

PID 2144

## Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos “in vitro”

*Lallana, Víctor H.; Billard, Cristina E.; Martínez, Vanina A.; García, Luz F.; Barsanti, María V.; Di Persia, Juan F.; Dalzotto, Carlos; Scimpft, Katya M.; De La Cruz, Valentín*

AUTORES: Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. (Oro Verde, Entre Ríos, Argentina).

CONTACTO: [victorl@fca.uner.edu.ar](mailto:victorl@fca.uner.edu.ar)

### Resumen

Este proyecto de investigación se enmarca dentro de la investigación básica y aplicada con transferencia. El preocupante avance de la agriculturización sobre áreas de montes nativos y selvas ribereñas amenaza la biodiversidad. En tal sentido nos preocupa la pérdida de especies nativas de interés desde el punto de vista ecológico, agronómico u ornamental. El proyecto se centra en el rescate y propagación de especies nativas de orquídeas de la zona del litoral, en particular las que crecen en la diversidad de hábitats palustres y selvas ribereñas de los arroyos de Entre Ríos, contribuyendo a la preservación de las especies ante el avance de las actividades antrópicas en los ecosistemas.

El objetivo es propagar por técnicas de cultivo “in vitro” especies terrestres y epífitas de orquídeas nativas de la Provincia de Entre Ríos, hasta la etapa de aclimatación de plantas en macetas y/o palos, confeccionando los respectivos protocolos de micropropagación y aclimatación para las especies evaluadas.

A partir de semillas, se buscará efficientizar la producción de protocormos y el establecimiento de plantitas “in vitro”, las que serán donadoras de explantos para inducir organogénesis directa o indirecta, con diferentes combinaciones hormonales.

La transferencia, a través de cursos, charlas técnicas y cartillas, ofrecidas a viveristas, asociaciones de orquidiófilos y jardines botánicos, contribuirá a la toma de conciencia para no adquirir, ni vender recursos nativos, en su estado original y propiciar la compra de estas especies obtenidas por técnicas de cultivo de tejidos.

**Palabras clave:** Recursos genéticos nativos, orquídeas, multiplicación, micropropagación

## Introducción

La familia *Orchidaceae*, de amplia distribución mundial, comprende alrededor de 750 géneros con 20.000 a 25.000 especies (Jonhson, 1992). *Ochidaceae* constituye claramente una de las familias de plantas más grande y variada (Dresler, 2005). Según este autor en el año 2003, un estudio cuidadoso sugería la existencia de 24.500 especies de orquídeas. La mayor diversidad está concentrada en las zonas tropicales y subtropicales pudiendo crecer como epífitas, terrestres, lacustres, rupícolas, humícolas y subterráneas (Jonhson 1992).

En Argentina crecen como nativas 246 especies de 75 géneros (Zuluaga & Morrone 1999). Para la provincia de Salta se han registrado 88 especies (Carbo y Barni, 2002), en Misiones 154 (Insaurralde y González, 2002), en la Patagonia 25 (Zuloaga & Morrone, 1999) y unas 17 para Córdoba (Cocucci, 2002).

En el herbario de la FCA-UNER existen registros de 5 especies de orchidaceae (*Chlorea membranacea*; *Cyclopogon elatus*; *Cyclopogon apticus*; *Geoblasta pennicillata*; *Brachystele camporum*) si bien existen registros de otros géneros como *Oncidium*, *Brassavola*, *Cyclopogon*, *Chlorea*, *Habenaria* y *Pelelexia bonariensis*. Insaurralde y Radins, 2007 en el libro Misiones Orquídeas cita como área de distribución a 11 orquídeas para la provincia de Entre Ríos. Por referencia de viveristas de la ciudad de Paraná y Concordia (E. Ríos), se sabe que muchas de las especies nativas de Misiones se cultivan en Entre Ríos sin mayores problemas. Los coleccionistas y aficionados de asociaciones de orquídiófilos cuentan con varias especies nativas en cultivo en sus colecciones. Además, desde hace dos años aproximadamente se está cultivando por coleccionistas y disponible el ejemplar tipo en el Vivero Irupe de la ciudad de Paraná, *Gomesa bifolia* federal, especie híbrido natural hallado en Entre Ríos, el cual difiere del *G. bifolia* común por sus pétalos de color rojo vináceo intenso.

La propagación de las orquídeas se realiza en forma agámica y por semillas. A través de la técnica de cultivo "in vitro" se pueden obtener un gran número de plantas, transformándose en una valiosa herramienta cuando se trata de propagar especies en peligro de extinción (Flachsland *et al.*, 1996) o híbridos desde el punto de vista comercial (Penningsfeld, 1985; Kangilal *et al.*, 1999; APO, 2007) o del mantenimiento de la biodiversidad (Pritchard, 1990).

Muchas plantas de orquídeas han desaparecido y nos enfrentamos al peligro de perder especies completas. Las orquídeas deben competir con la agricultura, el crecimiento urbano y la industria (Dresler, 2005). Gran parte de la vegetación natural de los países latinoamericanos ha desaparecido y la presión a favor de la agricultura y la urbanización es muy probable que no vaya a disminuir.

Existe un creciente reconocimiento de la diversidad biológica como un bien global de vital importancia y valor para las generaciones presentes y futuras. Sin embargo, los factores de amenaza antrópicos tanto a nivel de especies o de ecosistemas nunca habían sido tan impactantes como en la actualidad. Este hecho tiene grandes implicaciones para el desarrollo económico y social, motivo por el cual deben tomarse medidas urgentes en todas partes del mundo con miras a salvaguardar el patrimonio biológico mundial (Wyse Jackson y Sutherland, 2000).

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales han demostrado ser un importante procedimiento en la multiplicación, mejoramiento y la conservación de plantas útiles al hombre (Pierik, 1990; Roca y Mroginsky, 1991; Flaschland, 1996; Chrispeels y Sadava, 2002; Echenique *et al.*, 2004). Por otra parte el acelerado ritmo con que se destruyen, alteran y fragmentan los ambientes naturales, hace necesario desarrollar estrategias alternativas, como la micropropagación, para conseguir una multiplicación más eficiente de aquellas especies en peligro de extinción (Bonomo y Molina, 2006; Romero-Tirado *et al.*, 2007; Flores-Escobar *et al.*, 2008).

Este proyecto de investigación se enmarca dentro de la investigación básica y aplicada con transferencia, habiendo planteado las siguientes hipótesis o justificación:

- La producción de plantas de orquídeas nativas por micropropagación contribuirá a la preservación de las especies.
- El desarrollo de protocolos para la generación y establecimiento de plantitas contribuirá a la conservación de germoplasma y formación de bancos "in vitro".
- La transferencia a cultivadores, viveristas y público contribuirá a la toma de conciencia de la preservación de especies nativas y compra de plantas producidas por esta técnica.
- Los Jardines Botánicos del país podrán disponer de plantas de orquídeas para su conservación y preservación.

## Objetivos

El objetivo principal del proyecto es propagar por técnicas de cultivo "in vitro" especies de orquídeas nativas de interés para la provincia de Entre Ríos, hasta la etapa de aclimatación de plantas en macetas. Para ello se propuso:

- \* Eficientizar la producción de protocormos y el establecimiento de plantitas in vitro.
- \* Producir desarrollo de múltiples yemas o cuerpo similares a protocormos (PLBs, Protocorm Like Bodies), a partir de distintos explantos y/o de germinación de semillas con diferentes combinaciones hormonales para inducir la formación de callos y los PLBs.
- \* Constituir un banco de germoplasma de semillas de orquídeas
- \* Confeccionar los protocolos de micropropagación y de la etapa de aclimatación de plantas (rusticación "ex vitro") para las especies evaluadas.
- \* Fomentar, las técnicas de propagación de plantas de orquídeas por cultivo "in vitro", a través de charlas técnicas a viveristas y aficionados al cultivo de orquídeas.
- \* Proveer plantas de orquídeas nativas para su plantación en el Jardín Botánico de Oro Verde y otros Jardines del país.

## Materiales y métodos

Se brinda una síntesis de las metodologías empleadas en los principales títulos que se informan en resultados, debiendo considerarse que muchos aspectos metodológicos han sido publicados y otros protocolizados para trabajos en laboratorio o gabinete.

### **Colección de referencia y banco de germoplasma de orquídeas (BGO)**

Se mantiene una colección de referencia de individuos adultos de orquídeas, los cuales se obtienen por distintas vías: donaciones de aficionados, compras en vivero, decomisos de plantas (Dirección Recursos Naturales de Entre Ríos), colecta en lugares prístinos o sitios poco modificados. En este caso se tiene elaborada una ficha de registro de datos del lugar y condiciones de hábitat en que se encuentra el ejemplar, identificación y estado fenológico. Toda la colección se mantiene con etiquetas rotuladas con las siglas CR-13 (que hace referencia a la colección de referencia y número del ejemplar) y a su vez en una planilla de doble entrada se vuelca toda la información de cada ejemplar. Esta colección se utiliza para hacer cruzamientos (alogamia y autogamia) y obtener frutos con semilla de origen conocido.

Una de las actividades sustantivas del proyecto fue la constitución de un Banco de Germoplasma de semillas de orquídeas (BGO) para lo cual se creó de un Catálogo de Acceso de muestras que funciona con una base de datos "ad hoc" que se actualiza periódicamente y tiene asociados 31 descriptores para cada registro. La conservación de las muestras en el tiempo se realiza en frío ( $5 \pm 1$  °C) con las semillas guardadas en envases pequeños de vidrio con tapa de goma y debidamente rotulados. Estos envases

se guardan en uno mayor con tapa hermética y dentro del cual se coloca silicagel para mantener baja la humedad (Figura 1).



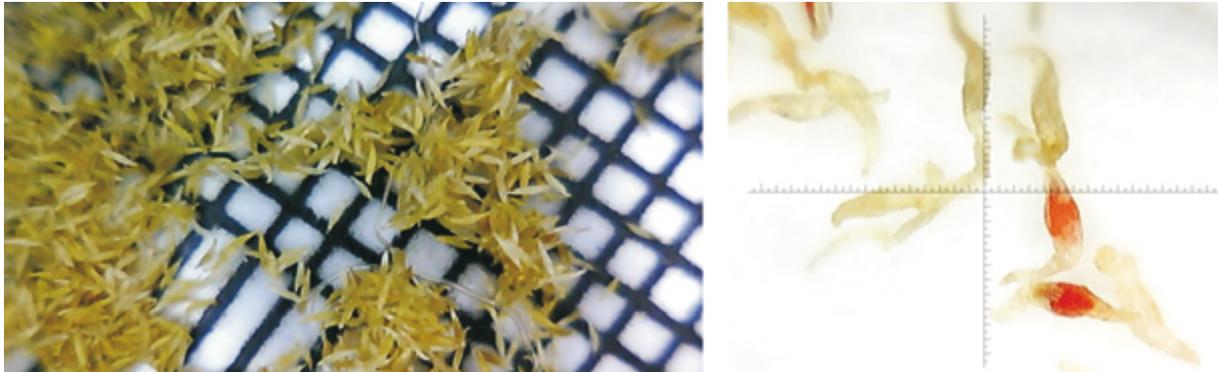
**FIGURA 1.** Detalle del sistema de almacenamiento de las semillas de orquídeas, para su guarda en heladera (5 °C)

La determinación periódica de la viabilidad de las semillas es un dato importante a evaluar para conocer el grado de conservación de las muestras y más aun teniendo en cuenta el pequeño tamaño de las semillas y el desarrollo de un embrión inmaduro sin endosperma (Arditti y Ernst, 1993). A los fines de comprobar la conservación de las semillas en el tiempo, se realizan pruebas de viabilidad a lo largo del tiempo de almacenamiento (Lallana y García, 2012) y se determina la longevidad de las muestras. La viabilidad de las semillas se evalúa mediante la prueba de tetrazolio (Singh, 1981, Vujanovic *et al.* 2000, Preti *et al.* 2013, García y Lallana, 2014). La técnica empleada consiste en tomar una alícuota de 2 a 4 mg de semillas que se colocan en un vial con agua destilada durante 24 h en imbibición, luego se extrae el agua y se agrega solución de 2,3,5 trifenil de tetrazolium al 0,5 %, incubando en oscuridad a 33 °C durante 24 h (Singh, 1981, Lallana y García, 2012). El recuento bajo lupa binocular se realiza en cajas de Petri, colocando debajo de la caja una cuadrícula (0,5 x 0,5 cm) y contando diez cuadros al azar. Se consideraron semillas viables aquellas que presentan una coloración de rosado a rojo oscuro; y no viables las semillas blancas o sin tinción con embrión visible. Los datos se expresaron en porcentaje de semillas viables. Simultáneamente se evalúa el número de semillas vanas de las muestras, las cuales resulta imposible separar antes del análisis de viabilidad, para trabajar con semillas puras tal cual lo establecen las normas ISTA (2012). De esta forma al número de semillas viables y no viables se suma el número de semillas vanas y se obtiene el total de semillas de la muestra y sobre este valor se calcula el porcentaje de semillas vanas de la muestra.

Gran parte de las semillas ingresadas al BGO son evaluadas como ya se indicó en cuanto a su viabilidad y se les efectúan registros fotográficos previos a la prueba de viabilidad, y posteriormente. Se toman fotos con un microscopio digital manual "Supereyes" con una magnificación de hasta 200 aumentos, sobre una escala de referencia (1mm x 1 mm cada cuadrado) y se almacena la información digital en carpetas identificadas por el número de ID del Catálogo de Accesoión. También se efectúa la descripción botánica de la forma y color de las semillas.

