

Banco de Germoplasma de orquídeas nativas de la región litoral

Lallana, Víctor H.; Billard, Cristina E.; Reinoso, Patricia D.; Martínez, Vanina A.; García, Luz F.

AUTORES: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta Pcial. N° 11 Km 10,5 Oro Verde - Entre Ríos (3100), Argentina.

CONTACTO: victorl@fca.uner.edu.ar

RESUMEN

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 principal del proyecto es consolidar y ampliar un banco de germoplasma de semillas de orquídeas nativas (BGO) con fines a su conservación y propagación por técnicas de cultivo «in vitro». Se evaluará la viabilidad mediante prueba de tetrazolio de las semillas del BGO y longevidad según las condiciones de almacenamiento, realizando pruebas de germinación «in vitro» y posterior propagación, hasta la etapa de aclimatación de plantas en macetas, confeccionando los respectivos protocolos para las especies evaluadas.

Los resultados del proyecto serán transferidos a cultivadores, viveristas, jardines botánicos y público en general, a través de charlas técnicas y cursos de capacitación, lo cual contribuirá a la toma de conciencia en preservación de especies nativas y a la compra de plantas producidas por esta técnica. De igual forma, se vinculará los datos del BGO al Sistema Nacional de Datos Biológicos.

Palabras clave: Recursos genéticos nativos, orquídeas, semillas, longevidad, germinación, micropropagación

Introducción

La familia Orchidaceae, de amplia distribución mundial, comprende alrededor de 880 géneros con 22.075 especies (Stevens, 2001). Orchidaceae constituye claramente una de las familias de plantas más grande y variada (Dresler, 2005). La mayor diversidad está concentrada en las zonas tropicales y subtropicales pudiendo crecer como epifitas, terrestres, lacustres, rupícolas, húmicas y subterráneas (Johnson 1992).

En Argentina, esta familia comprende 91 géneros (<http://www.floraargentina.edu.ar/>) y unas 246 especies nativas (Zuluaga & Morrone 1999). Frueker (2003) eleva la cifra a 280 especies agrupadas en aproximadamente 78 géneros, de los cuales 33 son epifitos con 98 especies, y 45 son terrestres con 163 especies. Se distribuyen desde Tierra del Fuego hasta Misiones y Jujuy; pero la mayor concentración se encuentra en la región subtropical (selva paranaense y de las yungas) donde se halla el 50% de las especies mencionadas (Tabla 1). Algunas especies se consideran amenazadas y con algún riesgo de conservación (Cellini et al., 2009, Frueker, 2003).

Tabla 1. Número de especies de orquídeas de las provincias de la región Litoral (Provincias de Misiones, Chaco, Formosa, Santa fe, Corrientes y Entre Ríos).

| Provincias | N° especies | Relación % |
|------------|-------------|------------|
| Misiones | 161 | 46,80 |
| Corrientes | 82 | 23,83 |
| Chaco | 37 | 10,75 |
| Formosa | 25 | 7,26 |
| Entre Ríos | 19 | 5,52 |
| Santa Fe | 10 | 2,90 |
| Total | 344 | 100 % |

Fuente: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm> de Flora vascular de la República Argentina [Consulta 21/10/15].

Isaurralde y Radins, 2007 en el libro Misiones Orquídeas cita como área de distribución a 11 orquídeas para la provincia de Entre Ríos, mientras que la Flora vascular de la República Argentina eleva el listado a 19 especies (Tabla 2).

