroplastos. Las secciones presentan 28-31 estratos de células, incluyendo la hipodermis. Nódulos de fibras esclerenquimáticas, no ligados al tejido vascular, distribuidos en filas adyacentes a ambas epidermis, los adaxiales más pequeños que los abaxiales. Haces vasculares rodeados por una vaina de fibras de esclerénquima con paredes engrosadas, engrosamiento mayor en las fibras ubicadas frente al floema. Haces vasculares dispuestos en tres niveles, los de mayor tamaño adyacentes a la epidermis abaxial, los de menor, a la adaxial y los de tamaño intermedio entre los anteriores. Haces vasculares de primer orden colaterales y rodeados de una vaina de fibras de esclerénquima y células estegmáticas con cuerpos silícicos. Células rafidiíferas escasas en posición adyacente a la epidermis adaxial, idioblastos mucilaginosos igualmente escasos.

**Tabla 2.** Caracteres anatómicos en hojas de *C. lueddemaniana*.

Ambiente	Distribución de estomas	Cutícula (µm)		Nº estratos	Nº haces vasculares	Nódulos de fibras	Otras células
		Epidermis adaxial	Epidermis abaxial				
Orquideario	hipoestomática	engrosada 50,82	engrosada 16,61	28-31	3 niveles	presentes 2 niveles	estegmáticas y rafidiíferas
Multiplicación <i>in vitro</i>	anfiestomática	poco engrosada 2,30	poco engrosada 2,04	13-16	2 niveles	ausentes	íd.
Aclimatación	anfiestomática	poco engrosada 5,51	poco engrosada 4,04	13-18	2 niveles	presentes 1 nivel	íd.

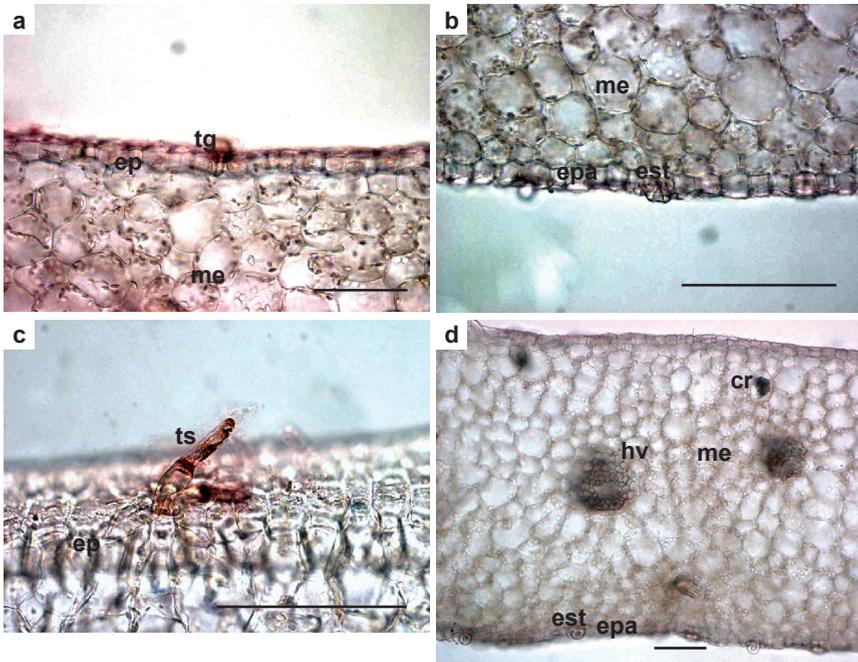
íd. = ídem



**Fig. 4.** *Cattleya lueddemaniana*. **a.** Sección transversal de la lámina foliar de hojas maduras cultivadas en orquideario. **b.** Detalle de la epidermis adaxial. **c.** Detalle de la epidermis abaxial. ce = cera; cu = cutícula; ep = epidermis adaxial; epa = epidermis abaxial; est = estoma; hp = hipodermis; hv = haz vascular; me = mesofilo; im = idioblasto mucilaginoso; nf = nódulo de fibras. Escala = 100 µm.