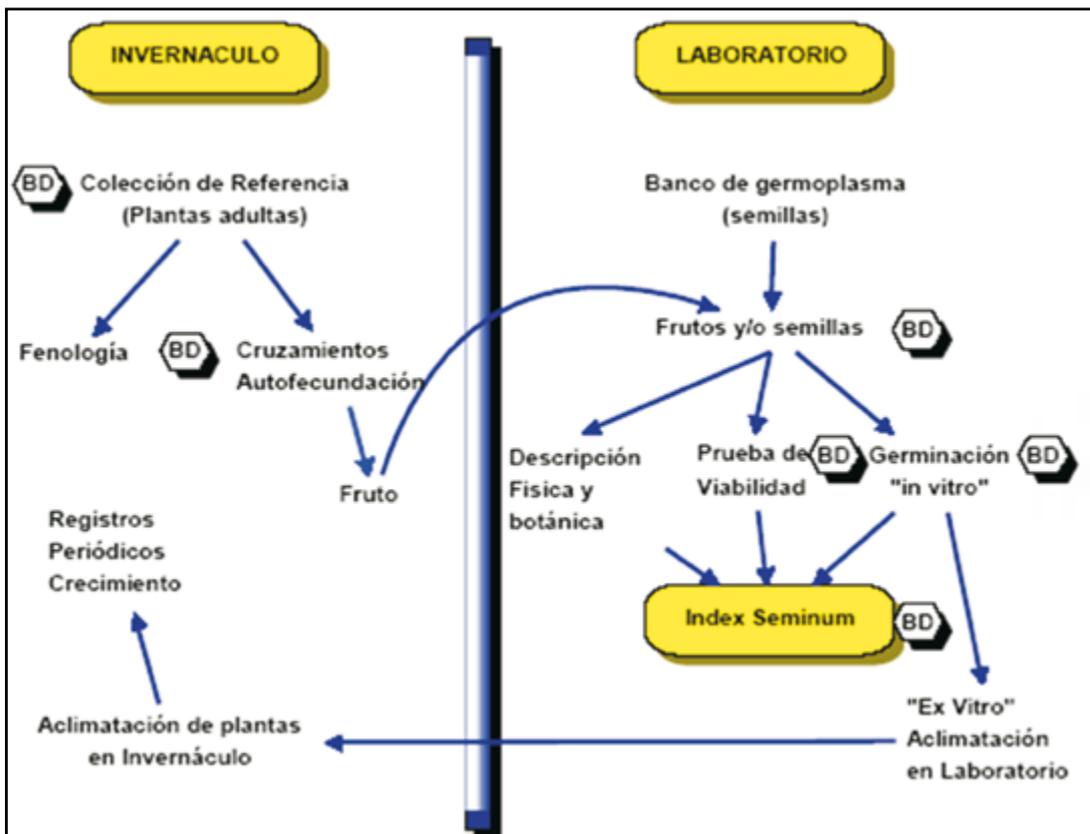
Para las mediciones de semillas, se toma una pequeña alícuota de una muestra de semillas con espátula de acero inoxidable y se coloca sobre papel de acetato impreso con escala milimetrada (Figura 2), montado sobre una platina de acetato translúcida. Luego sobre el dispositivo de montaje de las muestras se toman entre 20 y 40 microfotografías mediante microscopio digital manual "Supereyes" utilizando una ampliación equivalente a 160 aumentos. Las mediciones de la semilla y del embrión (de sus ejes mayores y menores) se realizan sobre las microfotografías digitales, mediante el software de código abierto de dominio público Image J (Ferreira & Rasband, 2011), para lo cual, primeramente en

cada imagen, se determina la escala correspondiente tomando como referencia la escala milimetrada presente en el papel de acetato. Para el cálculo de las dimensiones físicas de la semilla y embrión se utilizan las ecuaciones propuestas por Arditti (1979).



**FIGURA 2.** Microfotografías de semillas de *Gomesa bifolia* (izquierda) con cuadrícula de referencia y semillas no viables (sin color) y teñidas (color rojo, semillas viables) de *Bletilla striata* (derecha)

Una síntesis metodológica del esquema de funcionamiento se presenta en la (Figura 3), donde se indican las principales actividades y puntos de control y generación de información (Base de Datos).



**FIGURA 3.** Esquema general del funcionamiento de la Colección de Referencia de plantas y Banco de germoplasma del PID 2144, indicando los pasos donde se genera información para las distintas bases de datos (BD)

**Ensayos “in vitro”**

El cultivo de tejidos “in vitro” consiste en sembrar explantos (semillas, secciones de órganos) en medio de cultivo semisólido o líquido según el requerimiento de la especie a cultivar. Existen numerosos medios para el cultivo de semillas de orquídeas, siendo los más usados Knudson (1946), Vacin & Went (1949) y Murashige & Skoog (1962) –M&S–. De los tres citados, el que mejor resultado ha dado para los géneros comunes ha sido el M&S diluido al 50 % manteniendo el nivel de sacarosa en 3 % (Flachsland *et al.*, 1996).

La metodología que utilizamos para confeccionar el medio básico M&S (1962), suplementado con vitaminas y aminoácidos consiste en preparar una solución concentrada (x 10), fraccionada de a 50 o 100 cc en envases plásticos, los cuales son tapados y almacenados a temperatura bajo cero (freezer). Al momento de iniciar una experiencia (ensayo) se retira del freezer un envase, se descongela la solución, se toma la alícuota correspondiente (50 ó 100 cc L<sup>-1</sup>) según la concentración del medio de cultivo a preparar, se lo suplementa con sacarosa y según los requerimientos, con fertilizante, carbón activado, agar agar tipo Britania (para medios semisólidos). Se regula su pH (5,6-5,8) y controla la conductividad.

Los medios de cultivo y recipientes de vidrio utilizados para la siembra y repiques se esterilizan en autoclave a 121 °C y 1 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 15 minutos. La desinfección de semillas, siembras y repiques se efectúa en cámara de flujo laminar horizontal para garantizar las condiciones de asepsia.

**Germinación “in vitro”**

La germinación de las semillas de orquídeas en condiciones de asepsia, se efectúa en medio de cultivo semisólido de M&S a la mitad de la concentración en cajas de petri de 5 cm de diámetro. Previo a la siembra se realiza la desinfección de las semillas de acuerdo a protocolos ya establecidos y que consiste básicamente en someter las semillas a una solución con hipoclorito de sodio o calcio y tres lavados con agua destilada (Mweetwa *et al.*, 2008; McKendrick, 2000, Billard *et al.* 2014b). Las cajas de Petri se rotulan y sellan en el contorno con una cinta adhesiva y en la base se coloca una cuadrícula (1 cm x 1 cm) de acetato para facilitar el proceso de recuento de las semillas germinadas en 3 cuadros por caja. La germinación se evalúa a partir de los 10 días y durante un mes aproximadamente –dos o tres veces– según las especies, realizando observaciones bajo lupa binocular de cada caja y contando los distintos estados de desarrollo según las etapas establecidas por (Mitchell, 1989): Etapa 1: crecimiento del embrión (protocormo) y ruptura de testa; Etapa 2: desarrollo del protocormo y aparición de rizoides; Etapa 3: crecimiento rápido del protocormo y desarrollo de una yema apical y Etapa 4: aparición de hojas y el desarrollo de raíces

**Desinfección, siembra y repique de explantos**

Se seleccionaron órganos de reserva de plantas cultivadas en invernáculo, se procedió a su desinfección y obtención de segmentos por cortes transversales clasificándolos en zona basal, media y apical. Se los desinfectó y sembró en medio de cultivo semisólido.

Se trabajó con secciones de pseudobulbos y brotes axilares de plantas cultivadas en invernáculo. Se lavaron y secaron primero con agua jabonosa, luego se desinfectó con hipoclorito de sodio para poder ser sembrados en condiciones de asepsia.

A partir de material cultivado en condiciones de asepsia se procedió a seleccionar segmentos nodales los que fueron llevados a diferentes medios de cultivo, uno de ellos con la auxina IBA (ácido indol butírico) con el objetivo de favorecer el desarrollo de raíces. En otra experiencia se partió de ápices vegetativos los que fueron repicados a medios de cultivo suplementado con las auxinas ácido indol butírico y ácido naftalen acético.

De manera periódica se realizan repiques de los explantos sembrados para asegurar la correcta asimilación de los nutrientes provistos por los medios de cultivo. En esta etapa se puede utilizar el mismo

medio de cultivo fresco o cambiar alguno de sus componentes (por ejemplo agregado de fertilizantes comerciales) teniendo en cuenta la etapa de desarrollo en que se encuentre el explanto.

De acuerdo al tipo de crecimiento de las plantas se debe seleccionar el recipiente adecuado, por ejemplo para *Trichocentrum jonesianum*, una vez obtenida la plántula completa a partir de semillas se los repicó a tubos que contenían medio de cultivo semisólido inclinado (pico de flauta) para favorecer el desarrollo de las hojas que naturalmente crecen hacia abajo.

Según el tiempo en que permanecerán las plantas en el mismo recipiente (previo a la etapa de aclimatación) es la cantidad de medio que se coloca en los recipientes de vidrio.

### **Ensayos de aclimatación**

La aclimatación de plantas cultivadas “in vitro” es la última fase del proceso de micropropagación y es considerada una etapa crítica donde se determina la sobrevivencia y establecimiento de plántulas (Lesar *et al.*, 2012). Es una etapa crítica ya que implica cambios drásticos en la condición de cultivo para las plantas, la cual puede provocar estrés y muerte. Durante el cultivo “in vitro” las plantas presentan un crecimiento anormal con cambios de tipo morfológico, anatómico y fisiológico (Cañal *et al.*, 2001).

Se procedió a probar diferentes técnicas y sustratos para el cultivo de orquídeas, con el fin de favorecer el proceso de aclimatación y establecimiento de las plantas. Gran parte de la bibliografía sobre aclimatación de orquídeas está basada en la utilización de distintos tipos y mezclas de sustratos inertes, condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (Vidoz *et al.* 1999; Tadeu de Faria *et al.*, 2001; Deb e Imchen, 2010; Francisco Nava *et al.*, 2011). El proceso debe hacerse en forma gradual y tarda alrededor de dos a tres meses para que las plantitas puedan aclimatarse en condiciones de invernáculo.

Las plantas provenientes de distintos ensayos con tiempos variables de cultivo “in vitro”, son retiradas con pinzas de los frascos de cultivo y se lavan cuidadosamente con agua destilada para separar los restos de medio de cultivo que pudieran permanecer adheridos a las mismas. Luego se toman medidas del número y longitud de hojas y raíces y se fotografían. Posteriormente, en algunos casos se aplicó fungicida (Carbendazim) mediante inmersión de las plantitas o bien a posteriori con pulverizador manual. Luego las plantas se acondicionan en vasos de Tergopor® (6 cm diámetro x 10 cm alto) conteniendo la mitad de su volumen cubierto con sustrato de piedra negra partida, humedecido a saturación y colocados en una bolsa plástica atada en su extremo para formar un efecto de cámara húmeda evitando el estrés de las plantitas. En otros casos las plantas se colocaron en macetas plásticas pequeñas con lecho de musgo de Sphagnum y envueltos como en el caso anterior (cámara húmeda), permaneciendo en estas condiciones por 48-72 h en laboratorio. Concluida esta primera etapa de aclimatación las plantas de especies de hábitat epífita, se montan en palos pequeños de 1 a 2 cm de diámetro y 15 cm de longitud (usando especies de bignonia, eucaliptus, roble, pino, según disponibilidad). Las plantas montadas en palo se colocan en una bandeja amplia, con 1 cm de agua en la base y se tapan con un nylon, para lograr una cámara húmeda, la cual no es del todo cerrada, ya que por los costados se permite intercambio de aire. En estas condiciones de laboratorio con luz natural difusa se mantienen durante 4 a 7 días y luego se llevan a un umbráculo en el invernáculo, donde permanecen otra semana o 10 días, para luego ser colocadas sobre una pared sombreada del invernáculo.

Para algunas especies (*Trichocentrum jonesianum*, *Cattleya* híbrida) se procedió de manera particular para el montaje en palo disponiendo los mismos en un plano de 45° con un soporte de alambre en ambos extremos para lograr esa inclinación. En los otros casos los palos son colocados en posición vertical.

Para el caso de orquídeas terrestres se realiza el mismo procedimiento, pero en vez de ser montadas en palos, se acondicionan en bandejas multicelda o en macetitas de plástico con diferentes sustratos comerciales o mezclas preparadas, a base principalmente de corteza de pino, musgo de Sphagnum y cascara de arroz. También permanecen en condiciones de laboratorio los primeros días y luego se

llevan a invernáculo, se riegan una o dos veces al día y son pulverizadas con fertilizantes comerciales (20-20-20) una vez por mes y se controla la presencia de plagas y de babosas.

Para cada ensayo se lleva un control de supervivencia de plantas en invernáculo a partir del número inicial de plantas y del registro periódico (30-45 días) de plantas muertas. Se calcula el porcentaje de supervivencia en cada fecha y se grafica su evolución en el tiempo. Se efectúan también registros fotográficos y evaluaciones del crecimiento y estado de desarrollo de las plantas.