Tabla 2. Listado de especies de orquídeas citadas para Entre Ríos, incluido su status y hábitat. Fuente: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm>

| n | especies | status | hábitat |
|-----|---|----------|------------------------|
| 1 | <i>Brachystele camporum</i> (Lindl.) Schltr. | endémica | hierba perenne |
| 2 | <i>Brachystele cyclochila</i> (Kraenzl.) Schltr. | nativa | hierba perenne |
| 3 | <i>Brachystele widgreni</i> (Rchb. f.) Schltr. | nativa | hierba perenne |
| 4* | <i>Brassavola tuberculata</i> Hook. | nativa | hierba epífita perenne |
| 5 | <i>Chloraea bella</i> Hauman | endémica | hierba perenne |
| 6* | <i>Chloraea membranacea</i> Lindl. | endémica | hierba perenne |
| 7 | <i>Cyanaeorchis arundinae</i> (Rchb. f.) Barb. Rodr. | nativa | hierba perenne |
| 8* | <i>Cyclopogon elatus</i> (Sw.) Schltr. | nativa | hierba perenne |
| 9** | <i>Gomesa bifolia</i> (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams | nativa | hierba epífita perenne |
| 10 | <i>Habenaria bractescens</i> Lindl. | nativa | hierba perenne |

| | | | |
|-----|--|----------|--------------------------|
| 11 | <i>Habenaria gourlieana</i> Gillies ex Lindl. | nativa | hierba palustre perenne |
| 12 | <i>Habenaria parviflora</i> Lindl. | endémica | hierba perenne |
| 13 | <i>Habenaria repens</i> Nutt. | nativa | hierba palustre perenne |
| 14 | <i>Habenaria secunda</i> Lindl. | nativa | hierba rupícola perenne |
| 15 | <i>Pachygenium bonariensis</i> (Lindl.) Szlach., R. González & Rutk. | nativa | hierba terrestre perenne |
| 16 | <i>Pelexia lindmanii</i> Kraenzl. | endémica | hierba terrestre perenne |
| 17 | <i>Platythelys platensis</i> (Hauman) Garay | endémica | hierba terrestre perenne |
| 18 | <i>Sacoila lanceolata</i> (Aubl.) Garay | nativa | hierba terrestre perenne |
| 19* | <i>Skeptrostachys paraguayensis</i> (Rchb. f.) Garay | nativa | hierba terrestre perenne |

* Especies presentes en la Colección de Referencia del Proyecto y mantenidas en invernáculo.

** De esta especie se mantienen varios ejemplares (12) de distintas accesiones de la Provincia de Entre Ríos

Las orquídeas constituyen unas de las familias de plantas de mayor demanda entre las ornamentales. La explotación irracional a que han sido sometidas unido a las exigencias medio ambientales de éstas para su reproducción y desarrollo natural, han contribuido a que muchas especies se encuentren amenazadas o en peligro de extinción (Rodríguez *et al.*, 2005).

Para preservar la flora nativa, que es objeto de depredación y de tala de bosques con desaparición de especies, es necesario buscar nuevas formas de propagación. Pierik (1994) ha argumentado que la deforestación de los bosques, la degradación de los ecosistemas montañosos y la contaminación ambiental han conllevado a que algunas especies se encuentren en peligro de extinción y con el menor conocimiento sobre su propagación.

Una de las formas más utilizadas para la propagación de orquídeas (Arditti, 2008) es a través de la propagación sexual simbiótica, y por fragmentos de tallos y pseudobulbos, procesos insuficientes para atender la demanda de producción de nuevas plantas. El cultivo de tejidos es usado para la propagación rápida de orquídeas obteniendo plantas de alta calidad genética y con bajos costos y es empleado industrialmente en Tailandia, Singapur, Malasia, Indonesia y otros países (Arditti y Ernst, 1993). Esta técnica es utilizada por muchos productores de Brasil desde hace más de 20 años (Tardeu de Faria *et al.*, 2006).

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; Kanjilal *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.

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

- El preocupante avance de la agriculturización sobre áreas de montes nativos y selvas ribereñas amenaza la biodiversidad. En tal sentido preocupa la pérdida de especies nativas de interés desde el punto de vista ecológico, agronómico u ornamental.
- Los datos del Banco de Germoplasma de orquídeas (BGO), debidamente sistematizados, serán vinculados al Sistema Nacional de Datos Biológicos (<http://datos.sndb.mincyt.gob.ar>). -Se

deben conocer las especies en estudio en sus aspectos botánicos, ornamentales y agronómicos, además debe(n) ser multiplicada(s) y utilizada(s) acorde al beneficio agronómico y ecológico que puedan dar.