Caracteres anatómicos de la hoja desarrollada *in vitro* (Tabla 2, Fig. 5)

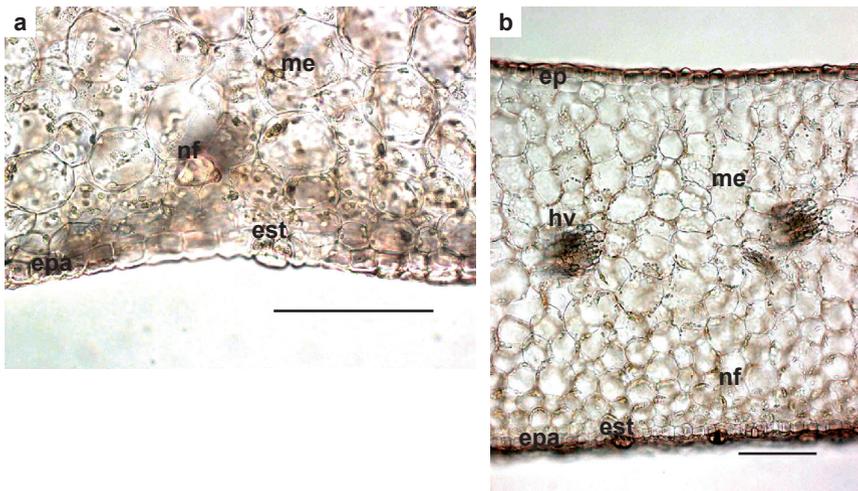
Lámina foliar anfiestomática (Fig. 5a). Epidermis adaxial con células de tamaño similar a las de la abaxial, cutícula poco engrosada, tricomas glandulares bi celulares caedizos y tricomas simples pluricelulares (Fig. 5b, c). Epidermis abaxial con cutícula poco engrosada y numerosos estomas que sobresalen ligeramente de la superficie foliar y cutícula (Fig. 5d). Hipodermis ausente. Mesofilo isofacial compuesto por células isodiamétricas de paredes delgadas y con espacios intercelulares. Las secciones presentan 13-16 estratos de células. Haces vasculares dispuestos en dos niveles, los de mayor tamaño colaterales, en la parte central, y los más pequeños, próximos a la epidermis adaxial, todos rodeados de una vaina de esclerenquima cuyas células tienen las paredes poco engrosadas y células estegmáticas con cuerpos silíceos. Células rafidiíferas formando una fila en posición adyacente a la epidermis adaxial.



**Fig. 5.** *Cattleya lueddemanniana*. **a.** Sección transversal de la lámina foliar de hojas maduras en la fase de multiplicación *in vitro*. **b-c.** Detalle de la epidermis adaxial. **d.** Detalle de la epidermis abaxial. cr = células rafidiíferas; ep = epidermis adaxial; epa = epidermis abaxial; est = estoma; hv = haz vascular; me = mesofilo; tg = tricoma glandular; ts = tricoma simple. Escala = 100  $\mu$ m.

Caracteres anatómicos de la hoja desarrollada durante la aclimatación (Tabla 2, Fig. 6)

Lámina foliar de tipo anfiestomático. Epidermis adaxial con células un poco más grandes que las de la abaxial, cutícula poco engrosada. Epidermis abaxial con cutícula poco engrosada y numerosos estomas que sobresalen ligeramente de la superficie foliar. Hipodermis ausente. Mesofilo isofacial compuesto por 13-18 estratos de células isodiamétricas de paredes delgadas sin diferenciación morfológica y con espacios intercelulares (Fig. 6a). Nódulos de fibras esclerenquimáticas no ligados al tejido vascular en filas adyacentes a la epidermis abaxial (Fig. 6b). Hazes vasculares dispuestos en dos niveles, los de mayor tamaño en la parte central, otros más pequeños, próximos a la epidermis adaxial, ambos rodeados por vainas de fibras con paredes poco engrosadas. Los de primer orden son colaterales y presentan células estegmáticas con cuerpos silícicos en la vaina. Células rafi-diíferas formando una fila en posición adyacente a la epidermis adaxial y escasos idioblastos mucilaginosos.



**Fig. 6.** *Cattleya lueddemanniana*. **a.** Sección transversal de la lámina foliar de hojas maduras en aclimatación. **b.** Detalle del anterior con vista de la epidermis abaxial. ep = epidermis adaxial; epa = epidermis abaxial; est = estoma; hv = haz vascular; me = mesofilo; nf = nódulo de fibras. Escala = 100  $\mu$ m.