## Síntesis de Resultados

### ***Colección de referencia y Banco de Germoplasma de Orquídeas (BGO)***

En la Tabla 1, se presenta la evolución anual de indicadores del BGO y la colección de referencia. Dado el pequeño tamaño del material biológico con que se trabaja, se requiere meticulosidad, orden, diseño y organización para lograr el mantenimiento del BGO y sus bases de datos actualizadas y consistentes. Todos los ensayos de laboratorio basan su identidad en función del ID del Catálogo de accesión de muestras, el cual se mantiene en forma inequívoca y no repetitiva, aunque se cuente con ingresos de varias muestras de la misma especie en distintos tiempos. El método de trabajo empleado para la organización y funcionamiento del BGO ha sido comunicado en dos reuniones científicas (De La Cruz y Lallana, 2012; Shimpf y Lallana, 2013a). Las semillas de orquídeas existentes en el BGO a agosto de 2014 se listan en la Tabla 2.

**TABLA 1.** Evolución anual de algunos indicadores del Banco de Germoplasma de semillas de orquídeas de la FCA-UNER

Nº	Denominación	2010	2011	2012	2013	2014	Total
1	Catálogo de accesión	80	130	224	251	287	<b>287</b>
1.1	Semillas de especies sin repetir		27	53	63	59	59
1.2	Semillas de Híbridos		15	36	44	50	<b>50</b>
1.3	Semillas						
1.3.1.	Dimensiones físicas				6	10	<b>10</b>
1.3.2.	Microfotografías			16	22	26	<b>26</b>
2	Colección de referencia		32	45	50	54	<b>54</b>

Durante los años 2013 y 2014 se realizaron mediciones y descripciones de caracteres morfométricos de semillas de especies epífitas y terrestres de orquídeas nativas de Argentina, disponibles en el BGO. Las especies epífitas estudiadas fueron: *Gomesa bifolia*, *Gomesa bifolia* "Pétalos amarillos", *Gomesa longicornu*, *Gomesa paranaensis*, *Gomesa viperina*, *Oncidium fimbriatum* y las terrestres *Bipinnula pennicillata*, *Chloraea philippii*, *Chloraea membranacea*, *Cyclopogon elatus*. Los resultados de las dimensiones físicas de semillas y embriones se resumen en las Tablas 3 y 4.

**TABLA 2.** Semillas de especies (sin repetir) de orquídeas existentes en el Banco de Germoplasma del PID 2144 a agosto de 2014

N°	Género y especie	Nativa Arg.	N° Muestras
1	<i>Acianthera pubescens</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	si	1
2	<i>Acianthera saundersiana</i> (Rchb. f.) Pridgeon & M.W. Chase	si	1
3	<i>Arundina bambusifolia</i> Lindl.	no	1
4	<i>Bifrenaria aureo-fulva</i> (Hook.) Lindl.	no	2
5	<i>Bifrenaria tetragona</i> (Lindl.) Schltr.	no	1
6	<i>Bipinnula pennicillata</i> (Rchb. f.) Sisternas & Salazar	si	2
7	<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Rchb. f.	no	7
8	<i>Brasiliorchis picta</i> (Hook.) R.B. Singer, S. Koehler & Carnevali	si	1
9	<i>Brassavola tuberculata</i> Hook.	si	3
10	<i>Bulbophyllum rothschildianum</i> (O'Brien) J.J. Sm.	no	2
11	<i>Campylocentrum aromaticum</i> Barb. Rodr.	si	1
12	<i>Cattleya forbesii</i> Lindl.	no	1
13	<i>Cattleya intermedia</i> Graham ex Hook.	no	4
14	<i>Cattleya leopoldii</i> Verschaff. ex Lem. f. <i>caerulea</i> (L.C. Menezes) F. Barros & J.A.N. Bat.	si	1
15	<i>Cattleya nobilior</i> Rchb. F.	no	2
16	<i>Cattleya walkeriana</i> Gardner	no	1
17	<i>Chloraea membranacea</i> Lindl.	si	16
18	<i>Chloraea philippii</i> Rchb. f.	si	2
19	<i>Cyclopogon elatus</i> (Sw.) Schltr.	si	4
20	<i>Cyrtopodium palmifrons</i> Rchb. F. & Warm.	si	1
21	<i>Dendrobium kingianum</i> Bidwill ex Lindl.	no	2
22	<i>Dendrobium kingianum</i> var. <i>Alba</i>	no	1
23	<i>Encyclia argentinensis</i> (R. Speg.) Hoehne	si	1
24	<i>Epidendrum campaccii</i> Hágsater & L. Sánchez	no	2
25	<i>Epidendrum ibaguense</i> Kunth	no	9
26	<i>Epidendrum paniculatum</i> Ruiz & Pav.	no	1
27	<i>Epidendrum puniceoluteum</i> F. Pinheiro & F. Barros	no	2
28	<i>Epidendrum revolutum</i> Barb. Rodr.	no	1
29	<i>Epidendrum secundum</i> Jacq. f. <i>albescens</i> (Pabst) F. Barros	no	1
30	<i>Gomesa bifolia</i> (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams	si	29
31	<i>Gomesa flexuosa</i> (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams	si	2
32	<i>Gomesa longicornu</i> (Mutel) M.W. Chase & N.H. Williams	si	2
33	<i>Gomesa paranaensis</i> (Kraenzl.) M.W. Chase & N.H. Williams	si	1
34	<i>Gomesa viperina</i> (Lindl.) M.W. Chase & N.H. Williams	si	1
35	<i>Grandiphyllum pulvinatum</i> (Lindl.) Docha Neto	si	1
36	<i>Isabelia pulchella</i> (Kraenzl.) C. Berg & M.W. Chase	no	1
37	<i>Isochilus linearis</i> (Jacq.) R. Br.	si	2
38	<i>Leptotes unicolor</i> Barb. Rodr.	si	1
39	<i>Microlaelia lundii</i> (Rchb. f. & Warm. ex Rchb. f.) Chiron & V.P. Castro	si	1

La tabla continúa en página siguiente &gt;&gt;&gt;

40	<i>Miltonia flavescens</i> Lindl.	si	2
41	<i>Miltonia regnellii</i> f. <i>alba</i> (Tessmer) Roeth	no	1
42	<i>Myrmecophila tibicinis</i> (Batem.) Rolfe.	no	2
43	<i>Neobenthamia gracilis</i> Rolfe	no	1
44	<i>Oncidium bifolium</i> Sims var. <i>majus</i> Hort	si	2
45	<i>Oncidium croesus</i> Rchb. F	no	1
46	<i>Oncidium fimbriatum</i> Lindl.	si	1
47	<i>Oncidium oblongatum</i>	no	1
48	<i>Papilionanthe teres</i> (Roxb.) Schltr.	no	4
49	<i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay & Sweet	si	3
50	<i>Prosthechea lineata</i>	no	1
51	<i>Pteroglossa roseoalba</i>	no	1
52	<i>Rhyncholaelia digbyana</i> (Lindl.) Schltr.	no	1
53	<i>Rodriguezia decora</i> (Lem.) Rchb. F.	si	1
54	<i>Skeprostachys paraguayensis</i> (Rchb. f.) Garay	si	1
55	<i>Sophronitis cernua</i> Lindl.	si	2
56	<i>Trichocentrum cebolleta</i> (Jacq.) M.W. Chase & N.H. Williams	si	1
57	<i>Trichocentrum jonesianum</i> (Rchb. f.) M.W. Chase & N.H. Williams	si	2
58	<i>Zygopetalum maxillare</i> Lodd.	si	1
59	<i>Zygopetalum triste</i>	no	1

**TABLA 3.** Largo y ancho de semillas de orquídeas, relación largo ancho (L/A) y cálculo del porcentaje de aire.  
n= número de mediciones

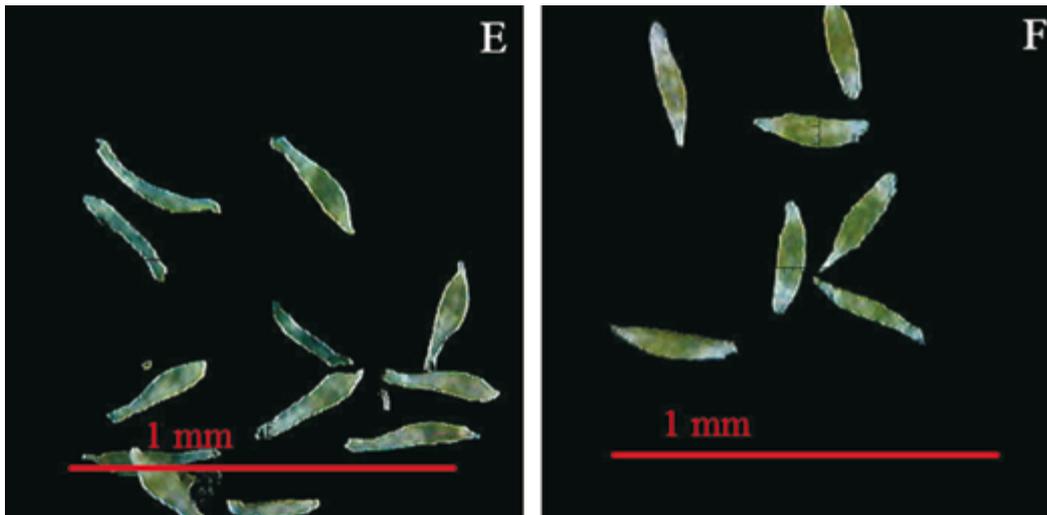
Semilla						
Especie	n	Largo (mm)	Ancho (mm)	L/A	Volumen (mm <sup>3</sup> )	% Aire
<i>Gomesa bifolia</i>	13	0,395	0,071	5,816	0,000544	40
<i>G. bifolia</i> "Pétalos amarillos"	10	0,262	0,064	4,280	0,000296	31
<i>Oncidium fimbriatum</i>	13	0,313	0,072	4,374	0,000426	28
<i>G. longicornu</i>	11	0,328	0,056	5,993	0,000277	46
<i>G. paranaensis</i>	11	0,326	0,073	4,455	0,000472	41
<i>G. viperina</i>	15	0,344	0,072	4,882	0,000467	53
<i>Chloraea philippii</i>	22	0,782	0,226	3,469	0,01042	85
<i>Bipinnula pennicillata</i>	23	0,805	0,124	6,501	0,00323	60
<i>Chloraea membranacea</i>	17	0,395	0,145	2,722	0,00219	42
<i>Cyclopogon elatus</i>	18	0,690	0,091	7,612	0,00148	46

**TABLA 4.** Largo y ancho del embrión de semillas de orquídeas, relación largo ancho (L/A) y relación del volumen de la semilla / volumen del embrión. n= número de mediciones

Embrión						
Especie	n	Largo (mm)	Ancho (mm)	L/A	Volumen (mm <sup>3</sup> )	Vol semilla/vol embrión
<i>Gomesa bifolia</i>	13	0,183	0,057	3,355	0,000331	1,76
<i>G. bifolia</i> "Pétalos amarillos"	10	0,142	0,051	2,920	0,000202	1,53
<i>Oncidium fimbriatum</i>	13	0,164	0,059	2,803	0,000304	1,46
<i>G. longicornu</i>	11	0,125	0,047	2,681	0,000156	2,03
<i>G. paranaensis</i>	11	0,140	0,061	2,310	0,000274	1,74
<i>G. viperina</i>	15	0,130	0,056	2,339	0,000221	2,34
<i>Chloraea philippii</i>	22	0,208	0,117	1,784	0,00149	
<i>Bipinnula pennicillata</i>	23	0,247	0,099	2,486	0,00127	
<i>Chloraea membranacea</i>	17	0,163	0,121	1,342	0,00125	
<i>Cyclopogon elatus</i>	18	0,201	0,086	2,321	0,00079	

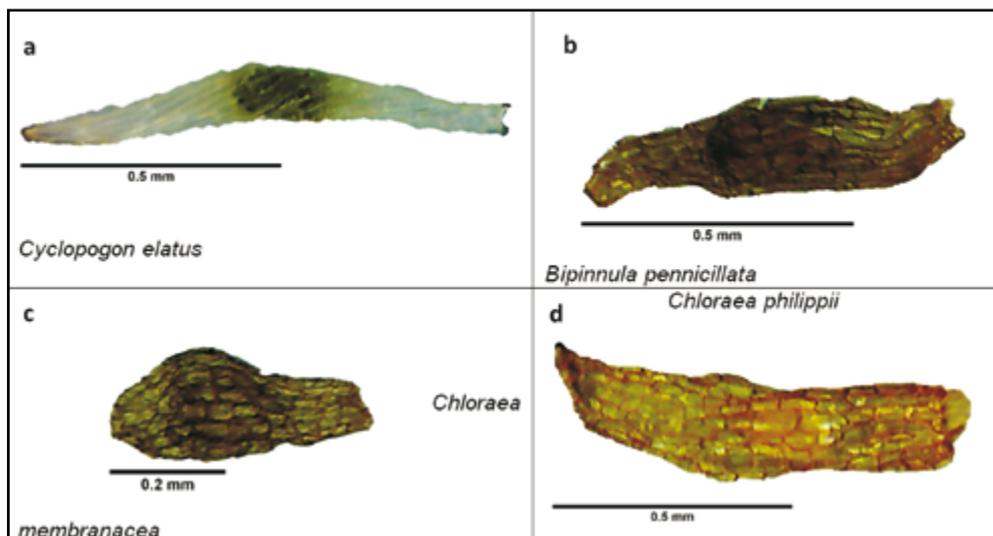
Las semillas de orquídeas son muy pequeñas, extremadamente livianas, y producidas en gran número. Las características de la semilla condicionan su capacidad de dispersión, y por ende el éxito de su supervivencia. El embrión ocupa solo un pequeño espacio dentro de la cubierta seminal, el espacio remanente se encuentra lleno de aire. Como resultado, las semillas pueden permanecer en el aire por largos periodos lo cual facilita su dispersión a varios kilómetros (Arditti y Ghani, 2000). Las semillas de orquídea no poseen ningún tipo de reservas o endosperma, y encierran embriones indiferenciados con una cubierta seminal transparente. La testa y el embrión de diferentes taxones de *Orchidaceae* pueden variar en sus dimensiones, forma, color y en la proporción de sus volúmenes, lo cual puede explicar su capacidad de dispersión (Arditti *et al.*, 1980, Augustine *et al.*, 2001).