- La transferencia, a través de cursos, charlas técnicas y cartillas, ofrecidas a viveristas, asociaciones de orquidófilos 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.

El objetivo principal del proyecto es consolidar y ampliar un banco de germoplasma de semillas de orquídeas nativas (BGO) con fines a su conservación y propagación por técnicas de cultivo «in vitro». Para ello se propuso:

- Establecer los respectivos protocolos para el manejo eficiente del BGO
- Vincular el BGO al Sistema Nacional de Datos Biológicos de la Argentina
- Eficientizar la producción de protocormos y el establecimiento de plantitas «in vitro» de especies selectas de la región litoral.
- Confeccionar los protocolos de micropropagación y rusticación «ex vitro» para las especies evaluadas.

Como objetivos particulares se propuso:

- Evaluar la viabilidad mediante prueba de tetrazolio de las semillas del BGO y su longevidad según las condiciones de almacenamiento.
- Realizar pruebas de germinación «in vitro» y posterior propagación por técnicas de cultivo «in vitro» de especies nativas argentinas de la región litoral.
- Confeccionar un catálogo de semillas físico y digital, y un formato de página Web accesible por las nuevas plataformas.
- Proveer plantas de orquídeas nativas para su plantación en el Jardín Botánico de Oro Verde y otros Jardines del país.
- 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.
- Difundir las actividades del proyecto mediante conferencias, cursos, a Museos, Jardines Botánicos, Parques nacionales, aficionados al cultivo de orquídeas y público en general.

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 y puestos a disposición del público a través de una página WEB (Orquier, 2017).

Banco de germoplasma de orquídeas (BGO)

Esta es una de las actividades sustantivas del proyecto que, a través de la creación de un Catálogo de Acceso de muestras de semillas de orquídeas, el cual funciona con una base de datos “ad hoc” la cual se actualiza periódicamente y tiene asociados 28 descriptores según se detalla:

TABLA 3. Descriptores del Catálogo de Adcesión de muestras de semillas de orquídeas. Banco de Germoplasma de Orquídeas – FCA

| Nº | Título principal | Descriptor | Tipo de dato |
|----|--------------------------------|-----------------------------|--------------|
| 1 | ID | | Número |
| 2 | ESPECIE | | Texto |
| 3 | HIBRIDO | MADRE | Texto |
| 3 | | PADRE | Texto |
| 5 | | FECHA DE CRUZAMIENTO | dd/mm/aa |
| 6 | HELADERA | CAJA | Texto |
| 7 | | ENVASE | Texto |
| 8 | Nº DEL COLECTOR | | Texto |
| 9 | NOMBRE COLECTOR | | Texto |
| 10 | LUGAR | | Texto |
| 11 | FOTO FRUTO | | Tilde |
| 12 | FECHA DE INGRESO al BGO | | dd/mm/aa |
| 13 | POL. NAT. | | Tilde |
| 14 | POLINIZACION MANUAL | AUTOGAMIA | Tilde |
| 15 | | ALOGAMIA | Tilde |
| 16 | | HIBRIDO | Tilde |
| 17 | Nº FLORES POL. | | Número |
| 18 | Nº FRUTOS COSECHADOS | | Número |
| 19 | FECHA COSECHA FRUTOS | | dd/mm/aa |
| 20 | FECHA COSECHA SEMILLAS | | dd/mm/aa |
| 21 | FOTO VIABILIDAD | | SI/NO |
| 22 | PRUEBA DE VIABILIDAD | UNA | Tilde |
| 23 | | VARIAS | Tilde |
| 24 | | Nº INFORME | Alfanumerico |
| 25 | ENSAYO CVO. IN VITRO | | Tilde |
| 26 | CATÁLOGO FÍSICO | | Tilde |
| 27 | CATÁLOGO DIGITAL | | Tilde |
| 28 | MUESTRA ELIMINADA | | Color |

Durante 2017 se trabajó activamente en el rediseño de la Base de Datos para incluir la misma en el Sistema de Nacional de Datos Biológicos, completando los formularios “ad hoc” y haciendo las consultas correspondientes al administrador nacional, tarea realizada por la Ing. Agr. Patricia D. Reinoso.