### Cuantificación de variables de las hojas en las tres condiciones

#### *Cattleya jenmanii*

El ambiente de desarrollo afectó el grosor de la epidermis, la lámina foliar y el mesofilo, medidos en secciones transversales de las hojas (Tabla 3). En or-

quideario el grosor de la epidermis adaxial y abaxial varió desde un máximo de 42,0 y 37,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente, hasta un mínimo de 30,4 y 21,4  $\mu\text{m}$  y 26,5 y 21,8  $\mu\text{m}$ , en multiplicación y aclimatación. El grosor de la lámina foliar y del mesofilo fue mayor en orquideario, y menor en multiplicación *in vitro*. El área de haces vasculares, xilema y floema (Tabla 3), también se vieron afectados por el ambiente de desarrollo, y fue mayor en las tres variables en orquideario, y menor en aclimatación.

**Tabla 3.** Grosor de epidermis, lámina foliar y mesofilo, y área de haces vasculares, xilema y floema en hojas de *Cattleya jenmanii*.

Ambiente	Epidermis		Lámina foliar ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	Mesofilo ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	Haces vasculares ( $\mu\text{m}^2$ ) $\bar{X}$ $\pm \text{DE}$	Xilema ( $\mu\text{m}^2$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	Floema ( $\mu\text{m}^2$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$
	adaxial ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X}$ $\pm \text{DE}$	abaxial ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X}$ $\pm \text{DE}$					
Orquideario	42,0 $\pm$ 1,0a	37,7 $\pm$ 0,5a	1871,5 $\pm$ 7,9a	1772,0 $\pm$ 7,9a	36844,0 $\pm$ 2440,2a	30469,3 $\pm$ 2062,3a	5277,9 $\pm$ 347,7a
Multiplicación <i>in vitro</i>	30,4 $\pm$ 1,0b	21,4 $\pm$ 0,5b	375,3 $\pm$ 6,0c	331,5 $\pm$ 6,3c	5835,9 $\pm$ 358,3b	4702,0 $\pm$ 310,8b	811,0 $\pm$ 52,1b
Aclimatación	26,5 $\pm$ 0,9b	21,8 $\pm$ 0,9b	432,2 $\pm$ 4,4b	388,4 $\pm$ 4,5b	3745,9 $\pm$ 259,9c	2859,3 $\pm$ 197,5c	727,5 $\pm$ 63,9b

n = 50 de 12 hojas diferentes. Letras distintas indican diferencias significativas

### **Cattleya lueddemanniana**

El ambiente de desarrollo afectó el grosor de la epidermis, de la cutícula, de la lámina foliar y del mesofilo (Tabla 4). Las epidermis y cutículas adaxiales y abaxiales de plantas en orquideario registraron los mayores promedios variando desde 91,7 hasta 16,6  $\mu\text{m}$ , en comparación con los promedios de las plantas de multiplicación *in vitro* y aclimatación. Estas últimas registraron los valores más bajos y similares entre sí para el grosor de las epidermis adaxial y abaxial (Tabla 4). Los menores grosores de cutícula adaxial y abaxial se presentaron en las hojas de plantas de multiplicación *in vitro* con 2,3 y 2,0  $\mu\text{m}$ , mientras que las de la fase de aclimatación, valores intermedios con 5,5 y 4,0  $\mu\text{m}$ . Las plantas en orquideario también registraron los mayores promedios de grosor de la lámina foliar y el mesofilo, con 2431,1 y 2286,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente; las plantas en multiplicación *in vitro* los menores valores con 443,3 y 413,1  $\mu\text{m}$ , y las provenientes de aclimatación, con valores intermedios de 652,6 y 606,1  $\mu\text{m}$ .

El área de haces vasculares, el xilema y el floema (Tabla 4) también fueron afectados por el ambiente de desarrollo. Los mayores promedios de las tres variables se registraron en las plantas en orquideario; las de multiplicación *in vitro* y aclimatación registraron los menores (Tabla 4).

**Tabla 4.** Grosor de epidermis, cutícula, lámina foliar y mesofilo, y área de haces vasculares, xilema y floema en hojas de *Cattleya lueddemanniana*.