Un trabajo realizado sobre 5 especies y una variedad del género *Gomesa* (*Gomesa bifolia*, *G. bifolia* "Pétalos amarillo", *Oncidium fimbriatum*, *G. longicornu*, *G. paranaense* y *G. viperina*), nativas del Litoral Argentino (Shimpf y Lallana, 2013b) indicó que las 5 especies presentan semillas color amarillo claro, los embriones varían entre el verde claro y al amarillo claro. La mayor relación largo/ancho es la de *G. longicornu*, y la menor correspondió a *G. bifolia* "petalos amarillo". El rango de volúmenes fue desde  $5,44 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$  a  $2,77 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$ . El valor más alto correspondió a *G. bifolia* y el menor valor *G. longicornu*. La mayor relación volumen semilla/volumen embrión correspondió a *G. viperina* y el menor a *O. fimbriatum*, y las semillas con la mayor proporción de aire fueron las de *G. viperina*, y con menor proporción *O. fimbriatum* (Figura 4).

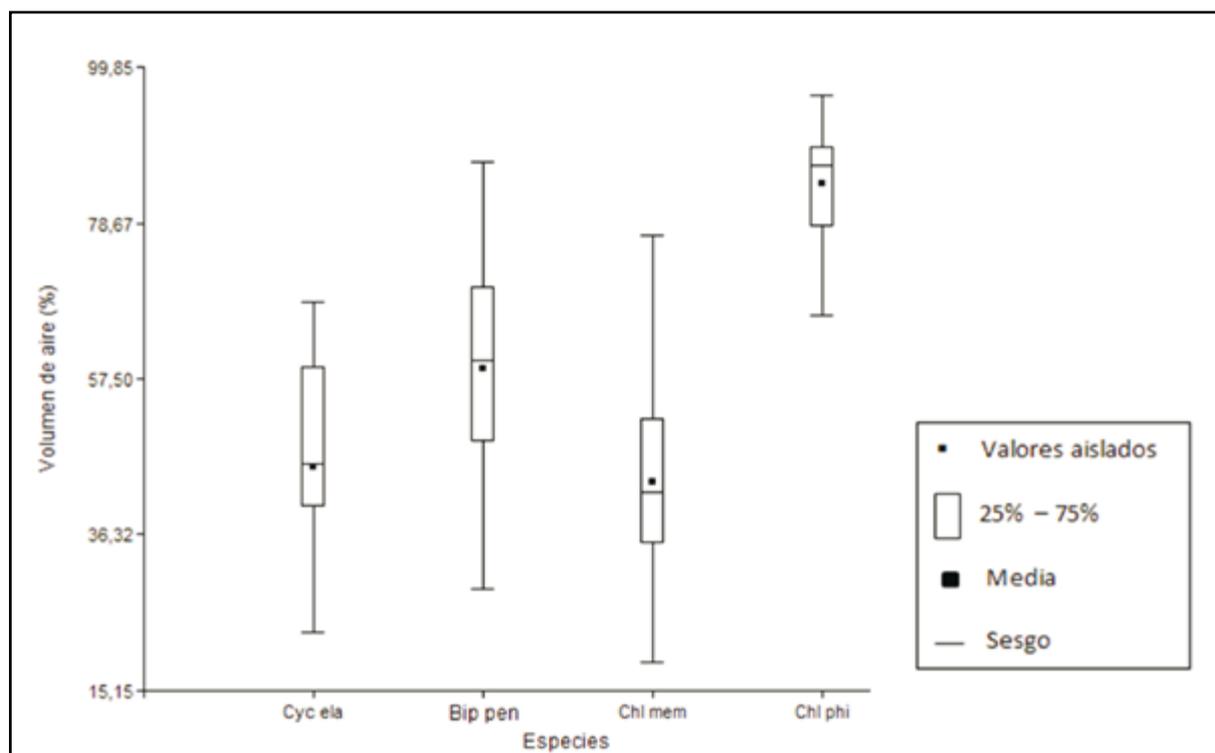


**FIGURA 4.** Microfotografías de semillas de *Gomesa viperina* (E) y *Oncidium fimbriatum*. (F)

A partir de los estudios realizados en las últimas 4 especies de las Tabla 3 y 4, se elaboró un trabajo (Di Persia y Lallana, 2014), enviado recientemente a publicación, donde se encontró que las semillas de cuatro especies de orquídeas terrestres nativas de Argentina presentaron, en general, forma ahusada a levemente ahusada, tanto alargadas como truncadas, con colores del pardo a amarillo y sus volúmenes variaron entre  $0,01 \text{ mm}^3$  (*Chloraea philippii*) y  $0,001 \text{ mm}^3$  (*Cyclopogon elatus*). La estructura de la testa es reticulada para todas las especies, excepto para *C. elatus* siendo ésta estriada. *C. philippii* es la que presentó el mayor porcentaje de aire (85,72%), mientras que *Chloraea membranacea* el menor (42,61%). *C. philippii* presentó el mayor tamaño de semilla y embrión y *C. elatus* los menores. *Bipinnula pennicillata* presentó mayor longitud de semilla y embrión. La presencia de testa reticulada resultó común en tres de las especies analizadas, mientras que *C. elatus* presentó testa estriada (Figura 5). Sus volúmenes varían entre  $0,01 \text{ mm}^3$  y  $0,001 \text{ mm}^3$  (Figura 6).



**FIGURA 5.** Microfotografías de las semillas de orquídeas terrestres (a, b, c y d), donde se observa claramente la posición y tamaño del embrión ocupando la parte central y de color más oscuro de la imagen y la estructura reticulada de la testa en b, c y d



**FIGURA 6.** Representación gráfica de los valores promedios del volumen de aire de las semillas de 4 orquídeas terrestres. Cyc ela: *Cyclopogon elatus*; Bip pen: *Bipinnula pennicillata*; Chi mem: *Chloraea membranacea* y Chi phi: *Chloraea philippii*

### Viabilidad y longevidad

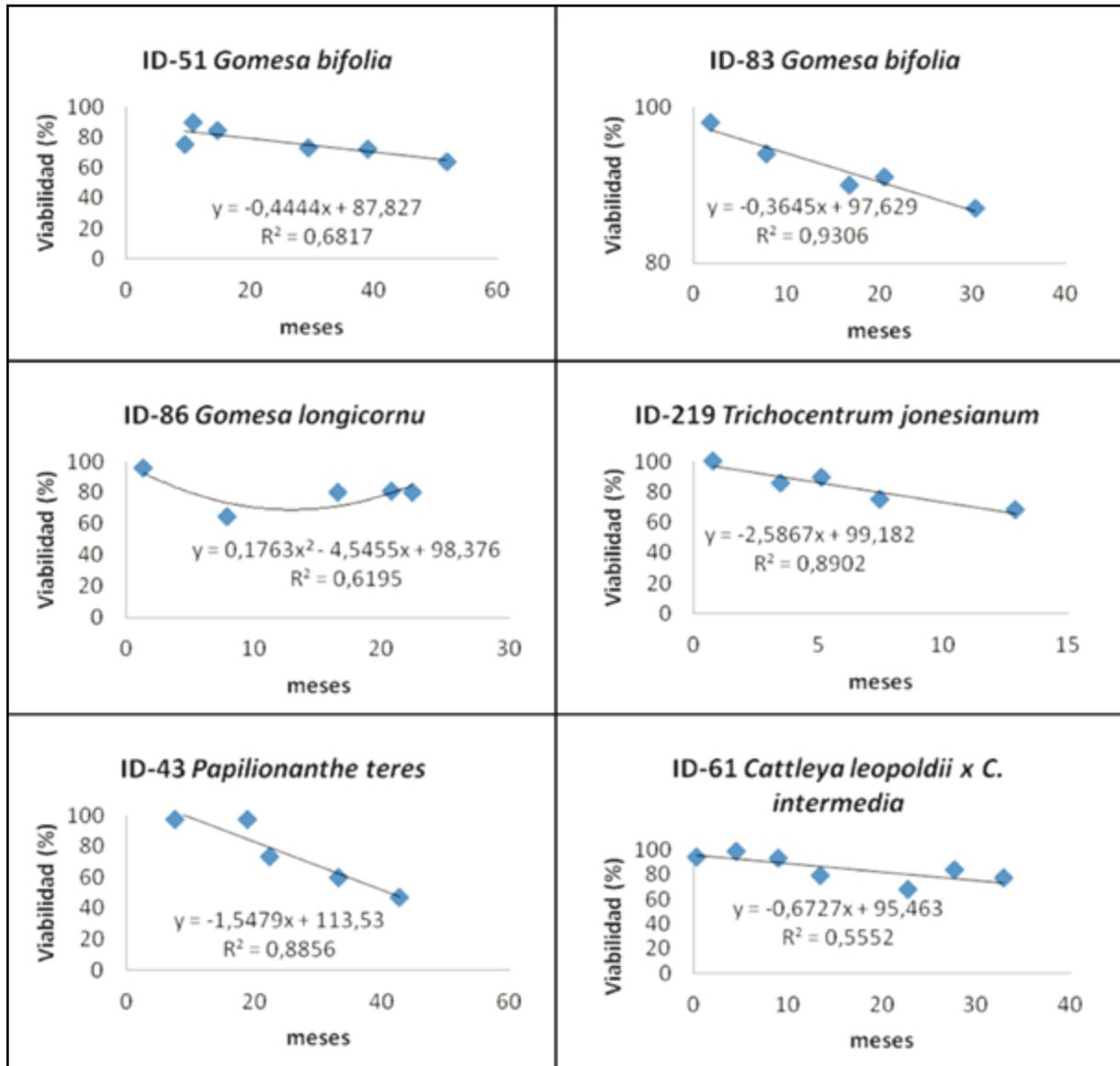
Se trabajó en la elaboración de un protocolo para la prueba de viabilidad de semillas de orquídeas, teniendo en cuenta que las normas ISTA, 2012, no tratan en particular a estas semillas y que de la revisión de trabajos surge que existen marcadas diferencias en la forma que se realizan los ensayos, tiempos de exposición al tetrazolio, concentración de la sal empleada, entre otros. A partir de la experiencia acumulada en la innumerable cantidad de análisis realizados durante el desarrollo del proyecto (37 informes técnicos), se trabajó en la redacción de un protocolo que fue recientemente publicado (García y Lallana, 2014).

Asimismo se inició la evaluación de longevidad de las semillas de algunas especies e híbridos almacenadas en el BGO, de las cuales se disponía de 5 o más ensayos de viabilidad en el tiempo. Las semillas analizadas en este informe pertenecen a un híbrido intergenérico y cinco especies (Tabla 5).

**TABLA 5.** Códigos de identificación (ID) de las semillas almacenadas en el Banco de Germoplasma de Orquídeas de la FCA-UNER

ID	Género y especie
51	<i>Gomesa bifolia</i> (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams
83	<i>G. bifolia</i> pétalos amarillos
86	<i>Gomesa longicornu</i> (Mutel) M.W. Chase & N.H. Williams
219	<i>Trichocentrum jonesianum</i> (Rchb. f.) M.W. Chase & N.H. Williams
43	<i>Papilionanthe teres</i> (Roxb.) Schltr.
61	<i>Cattleya leopoldii</i> x <i>C. intermedia</i> Graham ex Hook.

Para cada muestra se graficó en el tiempo los porcentajes de viabilidad y se calculó la ecuación de ajuste y el coeficiente de regresión (Figura 7). Las muestras del género *Gomesa* (ID 51, 83 y 86) presentan poca pérdida de viabilidad en el tiempo (2 a 15%). En el resto de las muestras los porcentajes de pérdidas entre la situación inicial y final fueron mayores (entre 18 y 51%). La pérdida de viabilidad en la mayoría de las especies estudiadas fue en forma gradual y leve en el tiempo (Figura 7).