Ambiente	Epidermis		Cutícula		Lámina foliar ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	Mesofilo ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	Haces vasculares ( $\mu\text{m}^2$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	Xilema ( $\mu\text{m}^2$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	Floema ( $\mu\text{m}^2$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$
	adaxial ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	abaxial ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	adaxial ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$	abaxial ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm \text{DE}$					
Orquideario	91,7 $\pm$ 0,8a	43,8 $\pm$ 0,5a	50,8 $\pm$ 1,04a	16,6 $\pm$ 0,4a	2431,1 $\pm$ 8,2a	2286,7 $\pm$ 7,0a	36688,7 $\pm$ 1907,8a	31201,4 $\pm$ 1717,1a	4204,7 $\pm$ 154,3a
Multiplicación <i>in vitro</i>	21,3 $\pm$ 0,4b	17,5 $\pm$ 0,4b	2,3 $\pm$ 0,1c	2,0 $\pm$ 0,1c	443,3 $\pm$ 7,2c	413,1 $\pm$ 4,5c	5373,1 $\pm$ 275,9b	4391,5 $\pm$ 239,6b	812,8 $\pm$ 61,6b
Aclimatación	21,8 $\pm$ 0,5b	17,2 $\pm$ 0,4b	5,5 $\pm$ 0,2b	4,0 $\pm$ 0,2b	652,6 $\pm$ 13,9b	606,1 $\pm$ 13,9b	5430,1 $\pm$ 248,8b	4082,0 $\pm$ 188,6b	1011,5 $\pm$ 68,7b

n = 42 de 12 hojas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas

## DISCUSIÓN

De los trabajos de investigación que existen acerca de la anatomía de la lámina foliar de *Cattleya* y de los demás representantes de Orchidaceae se puede deducir que, en general, las especies estudiadas durante la fase de orquideario no difirieron del patrón mostrado por la familia (Moller & Rasmussen 1984). Campos & Oliveira (1987) y Bonates (1993) describieron una anatomía similar en *Cattleya intermedia* Graham. y *C. eldorado* Linden, respectivamente.

La anatomía de la lámina foliar de *Cattleya jenmanii* y *C. lueddemanniana* en condiciones de orquideario fue similar a otros taxones de Orchidaceae en características como la presencia de una hipodermis uniseriada, idioblastos rafidíferos y haces vasculares colaterales con esclerénquima asociado (tribu Vanilleae, género *Octomeria* R.Br. y *Sophronitis coccinea* Rchb.f.), tricomas tricelulares, nódulos de fibras, haces vasculares colaterales, esclerénquima asociado con los haces vasculares, cuerpos silíceos e idioblastos mucilaginosos (subtribu Casetinae y *Sophronitis coccinea*) (Wakabayashi 1957; Bernardi *et al.* 1994; Widholzer & de Oliveira 1994; Baruah 1998; Stern & Judd 2000, 2001).

La lámina foliar presentó características xeromórficas en ambas especies. Entre éstas resaltaron el engrosamiento de la lámina, la epidermis y la cutícula, la presencia de hipodermis y el desarrollo del esclerénquima (Moller & Rasmussen 1984; Rundall 1992). Sin embargo, los promedios correspondientes al grosor de la lámina foliar, la epidermis, el número de capas de células del mesofilo, el número de filas de haces vasculares y de nódulos de fibras fueron menores en *C. jenmanii* que en *C. lueddemanniana*. Estas diferencias en la intensidad de las características xeromórficas pueden estar relacionadas con el hábitat donde se desarrollan las especies estudiadas. *C. jenmanii* crece entre los 800 y 1200 m snm, en selvas densas, húmedas y tupidas, mientras que el biotipo larense de *C. lueddemanniana* crece entre 400 y 700 m snm, en espinares, cardonales, bosques de galería en tierras bajas y selvas veraneras (Aulisi & Foldats 1989; Cuenca 1997).

Los resultados obtenidos permitieron describir el efecto de las condiciones de cultivo sobre la anatomía foliar de *C. jenmanii* y *C. lueddemanniana*, y el modo en que ésta varió ante el cambio ambiental durante la aclimatación. La diferencia existente entre el grosor de la lámina en las hojas de cultivo *in vitro* y de orquideario puede ser atribuida a la reducción del tamaño de estructuras y adquisición de caracteres juveniles propios de la micropropagación, tal como lo indicaron Anita *et al.* (2000). La epidermis, la cutícula y las capas de ceras epicuticulares desarrolladas *in vitro* son más delgadas que en orquideario. Además, se presentaron estomas y tricomas glandulares en la superficie adaxial que no fueron encontrados en la lámina foliar de orquideario. Esto podría ser atribuido al efecto del cultivo *in vitro*, lo que corresponde con George (1996), quien indicó que la micropropagación en contenedores cerrados resulta invariablemente en la formación de hojas con anomalías estructurales y funcionales. Además, la ausencia de estímulos ambientales podría haber permitido la permanencia de tricomas que, en condiciones

de cultivo *ex vitro*, se perderían. Durante la aclimatación no se detectaron cambios en el grosor de la epidermis o de la cutícula, ni en la presencia de tricomas y estomas en la superficie adaxial, en comparación con la multiplicación *in vitro*, que permitieran considerar la adaptación a las nuevas condiciones. Es evidente que el proceso de desarrollo de la lámina foliar adaptada a las condiciones *ex vitro* requiere un período mayor que la duración del presente estudio. Al respecto, Anita *et al.* (2000) señalaron una reducción en la deposición de ceras epicuticulares en hojas de *Dendrobium* producidas *in vitro* en comparación con las desarrolladas *in vivo* o durante la aclimatación. Este fenómeno también ha sido descrito para otras especies no pertenecientes a la familia Orchidaceae, como el tabaco (Pospisilova *et al.* 1998).

En las plantas provenientes de multiplicación *in vitro* el mesofilo presentó una menor complejidad estructural, con ausencia de hipodermis y de nódulos de fibras, una fila de haces vasculares de segundo orden y los idioblastos mucilaginosos, además de la reducción del número de estratos de células, el menor tamaño y complejidad de los haces vasculares, la menor cantidad de fibras asociadas al tejido vascular, el menor grosor de las paredes de las fibras y la reducción de la diferenciación del parénquima asimilador. Este efecto del cultivo *in vitro* fue descrito en especies no pertenecientes a Orchidaceae, tal como lo señaló Apóstolo *et al.* (2005) para alcachofa. Parece razonable pensar que las hojas desarrolladas en recipientes de cultivo *in vitro* no están expuestas a condiciones hídricas, de luminosidad y movimiento que activarían la expresión de los genes responsables del desarrollo de dichas características en el tejido fundamental y de sostén. Al respecto, Brainerd *et al.* (1981) señalaron que las vitroplantas de ciruelo experimentaron una reducción de tamaño de las células del parénquima en empalizada y un incremento de los espacios intercelulares durante el desarrollo *in vitro*. George (1996) indicó que la micropropagación en contenedores cerrados resulta invariablemente en la formación de hojas con anomalías estructurales y funcionales.

Durante la aclimatación se observó una tendencia a la adquisición de características similares a las de orquideario, pero manteniendo rasgos comunes con las desarrolladas *in vitro*, como la ausencia de hipodermis y la estructura homogénea del mesofilo. Estas características podrían ser consideradas como indicadores de que la hoja aún no ha adquirido la conformación requerida para la adaptación completa a las condiciones *ex vitro*, en lo referente al control del balance hídrico y la captación de la energía luminosa. La permanencia de características intermedias entre las hojas desarrolladas en el ambiente *in vitro* y el orquideario fue señalada en *Cattleya jenmanii* por Torres *et al.* (2006). Tales efectos se reducen progresivamente en las hojas nuevas.

Campos & Oliveira (1987) encontraron en *C. intermedia* que a medida que se incrementó la luminosidad, se estimuló el desarrollo de caracteres xeromórficos. A pesar de tratarse de una observación de campo permite inferir que la baja luminosidad durante la micropropagación afectó el desarrollo de estructuras de control de la pérdida de humedad en la hoja.