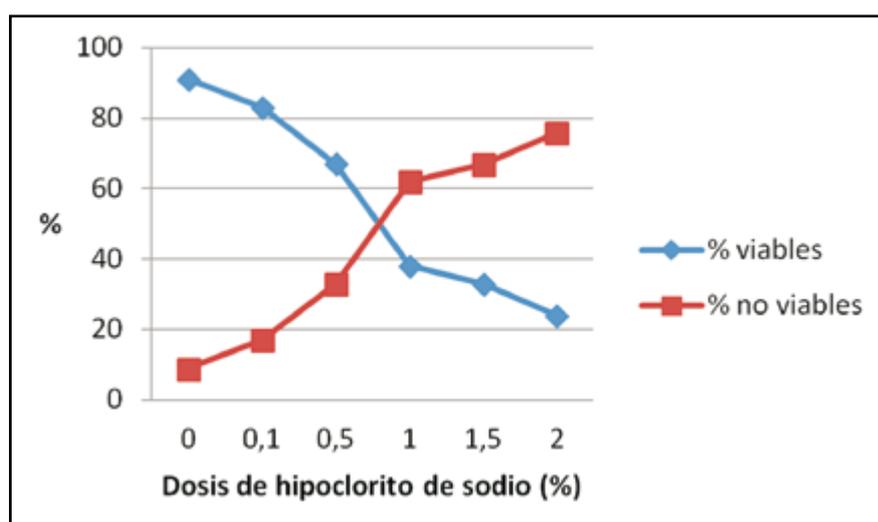


**FIGURA 7.** Curvas de ajuste para la viabilidad (%) en función del tiempo (meses) de almacenamiento en frío de semillas de orquídeas

El método de almacenamiento empleado, sin secado previo, permitió la conservación de las semillas de orquídeas por largos periodos (1 a 4 años) sin grandes pérdidas de viabilidad, siendo de bajo costo y sencillo de implementar.

En numerosos trabajos (Lauzer *et al.*, 1994; Vujanovic *et al.*, 2000; Muñoz y Jiménez, 2008) se cita que muchas veces no hay relación entre los valores de viabilidad determinados por la prueba topográfi-

ca del tetrazolio y los valores de germinación asimbiótica que se obtienen en el laboratorio. Ello puede deberse entre otros motivos a que el proceso de desinfección de las semillas y la posterior prueba de viabilidad, puede afectar a las semillas disminuyendo la cantidad de semillas viables (Salazar-Mercado 2012, Dalzotto *et al.*, 2012, Dalzotto y Lallana 2013a). Este aspecto fue estudiado en particular en *Gomesa bifolia* pétalos amarillos (Dalzotto *et al.* 2013) y se observó que a medida que aumentaba la concentración de hipoclorito de sodio en el proceso de desinfección de las semillas, disminuyó drásticamente el porcentaje de viabilidad (Figura 8). Algo similar se evaluó en *Trichocentrum jonesianum* (Lallana y García, 2013) donde los pretratamientos con hipoclorito de sodio disminuyeron el porcentaje de viabilidad significativamente respecto al testigo.

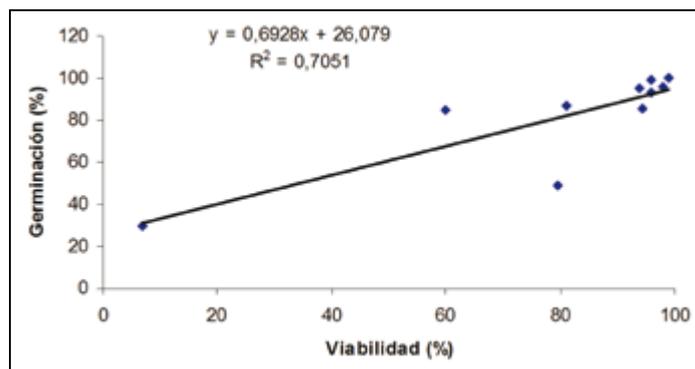


**FIGURA 8.** Evolución del porcentaje (%) de semillas viables y no viables de *Gomesa bifolia* pétalos amarillos en función de la concentración de hipoclorito de sodio usada como solución desinfectante de las semillas

A partir de la recopilación de datos disponibles en el proyecto se elaboró la Tabla 6 y luego se aplicó un análisis de regresión entre los valores del porcentaje de viabilidad y el de germinación (Figura 9).

**TABLA 6.** Valores promedios de viabilidad (V) y germinación (G) expresados en porcentaje de varios ensayos de germinación con su respectiva prueba de viabilidad

ID	Fecha de siembra	Especie / Híbrido	V (%)	G (%)
84	15/03/11	<i>Gomesa bifolia</i> "pétalos amarillo"	98	96
86	15/03/11	<i>Gomesa longicornu</i>	96	99
87	15/03/11	<i>Gomesa bifolium</i> "federal"	99	100
102	19/04/11	<i>Cattleya leopoldii</i>	7	29,5
106	20/09/11	<i>Epidendrum (difformis) campacci</i>	94	95
106	20/09/11	<i>Epidendrum (difformis) campacci</i>	96	93
39	03/11/11	<i>Geoblasta pennicillata</i>	79,6	49
84	01/11/11	<i>Oncidium bifolium</i> "pétalos amarillo"	94,3	85,6
86	19/09/12	<i>Oncidium longicornu</i>	81	86,7
190	27/06/12	<i>Oncidium viperinum</i>	60	84,6



**FIGURA 9.** Ajuste de datos entre el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación de varias muestras de orquídeas (Tabla 6)

Con estos pocos datos y para varias especies se encontró una correlación significativa de  $r=0,84$  entre los porcentajes de viabilidad por tetrazolio y los de germinación. Es de destacar que en estas determinaciones la viabilidad se efectúa sin tratamiento previo de la semilla con desinfectante.

Respecto a las semillas vanas detectadas en varias muestras (años 2011 y 2012) hemos sistematizado la información promedio de los porcentajes de semillas viables, no viables y semillas vanas (Tabla 7). De estos datos surge que a pesar de que las orquídeas producen millones de semillas por fruto, también se detectan valores importantes de semillas vanas (desde 0 a 41,5%) e incluso variaciones entre frutos (ej. *Bipinnula pennicillata* – Tabla 7).

**TABLA 7.** Valores medios del porcentaje de semillas viables y no viables (Fracción Pura) y porcentaje de semillas vanas de varias muestras de semillas de orquídeas sometidas a la prueba de viabilidad por tetrazolium

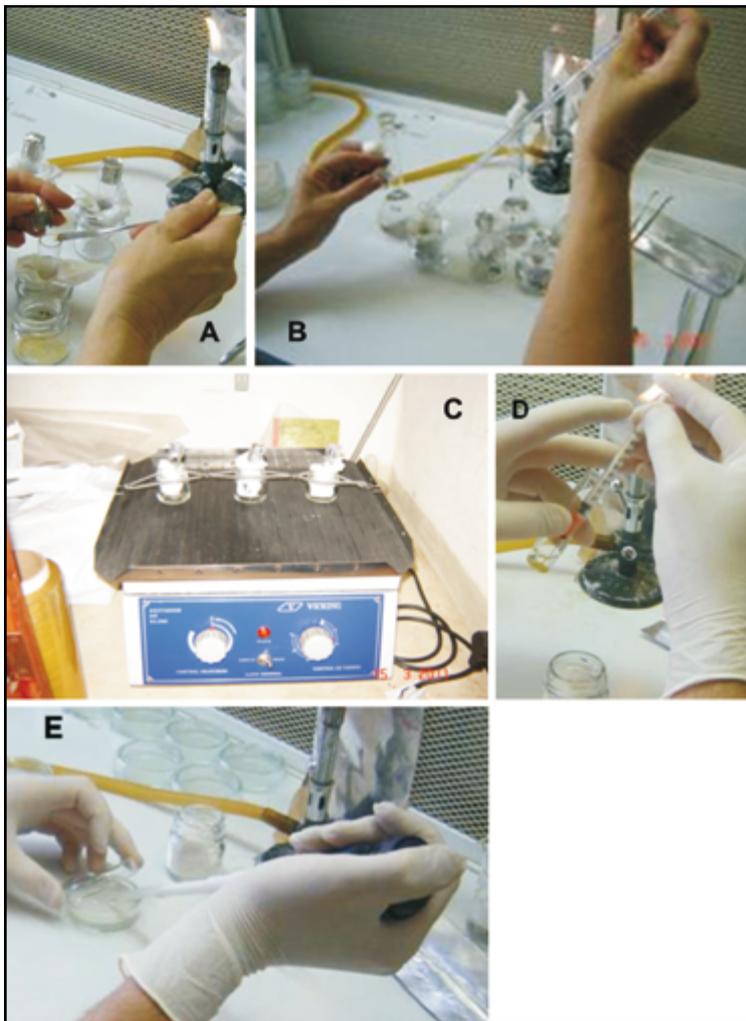
Género y especie	% Viables	% NO viables	% Vanas
<i>Bipinnula pennicillata</i>	64	36	9,4
<i>Gomesa bifolia</i> var. <i>bifolium</i>	39	61	0,9
<i>Bletilla striata</i>	23	77	41,5
<i>C. leopoldii</i> x <i>C. intermedia</i>	70	30	15
<i>C. intermedia</i> vinicolor x <i>C. intermedia</i> Orlatá	23	77	15
<i>L. tenebrosa</i> x <i>L. purpurata</i>	0	100	n/d
<i>Papilionanthe teres</i>	62	38	51
<i>Oncidium bifolium</i>	73	27	2
<i>C. intermedia</i> x <i>C. pão açúcar</i>	97	3	2,5
<i>Gomesa viperina</i>	59	41	33,6
<i>L. tenebrosa</i> x <i>C. intermedia</i>	0	100	n/d
<i>Gomesa bifolia</i> pétalos amarillos	83	17	0,66
<i>C. forbesii</i> x <i>C. pão açúcar</i>	95	5	25
<i>Gomesa longicornu</i>	81	19	8
<i>Gomesa bifolia</i> federal	97	3	0
<i>Isochilus linearis</i>	91	9	0
<i>Bipinnula pennicillata</i> (2012 – Fruto 1)	91	9	13
<i>Bipinnula pennicillata</i> (2012 – Fruto 2)	94	6	33

**Referencias:** C. Cattelya; L. Laelia; n/d, no determinado

**Cultivo “in vitro”**

Los ensayos realizados durante cuatro años totalizan 112, en los cuales se evaluaron 44 especies y 22 híbridos de orquídeas. No todos los ensayos conducen a resultados exitosos y se contabilizan también fracasos debidos a distintas causas: contaminación, no crecimiento o inducción de raíces de partes vegetativas de las plantas, no germinación de semillas, entre otros.

Un aspecto importante que se trabajó intensamente para eficientizar el proceso, fue la desinfección de las semillas, previo a la siembra, ya que se parte de semillas almacenadas en el BGO. Los resultados de estos ensayos han sido publicados en su mayoría (Billard *et al.*, 2013; Dalzotto *et al.*, 2012, Dalzotto y Lallana 2013b; Billard *et al.* 2014b) y además, han permitido establecer protocolos para la desinfección de frutos y semillas de orquídeas (Lamina 1) cuyo procedimiento se detalla a continuación:



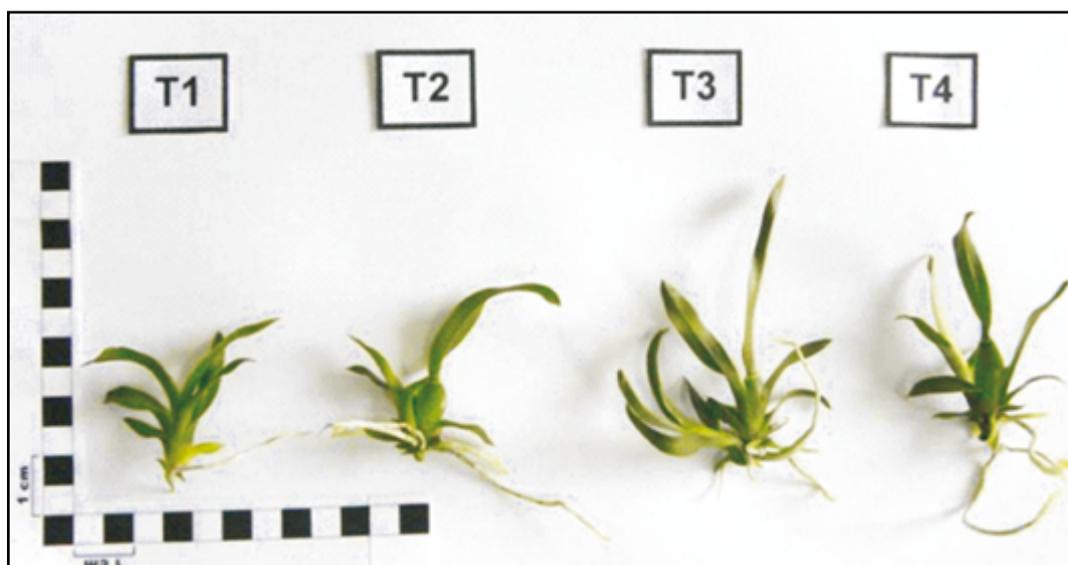
**LÁMINA 1.** Desinfección de semillas de orquídeas y siembra “in vitro”. A) Extracción alícuota de semilla; B) Adición de la solución desinfectante; C) Agitación a 225 rpm; D) Extracción solución desinfectante - enjuague; E) Siembra, 0,1 ml de agua destilada esterilizada con semilla por caja

Este protocolo de esterilización de semillas de orquídeas se basa en el método de desinfección por agitación (Mweetwa *et al.*, 2008) modificado y en el de la jeringuilla con tela de nylon (McKendrick, 2000) modificado.

1. En la cámara de flujo laminar, extraer una alícuota de semillas, con una espátula metálica esterilizada (Lamina 1 A).
2. Colocarlas en un tubo de ensayo (esterilizado) de 7 cm de altura con 4 ml de solución desinfectante (Hipoclorito de Sodio), utilizando jeringa estéril con aguja de 5ml, en una concentración de producto comercial de 0,5%, con el agregado de Tween 20 (0,1%). Posteriormente obturar el tubo con film de PVC y colocarlo en un pequeño envase de vidrio (Lamina 1 B).
3. Colocar el envase con el tubo en un agitador orbital a 225 rpm durante 7 minutos y luego se deja reposar por 8 minutos (Lamina 1 C).
4. En cámara de flujo laminar, utilizar jeringas hipodérmica estéril de 1 ml (tuberculina) con aguja, para extraer la solución desinfectante (Lamina 1 D)
5. Enjuagar 3 veces las semillas con agua destilada esterilizada. Extraer el agua de lavado con jeringa con aguja de 1 ml, pasando entre cada enjuague 3 minutos, los dos primeros enjuague se adicionará 1 ml de agua destilada esterilizada y la extracción se efectuara de la misma manera que como se hizo con la solución desinfectante; mientras que en el último enjuague se adicionará 5 ml de agua destilada esterilizada.
6. Para la siembra, se trabaja con micropipeta de 1 ml, regulada a 0,1 ml (en el visor deberá indicar 010). Tomar la alícuota de agua destilada esterilizada con semillas, esparcirla sobre el medio de cultivo estéril, el cual podrá ser semisólido ó líquido Se tapara cada recipiente (tubos, cajas de petri, frascos). En el caso de utilizar cajas de petri luego del film se colocará su correspondiente tapa de vidrio, posteriormente se la envolverá con film de PVC (Lamina 1 E).
7. Luego llevar a cámara de crecimiento a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C y un fotoperíodo de 16 horas, con luz grow lux.

Para el cultivo de *Bletilla striata* se han probado medios de cultivo líquidos con las sales de M&S a la mitad de la concentración, para la germinación de las semillas, logrando la germinación normal sin problemas de contaminación y en menor tiempo que la germinación en medio semisólido. A partir de estas semillas germinadas en medio liquido se pueden seleccionar plantitas en distinto estados de desarrollo (protocormos con dos hojas) para su repique a medio semisólido (Billard *et al.* 2013).

También se ha ensayado con éxito el uso de fertilizantes comerciales en reemplazo o junto con las sales básicas de M&S para medios de cultivo usados en repiques de plantas de distintas especies. En el caso de *Gomesa bifolia* "federal" (Dalzotto, 2013) concluyó que el medio basal (M&S) suplementado con azúcar refinada y agua de coco junto con el empleo del fertilizante Peter's 20-20-20 o 10-30-20, tienen el mismo efecto sobre el crecimiento de *G. bifolia* "federal", dando como resultado plantas más vigorosas con mayores alturas, número de raíces, peso seco (biomasa aérea, raíces y totales) y porcentaje de plantas con pseudobulbos (Figura 10). Los suplementos utilizados son económicos y de fácil adquisición en el mercado. Se obtuvieron plantas aptas para su trasplante "ex vitro", con buen desarrollo radical y tamaño, logrando una alta supervivencia de plantas, con un bajo porcentaje de muerte o pérdidas por ataque de patógenos (5%).

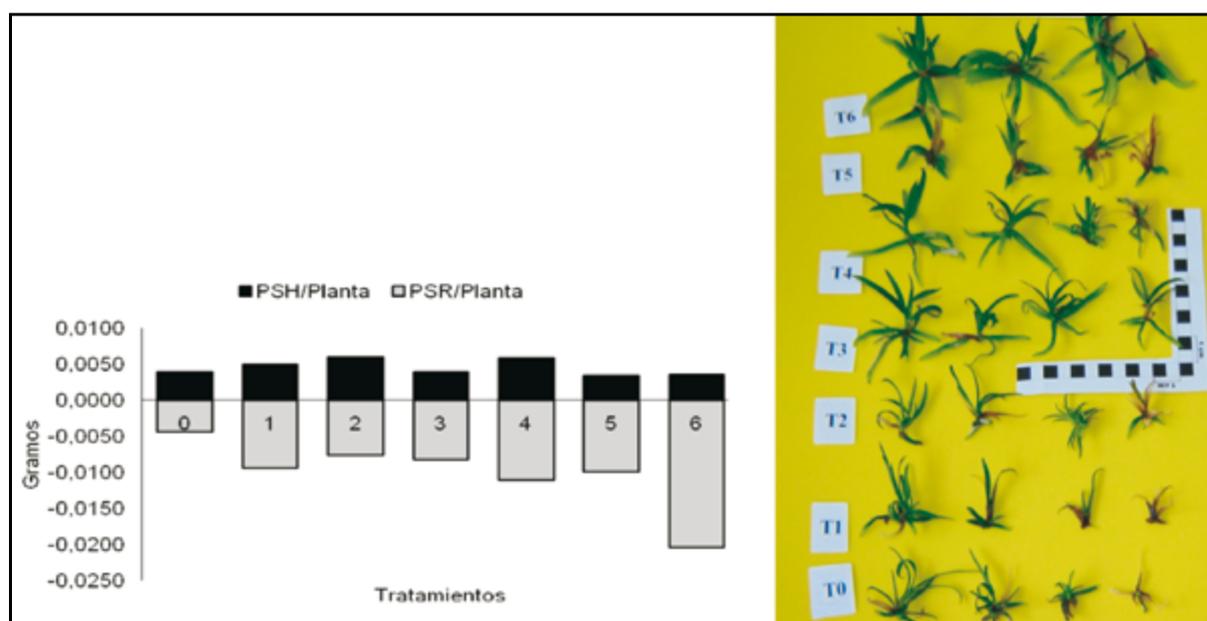


**FIGURA 10.** Plantas de *Gomesa bifolia* "federal" cultivadas "in vitro" a los 95 días después del repique en los diferentes medios de cultivo: T1: MS; T2: MS + agua de coco; T3: MS + agua de coco + fertilizante (20-20-20); T4: MS + agua de coco + fertilizante (10-30-20)

En *Polystachya concreta* (Billard *et al.*, 2014a) emplearon distintas concentraciones y tipos de fertilizantes inorgánicos (Tabla 8), encontrando buena respuesta al crecimiento de las plantas y en particular favoreciendo el crecimiento de la parte radical (Figura 11).

**TABLA 8.** Medios de cultivo empleados para los 6 tratamientos (T) y el testigo (To), utilizando sales básicas de Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa

Componentes	To	T1	T2	T3	T4	T5	T6
MS [ ]	½	completo	1/2	1/2	1/2	--	--
Azúcar refinada(g L <sup>-1</sup> )	15	30	30	15	15	15	15
Peter 20: 20: 20(g L <sup>-1</sup> )	--	--	--	1	--	--	--
Peter 20: 20: 20(g L <sup>-1</sup> )	--	--	--	--	--	1	--
+ Micronutrientes(g L <sup>-1</sup> )	--	--	--	--	--	1	--
Nuquifol *(mL L <sup>-1</sup> )	--	--	--	--	3,5	--	3,5
pH	5,69	5,70	5,72	5,63	6,36	5,65	6,43
Conductividad eléctrica (µS/cm)				3750	3230	1040	771



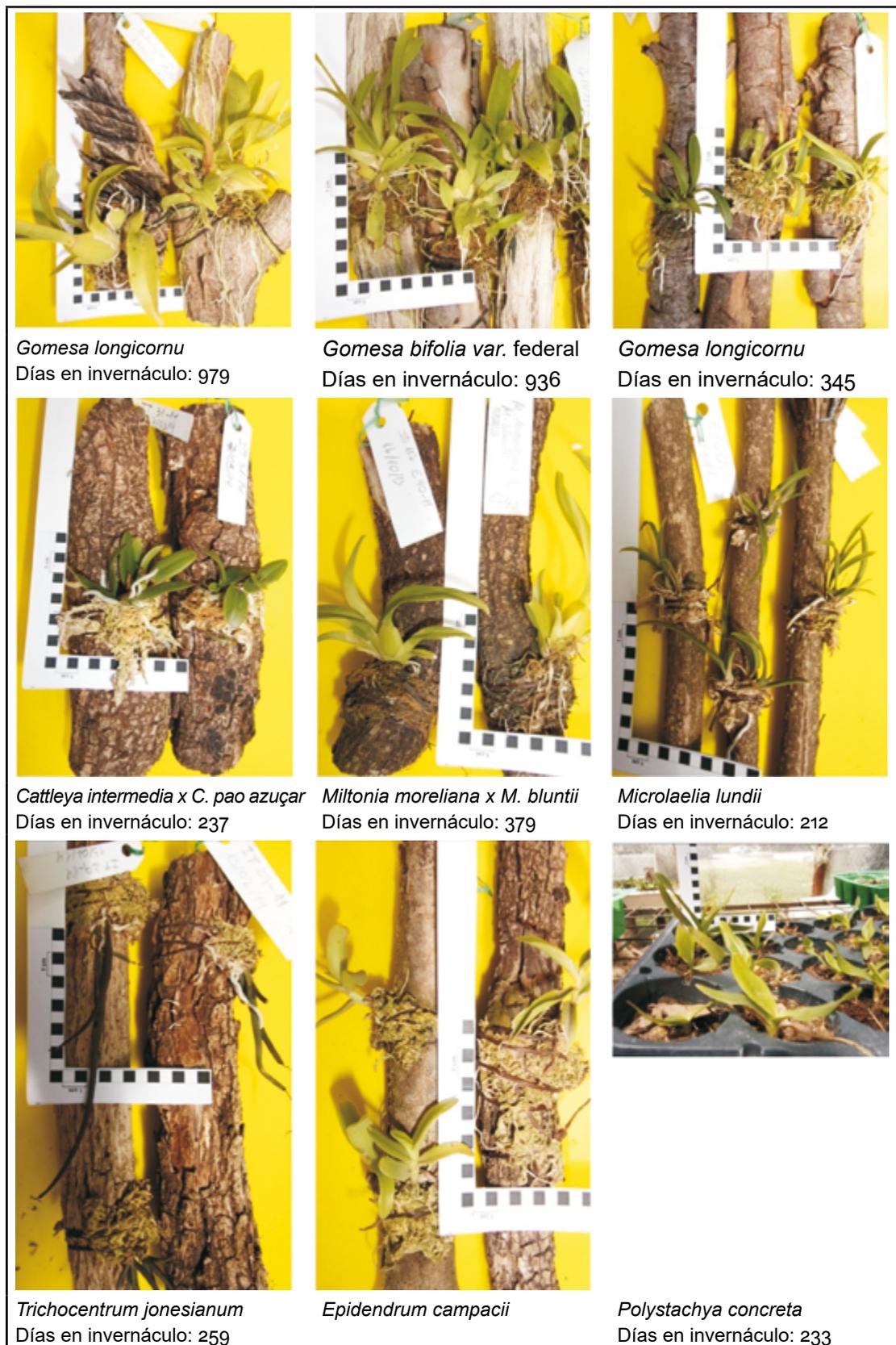
**FIGURA 11.** Fracción peso seco de raíz por planta (PSR) respecto al peso seco de hoja por planta (PSH) a los 53 días de cultivo “in vitro” en siete tratamientos (Ver referencias Tabla 8). T0 (testigo). Los valores negativos deben leerse como positivos. A la derecha estado de desarrollo de las plantas a los 53 días después del repique (574 días de cultivo)

### Aclimatación

En total se realizaron 47 ensayos de aclimatación, de los cuales 11 fracasaron, obteniéndose 0% de supervivencia a los pocos días de haber iniciado los mismos. Las posibles causas de la muerte de las plantas serían: excesos de frío y/o calor, riego insuficiente y en algunos casos ataques de hongos en el cuello de las plantas. Los porcentajes de supervivencia agrupados por especies e híbridos (Tabla 9) muestran que los mayores porcentajes (40-100%) se registraron para los híbridos intragenéricos y algunas especies como *Gomesa bifolia*, *Polystachya concreta*, *Cattleya leopoldii* y *Microlaelia lundii*. En otras especies como un híbrido del género *Dendrobium* y otro de *D.* tipo nobile, *Epidendrum campaccii*, *Bipinnula pennicillata* e *Isochilus linearis* registraron porcentajes de supervivencia entre 0 y 30% a los 100 días de aclimatación. En la Lamina 2 se muestran fotos del estado de desarrollo de las plantas de orquídeas mantenidas en invernáculo de la FCA-UNER.