Estas observaciones representan una contribución a la comprensión de las causas que originan el fallo en la aclimatación y los retrasos en el desarrollo temprano en vivero de vitroplantas aclimatizadas de *Cattleya*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anita, S., L. Priya, K. Rajmohan & S. Alex. 2000. Comparison of chlorophyll content, water loss, and anatomical features of leaves of the normal, *in vitro* cultured and, hardened *Dendrobium* hybrid plants. *J. Orchid Soc. India* 14(1-2): 41-46.
- Apóstolo, N., C. Brutti & B. Llorente. 2005. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In Vitro Cell. Developmental Biol.* 41: 307-313.
- Aulisi, C. & E. Foldats. 1989. *Monografía de las Cattleyas venezolanas y sus variedades*. Editorial Torino. Caracas.
- Baruah, A. 1998. Vegetative anatomy of the endemic orchid *Vanilla ptilifera* Holt. *Phytomorphology* 48(1): 101-105.
- Bernardi, J., P. de Oliveira & J. de Araújo. 1994. Anatomia foliar de espécies do gênero *Octomeria* (Orchidaceae). *Napaea* 10: 7-14.
- Bonates, L. 1993. Estudios ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazonia. II. Anatomía ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma campina de Amazonia Central. *Acta Amazon.* 23(4): 315-348.
- Brainerd, K., L. Fuchigami, S. Kwiatkowski & C. Clark. 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixi' plum grown under different environments. *HortScience* 16: 173-175.
- Campos, V. & P. Oliveira. 1987. Morfo-anatomía foliar de *Cattleya intermedia* (Orchidaceae). *Napaea* 2: 1-10.
- Corder, G. & D. Foreman. 2009. *Nonparametric statistics for non-statisticians: a step-by-step approach*. Wiley, New York.
- Cuenca, R. 1997. *Cattleya jenmanii* Rolf. Parte I. *Orquideofilo* 5(1): 4-7.
- Dami, I. & H. Hughes. 1995. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.* 42: 179-184.
- Donnelly, D., W. Vidaver & K. Lee. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.* 4: 43-50.
- George, E. 1996. *Plant propagation by tissue culture*. Part 2. In: Practice. Phenotype of micropropagated material. Capítulo 15. Exegetics Limited.
- Majada, J., F. Tadeo, M. Fal & R. Sánchez-Tamés. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Pl. Cell. Tissue Organ Cult.* 63: 207-214.
- Majada, J., M. Fal, F. Tadeo & R. Sánchez-Tamés. 2002. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured *in vitro*. *In Vitro Cell. Developmental Biol.* 38: 272-278.

- Masooma, A., H. Hughes & F. Safadi. 1998. Studies on stomatal function, epicuticular wax and stem-root transition region of polyethylene glycol-treated and nontreated *in vitro* grape plantlets. *In Vitro Cell. Developmental Biol.* 34: 1-7.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* 15: 473-497.
- Moller, J. & H. Rasmussen. 1984. Stegmata in Orchidales: character state distribution and polarity. *Bot. J. Linn. Soc.* 89: 53-76.
- Piqueras, A. & P. Debergh. 1999. Morphogenesis in micropropagation. In: Wong-Young, S. & S. Bhojwani (eds.). *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*, pp. 443-462. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda.
- Pospisilova, J., N. Wilhelmova, H. Synkova, J. Catsky, D. Krebs, I. Tichá, B. Hanackova & J. Snopek. 1998. Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 49(322): 863-869.
- Roth, I. 1964. *Microtecnia Vegetal*. Ediciones Biblioteca UCV. Caracas, Venezuela.
- Rundall, P. 1992. *Anatomy of flowering plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sass, J. 1958. *Vegetal Microtechnique*. Iowa State University Press, Iowa.
- Seon, J., Y. Cui, T. Kozai & K. Paek. 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.* 61: 135-142.
- Stern, W. & W. Judd. 2000. Comparative anatomy and systematics of the orchid tribe Vanilleae excluding *Vanilla*. *Bot. J. Linn. Soc.* 134: 179-202.
- Stern, W. & W. Judd. 2001. Comparative anatomy and systematics of Cataseinae (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 136: 153-178.
- Torres, J. & N. Mogollón. 1997. Micropropagación clonal masiva de *Cattleya lueddemanniana* Rchb. f. *Proc. Interam. Soc. Trop. Hort.* 41: 92-98.
- Torres, J., L. Laskowski & M. Sanabria. 2006. Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *Cattleya jenninii* Rolfe. *Bioagro* 18(2): 93-99.
- Wakabayashi, S. 1957. On the form and formative stage of raphidian cells in some araceous and orchidaceous plants. *J. Jap. Bot.* 32: 368-374.
- Widholzer, C. & P. de Oliveira. 1994. Tipo fotosintético e anatomia foliar de *Sophronitis coccinea* (Orchidaceae). *Napaea* 10: 23-29.
- Zobayed, S., F. Afreen-Zobayed, C. Kubota & T. Kozai. 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In Vitro Cell. Developmental Biol.* 35: 183-188.