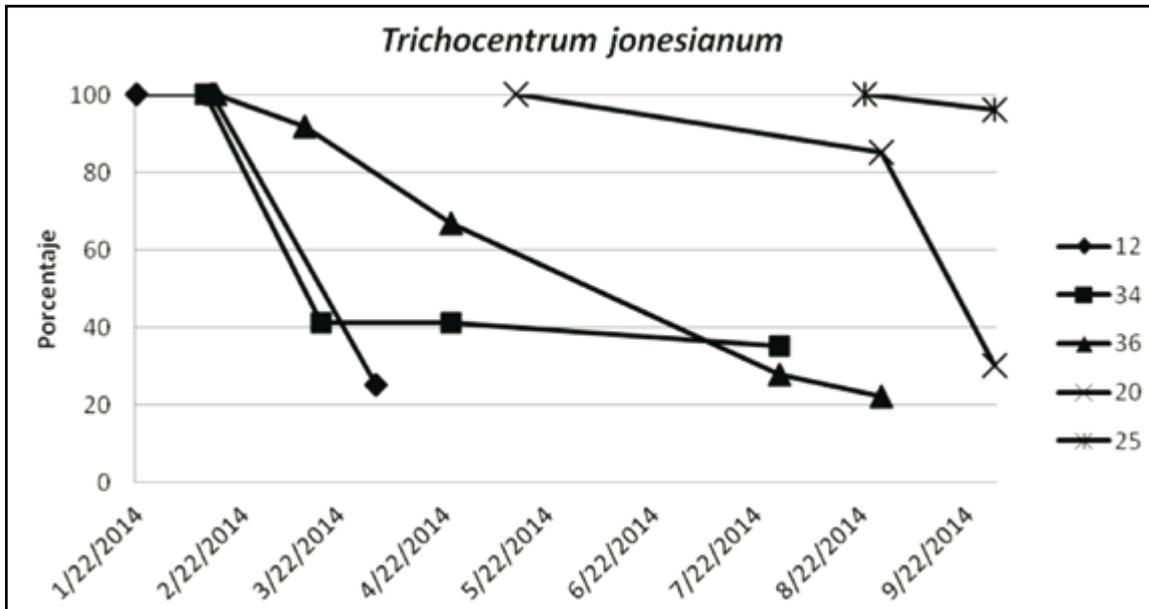
**TABLA 9.** Clasificación de los ensayos de aclimatación, en función de cuatro rangos porcentuales de supervivencia de plantas

Supervivencia	Nº de ensayos	Nº (sin repetir)	
		Especies	Híbridos
0-10 %	13	5	2
11-39 %	11	4	3
40-80 %	11	4	5
81-100%	11	4	2

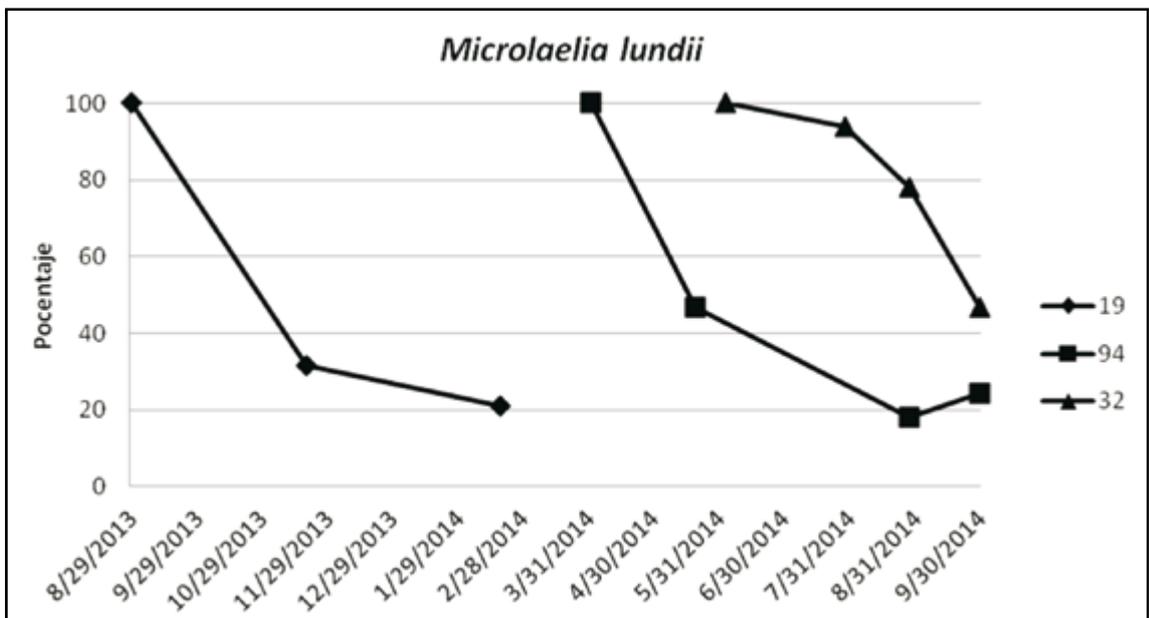


**LÁMINA 2.** Estado de desarrollo de 7 especies y dos híbridos de orquídeas en el invernáculo de la FCA al mes de octubre de 2014. La mayoría de las especies son epifitas

Con la especie *Trichocentrum jonesianum* se efectuaron 5 ensayos de aclimatación con resultados disímiles de supervivencia, entre 22 y 95 % (Lamina 2 y Figura 12). En los ensayos de *Microlaelia lundii* los porcentajes de supervivencia también fueron bajos (21-47%), siendo una especie de crecimiento muy lento y muriendo una cantidad importante de plantas en los primeros 60 días de aclimatación (Lamina 2 y Figura 13).

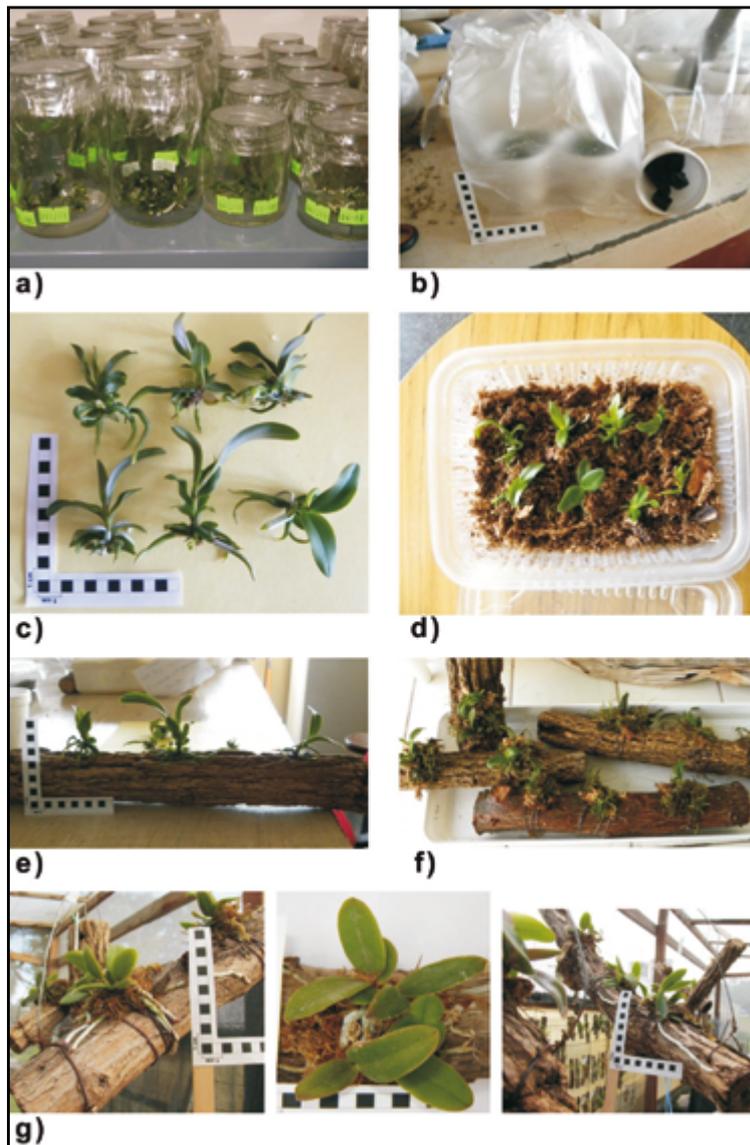


**FIGURA 12.** Supervivencia de plantas de *Trichocentrum jonesianum* en invernáculo, luego del proceso de aclimatación. Los números de las líneas hacen referencia al número inicial de plantas de cada ensayo (100 %)



**FIGURA 13.** Supervivencia de plantas de *Microlaelia lundii* en invernáculo, luego del proceso de aclimatación. Los números de las líneas hacen referencia al número inicial de plantas de cada ensayo (100 %)

Para un híbrido del género *Cattleya* (*C. intermedia* x *C. pao azucar*), se estableció un protocolo (Lamina 3) para el montaje de las plantas en palos (Barsanti y Lallana, 2013), obteniendo un alto porcentaje de sobrevivencia. Se efectuaron 6 ensayos de aclimatación en distintas épocas del año, observando que los ensayos iniciados en junio de 2013 y junio de 2014 hubo una caída significativa en el número de plantas supervivientes (15%), mientras que los ensayos iniciados en los meses primaverales y de verano se logró porcentajes del 70 al 100% de supervivencia.



**LÁMINA 3.** Montaje de plantas de *Cattleya* híbrida en palo y fase final de aclimatación (g). a) Cultivo "in vitro", b) extracción de plantas, desinfección y colocación en vasos de tergopor (paso 2 y 3, del protocolo), c) clasificación de plantas por tamaño (paso 4), d) siembra de plantas chicas, en bandejas con musgo de *Sphagnum*, e) montaje de las plantas con las raíces en íntimo contacto con el palo (paso 5), f) imbibición de las plantas montadas en palos con musgo de *Sphagnum* (paso 6) y g) estado de crecimiento de las plantas y desarrollo del sistema radical firmemente adherido a los palos, a los 300 días (junio de 2013). Las escalas en todos los casos corresponden a 1 cm (cuadro negro + cuadro blanco).

**FUENTE.** Barsanti y Lallana, 2013

## Conclusiones

1) Se logró establecer las bases para la organización y puesta en funcionamiento de un Banco de Germoplasma de Orquídeas (BGO), estableciendo protocolos para el ingreso de frutos, cosecha de semillas, almacenamiento y rotulación de las muestras, manteniendo al momento un catálogo de accesión con 287 registros.

2) Los análisis periódicos de viabilidad de semillas almacenadas en el BGO han permitido comprobar que el método de almacenamiento empleado (frío 5 °C), sin secado previo de las muestras, permite la conservación de las semillas por largos períodos (1 a 4 años) sin grandes pérdidas de viabilidad, siendo de bajo costo y sencillo de implementar.

3) El ajuste de la técnica de cultivo “in vitro” en sus distintas etapas, ha permitido la germinación de semillas, multiplicación y desarrollo de ápices vegetativos, crecimiento de plantas completas de 10 especies epífitas y 5 terrestres de orquídeas nativas e híbridos.

4) El proceso de aclimatación de plantas es complejo y delicado y es una etapa crítica de la técnica de la micropropagación. La experiencia alcanzada indica que el grado de dificultad fue mayor para las orquídeas terrestres que para las de hábito epífita. Se desarrolló un protocolo básico de manejo de las plantas para la etapa de transición entre las condiciones de cultivo en cámara de crecimiento y el área de laboratorio (primera etapa de aclimatación). Se desarrollaron protocolos específicos de aclimatación de plantas epífitas.

5) El cultivo “in Vitro” y la posterior aclimatación de plantas ha demostrado que es posible el uso de esta tecnología para producir plantas de orquídeas permitiendo el desarrollo de estrategias de conservación de las especies, evitando la extracción de plantas de su hábitat.

6) La difusión de los resultados del proyecto se logró a través de presentaciones en reuniones científicas, conferencias, charlas técnicas y se publicaron 12 (doce) trabajos de investigación en revistas nacionales e internacionales.

7) Otro aspecto importante ha sido la formación de recursos humanos participando en las distintas etapas del proyecto 2 (dos) becarios de iniciación en la investigación de la UNER y 3 (tres) becarios de estímulo a las vocaciones científicas del Consejo Interuniversitario Nacional.

Los resultados y conclusiones aquí presentadas alientan a continuar esta línea de investigación, manteniendo y ampliando el Banco de Germoplasma de Orquídeas con especies nativas de la región litoral, los estudios de longevidad y viabilidad de semillas, la micropropagación de especies y los ajustes metodológicos necesarios para eficientizar el proceso de aclimatación de plantas. Producto de ello se ha presentado un nuevo proyecto de investigación en agosto de 2014 bajo el título “**Banco de Germoplasma de orquídeas nativas de la región litoral**” el cual fue aprobado en la última reunión de diciembre de 2014 por el Consejo Superior de la UNER y comenzará su ejecución durante 2015.

## Indicadores de producción

### Presentaciones en congresos y reuniones científicas: 22 (veintidós)

Nacionales: 18

Internacionales: 4

### Publicaciones científicas con referato: 12 (doce)

Nacionales: 7 (Lallana, *et al.* 2010; Lallana, 2012; Lallana y García, 2012; Dalzoto, 2013; Dalzoto y Lallana, 2013b; García y Lallana, 2014, Billard *et al.*, 2014a)

Internacionales: 5 (Billard *et al.*, 2013; Lallana y Garcia, 2013; Dalzotto *et al.*; 2013; Dalzotto y Lallana, 2013a; Billard *et al.*, 2014b)

**Trabajos enviados a publicar en 2014:** 2 (dos)

**Trabajos Finales de Graduación** (Tesis de grado) en el marco del PID 2144: 1 (uno) terminado y otro en ejecución.

**Acciones de transferencia**

Año 2010: 3 conferencias (Rosario, Paraná y Concordia)

Año 2011: 3 disertaciones (Paraná, Crespo, E.Ríos) y un curso de capacitación en la ciudad de Crespo, Entre Ríos

Año 2012: 2 conferencias (Montecarlos, Misiones; Paraná), una disertación técnica (Paraná) y una publicación de divulgación

Año 2013: 1 curso y visita guiada al laboratorio de cultivo de tejidos (Oro Verde, Paraná), dos conferencias (Paraná, Santa Fe) y una disertación técnica.

**Bibliografía**

- APO. (2007). Business Potencial for Agricultural Biotechnology. Assian Productivity Organization. Multi-country Study Mission on the Business Potencial for Agricultural Biotechnology Products. 22-28 May 2005. Republic of China. 198 pp.
- ARDITTI J.; GHANI A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110 Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. Malaysia. *REVIEW New Phytol.* 145: 367-421
- ARDITTI, J. (1979). Aspects of the physiology of orchids. *Adv Bot Res* 7: 241-665.
- ARDITTI, J.; MICHAUD J. D.; HEALEY P. L. (1980). Morphometry of orchid seeds. II. Native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera*, *Corallorhiza* and *Epipactis*. *Amer. J. Bot.* 67: 347-365.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. (1993). In: J. Wiley (ed.). Micropropagation of Orchids. *John Wiley & Sons*, New York. 640 pp.
- AUGUSTINE, J.; YOGENDRAKUMAR; SHARMA J. (2001). Orchids of India-II. Biodiversity and status of *Bulbophyllum*. Thou Daya publishing house, Trinagar, New Delhi. 99 pp.
- BARSANTI, M.V.; LALLANA, V.H. (2013). Cultivo in-vitro y aclimatación de plantas de un híbrido del género *Cattleya* (Orchidaceae). XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores. AUGM. Corrientes, Argentina. 14 al 16 de octubre de 2013. Libro de resúmenes. Volumen II, p. 1053-1054.
- BILLARD, C.; BARSANTI, V.; LALLANA, V.H. (2014a). Cultivo "in vitro" y aclimatación de plantas de *Polystachya concreta* (Orchidaceae). *Revista FABICIB* 18:95-106
- BILLARD, C. E.; DALZOTTO, C. A.; LALLANA, V.H. (2013). Germinación de *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. en medio líquido y evolución de plantas en medio semisólido. *Revista de Investigaciones Agrícolas, UNA. Investig. Agr.* 15(1):1-8.
- BILLARD, C. E.; DALZOTTO, C. A.; LALLANA, V.H. (2014b). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, 38:69-81.
- BONOMO, M.L.C.; VACCA MOLINA, M. (2006). Influencia de reguladores de crecimiento sobre la propagación *in vitro* de *Encyclia oncidíoides* (Lindl.) Schltr. (Orchidaceae). XXIII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. 28 al 30 de septiembre de 2006. Tafí del Valle, Tucumán. Argentina.
- CAÑAL, M.J. RODRÍGUEZ, R.; FERNÁNDEZ, B. SÁNCHEZ-TAMES, R.; MAJADA, J.P. (2001). Fisiología del cultivo "in vitro". *Biotecnología vegetal* 1:3-9.
- CARBÓ, M. DEL C.; BARNI, M.A. (2002). Listado tentativo de las Orchidaceae de la Provincia de Salta, Argentina. 12 p. [on line] [[www.regiondelasflores.com.ar/Trabajospdf/carbo1.pdf](http://www.regiondelasflores.com.ar/Trabajospdf/carbo1.pdf)]

- CHRISPEELS, M.J.; SADAVA, D.E. (2002). Plants, genes and crop biotechnology. 2nd. Ed. American Society of Plant Biologists and ASPB Education Foundation. Boston, 562 pp..
- Cocucci, A. (2002). Mecanismos de polinización de orquídeas nativas de Argentina. Publicación digital de la Sociedad de Orquidología y Conservación, Montecarlo. Misiones, Argentina. [www.unc.edu.ar/cpi/Mem2002.doc](http://www.unc.edu.ar/cpi/Mem2002.doc)
- DALZOTTO, C. A.; LALLANA, V.H. (2013a). Tiempos de desinfección con hipoclorito de sodio para la siembra "in vitro" de semillas de *Oncidium longicornu* Mutel. I Congreso Brasileiro de Producción de Orquídeas. Fortaleza, Brasil. 05 al 10 de marzo de 2013. Resumen expandido. p. 67-69. Edición CD-ROM.
- DALZOTTO, C.A.; BILLARD, C.E.; LALLANA, V.H. (2012). Evaluación de dos métodos de desinfección de semillas de orquídeas para la siembra "in vitro". XX Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM. Curitiba, Brasil. 5 al 8 de octubre de 2012.
- DALZOTTO, C.A.; GARCÍA, L.F.; LALLANA, V.H. (2013). Efecto del pretratamiento con hipoclorito de sodio en la prueba de viabilidad de semillas de *Oncidium bifolium* Sims. I Congreso Brasileiro de Producción de Orquídeas. Fortaleza, Brasil. 05 al 10 de marzo de 2013. Resumen expandido. p. 42-44. Edición CD-ROM
- DALZOTTO, C. A. (2013). Efectos de medios de cultivos en el crecimiento in vitro de *Oncidium bifolium* Sims. "federal". *Rev. Cient. Agropecu.* 17(1-2): 7-15.
- DALZOTTO, C. A; LALLANA, V.H. (2013b). Viabilidad, germinación asimbiótica y vigor de tres especies de orquídeas nativas. *Rev. Cient. Agropecu.* 17(1-2): 39-49.
- DALZOTTO, C. A.; BILLARD, C. E.; BARSANTI, V. M.; LALLANA, V. H. (2015). Germinación, cultivo in vitro y aclimatación de *Epidendrum campaccii* Hágsater & L. Sanchez. II SIMBRAORQ - Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Orquídeas. Câmpus de Jaboticabal, SP. Brasil
- DE LA CRUZ, V.; LALLANA, V.H. (2012). Organización de un banco de germoplasma de semillas de orquídeas. En: 3er. Congreso de Orquideología, Conservación y Bromeliáceas. Montecarlos, Misiones 18, 19, 20, 21 de julio de 2012. Resúmenes, p. 82
- DEB, C.R.; INCHEN, T. (2010). An efficient "in vitro" hardening technique of tissue culture raised plants. *Biotechnology* 9(1):79-83.
- DI PERSIA, J. F.; LALLANA, V. H. (2014). Caracterización morfológica de semillas de cuatro especies de orquídeas terrestres nativas de Argentina. Resúmenes, p. 54. 78º Reunión de Comunicaciones Científicas de la ACNL. Museo Provincial de Ciencias Naturales "Dr. Ángel Gallardo", Rosario, 26 de junio de 2014.
- DRESLER, R.L. (2005). Pieza fundamental entre los libros de orquídeas. IN: Pupulin, F. y colaboradores. Frágil belleza: orquídeas naturales de Costa Rica. Vol 1. *Acianthera a Kegeliela*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 421 pp.
- ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKY, L. (2004). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ed. INTA, Buenos Aires. 446 pp.
- FERREIRA, T.; RASBAND, W. (2011). Imagen J user guide. IJ 1.45 m 152p. Disponible en: [http://imagenj.nih.gov/ij/docs/user guide.pdt](http://imagenj.nih.gov/ij/docs/user%20guide.pdf). (Consulta Agosto 2011).
- FLACHSLAND, E.; TERADA, G.; REY, H.; MROGINSKI, L. (1996). Medios de cultivo para la germinación in vitro de 41 especies de orquídeas. *FACENA*, 12: 93-100.
- FLORES-ESCOBAR, G.; LEGARIA-SOLANO, J.P.; GIL-VÁZQUEZ, I.; COLINAS-LEÓN, M.T. (2008). Propagación *In Vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3):347-353.
- FRANCISCO NAVA, J.J.; JIMÉNEZ-APARICIO, A.R.; DE JESÚS-SÁNCHEZ, A.; ARENAS-OCAMPO, M.L.; VENTURA-ZAPATA, E.; EVANGELISTA-LOZANO, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. F. generadas "in vitro". *Polibotánica* 32: 107-117.

- GARCÍA, L. F.; LALLANA, V.H. (2014). Protocolo para el análisis de viabilidad de semillas de orquídeas con la prueba topográfica por tetrazolio. *Revista Análisis de Semillas* 7 (28):75-78.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA. (2012). International Rules for Seed Testing. Basserdorf, Switzerland 362p.
- INSAURRALDE, I.S.; GONZÁLEZ, A. D. (2002). Listado preliminar de las orquídeas de misiones. 16 p. [online] [[www.regiondelasflores.com.ar/Trabajospd/insaurr1.pdf](http://www.regiondelasflores.com.ar/Trabajospd/insaurr1.pdf)]
- INSAURRALDE, I.S.; RADINS, J.A. (2007). Misiones orquídeas. 1 ed. Goleen Company, Buenos Aires. 192 p.; il.
- JONHSON, A.E. (1992). Listado tentativo de las orquídeas de la Argentina (Abundancia, distribución, conservación). Boletín Técnico Fundación Vida Silvestre Argentina. N° 11.
- JONHSON, A.E. (2001). Las orquídeas del Parque Nacional Iguazú. Ed. L.O.L.A. Buenos Aires, 296 pp.
- KANJILAL, B.; D. DE SARKER; J. MITRA; K. B. DATTA (1999). Stem disc culture: development of a rapid mass propagation method for *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Swartz: an endangered orchid. *Curr. Sci.* 77:497-500.
- KNUDSON, C. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- LALLANA, V.H.; GARCÍA, L.F. (2012). Conservación de semillas de orquídeas y estudio de su viabilidad en el tiempo. *Revista Análisis de Semillas*, 6(23):58-61.
- LALLANA, V.H.; BILLARD, C.E.; KLUG, L.M. (2010). Germinación y desarrollo de plántulas "in vitro" de *Oncidium bifolium* Sims var. *bifolium* (Orchidaceae). Libro de resúmenes, pp. 272-274. En: V Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. Comp. por Claudia Gallardo y Elena Gagliano. 1ra. Ed. – Paraná: Universidad Nacional de Entre Ríos. UNER. 354 pp.
- LALLANA, V. H.; GARCÍA, L.F. (2013). Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). *Revista de Investigaciones Agrícolas, UNA. Investig. Agr.* 15(2):129-132.
- LAUZER, D., M. ST-ARNAUD; D. BARABÉ (1994). Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana* 9: 197-204.
- LESAR, H.; HLEBEC, B.; ČERANIČ, N.; KASTELEC, D.; LUTHAR, Z. (2012). Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under in vitro conditions. *Acta agriculturae Slovenica*, 99 – 1: 69 – 75.
- MC KENDRICK, S. (2000). Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Disponible en [www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf). [Consulta: 01/09/11].
- MITCHELL, R. (1989). Growing hardy orchids from seeds at Kew. *Plantsman* 11: 152-169. En: Verdugo, G, J., Marchant, M. Cisternas, X. Calderón y Peñaloza, P., 2007. Caracterización morfológica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl. (Orchidaceae) usando análisis de imagen. *Gayana Bot.* 64(2): 232-238.
- MUÑOZ, M.; JIMÉNEZ, V.M. (2008). Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. *Lankesteriana* 8(2): 23-31.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- MWEETWA, A.M., WELBAUM, G.E.; TAY, D. (2008). Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on in vitro germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Sci. Hort.*, 117:257-262.
- PENNINGSFELD, F. (1985). Soiless propagation and cultivation of orchids. Possibilities, advantages and disadvantages. *Soiless culture*, 1(1): 55-66.
- PIERIK, R.L.M. (1990). Cultivo in Vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa, España. 326 pp.
- PRETI, E.A.; ZANDONA, A.P.; LOPES DA SILVA, G.; TAKAHASHI, L.S.; JANEIRO NEVES, C.S.V.; TADEU DE FARIA, R. (2013). Tetrazólio no teste de viabilidade de sementes de orquídea *Cattleya loddigesii*. I

- Simposio Brasileiro de Cultivo de Orquídeas, Fortaleza, Brasil. 05 al 10 de marzo de 2013. Resumen expandido. p. 31-33. Edición CD-ROM
- PRITCHARD, H.W. (1990). Modern methods in Orchid conservation. [on line]
- ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. 969 pp.
- ROMERO-TIRADO, R.; LUNA-ROSALES, B.; BARBARA-ALVAREZ, A. (2007). Uso de complejos comerciales como sustituto de componentes del medio de cultivo en la propagación *in Vitro* de *Laelia anceps*. *Lankesteriana*, 7(1-2):353-356.
- SALAZAR-MERCADO, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo "in vitro" de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica*. 61(1), p 69 – 78.
- SCHIMPF, K. M.; LALLANA, V. H. (2013a). Cuantificación de las actividades del banco de semillas de orquídeas FCA-UNER. Resúmenes de ponencias, p. 23. VIII Reunión de Comunicaciones Científicas y VI Reunión de Extensión. Facultad de Ciencias Agrarias. Oro Verde, 11 de junio de 2013
- SCHIMPF, K. M.; LALLANA, V.H. (2013b). Morfometría de semillas de orquídeas de cinco especies del genero *Oncidium* del litoral argentino. XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores. AUGM. Corrientes, Octubre 2013. 6 p.
- SINGH, F. (1981). Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin* 50:416-418.
- TADEU DE FARIA, R; VALLE REGO, L.; BERNARDI, A.; MOLINARI, H. (2001). Performance of different genotypes of Brazilian orchid cultivation in alternatives substrates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol 44:337-342.
- VACIN, E.F.; WENT, F.W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette* 110: 605-613.
- VIDOZ, M.L.; FLASCHSLAND, E.A.; REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. (1999). Comportamiento ex vitro de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de tres híbridos intergenéricos. Comunicaciones Científicas Tecnológicas. UNNE. Vol.5 págs. 13-16.
- VUJANOVIC, V.; ST-ARNAUT, BARABÉ, D.; THIBEAULT, G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colorations and germination. *Ann. Bot.* 86:79-86
- WYSE JACKSON, P.S.; SUTHERLAND, L.A. (2000). Agenda Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos. Organización Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos (BGCI), U.K. [on line] [http://www.bgci.org/files/All/Key\\_Publications/interagendaspan.pdf](http://www.bgci.org/files/All/Key_Publications/interagendaspan.pdf)
- ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. (Eds.) (1999). Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. II Dicotyledoneae. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden Vol. 74. 1269 p.