Dentro de los objetivos del BGO se encuentra la conservación de las muestras en el tiempo la cual se realiza en frío ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) 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 silica gel para mantener baja la humedad.

Los bancos de semillas proveen un medio para preservar al máximo la diversidad genética en un espacio y costo mínimo (Seaton y Pritchard, 2003). 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.

El procedimiento de la prueba de viabilidad de semillas de orquídeas no figura en las normas ISTA (2012) y se elaboró un protocolo publicado en la Revista Análisis de Semillas (García y Lallana, 2014). 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.

Mediciones y morfología de 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, 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" (10X a 200X). 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. A través de este procedimiento el software establece la escala equivalente en píxeles y cuando se hacen las mediciones transforma los píxeles de la imagen en milímetros, almacenando la información en una tabla de doble entrada, que luego es procesada con una planilla tipo Excel.

Se trabajó intensamente durante 2017 en el registro de mediciones de 30 especies de la región litoral con vistas a la confección de un catálogo de referencia, con fotos propias de principales órganos de la planta, flores, frutos y semillas, con información sobre la especie y todos los datos morfométricos de las semillas.

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 y Flachsland, com. Personal).

La metodología 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 ml 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 ml) según la concentración del medio de cultivo a preparar, se lo suplementa con sacarosa y según los requerimientos, con fertilizante, carbón activado, agar tipo Britania (para medios semisólidos). Se regula su pH (5,6-5,8) y se esteriliza en autoclave durante 20'.

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.* 2014). 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).

Repique de material cultivado «in vitro»

De manera periódica (2 a 3 meses) 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.

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. 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). Para el montaje también se ha desarrollado un protocolo que consiste básicamente en ubicar sobre la superficie del palo las raíces de 1 o 2 plantas, cubrirlas con musgo de Sphagnum y atarlas firmemente con hilo encerado. Cada palo se rotula y se le coloca un gancho de alambre en un extremo.

Las plantas montadas en palo se colocan en una bandeja amplia, en posición inclinado (20°) apoyados en los bordes, 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 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, cascara de arroz o perlita. También permanecen en condiciones de laboratorio los primeros días y luego se llevan a invernáculo con riegos periódicos por aspersión. Las plantas en invernáculo son pulverizadas con fertilizantes comerciales (20-20-20) una vez por mes y se controla la presencia de plagas y de babosas.

Supervivencia de plantas en invernáculo

Para cada ensayo se lleva un control de supervivencia de plantas 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. Los ensayos llevan una identificación correlativa de número y año (eg. **IT 125-17**: Informe técnico número 125 correspondiente al año 2017). Esta información de cada ensayo es cargada en una base de datos tipo Excel que se actualiza periódicamente y calcula automáticamente los porcentajes de supervivencia en función del número inicial de plantas en aclimatación y el número de plantas muertas de cada fecha de observación.

Protocolos

Se ha continuado en forma permanente con la revisión y actualización de los protocolos desarrollados en el marco del proyecto, la mayoría subidos a la página WEB (www.orquier.fca.uner.edu.ar). Estos incluyen aspectos básicos de la preparación de medios de cultivo, manejo y calibración de instrumental del laboratorio, desinfección de frutos y semillas, siembra, esterilización, manejo del Banco de germoplasma, conteo de semillas, montaje de plantas, entre otros.

Las distintas actividades del proyecto conllevan gran número de información que debe ser ordenada y mantenida en base de datos tipo Excel, las cuales son permanente actualizadas. El proyecto mantiene activas 12 base de datos.

Síntesis de resultados

Banco de germoplasma de orquídeas (BGO)

La Tabla 4 resume la información mantenida y actualizada de las bases de datos del proyecto, con un volumen total de datos de 17.888 registros en tres años.

TABLA 4. Base de datos (BD) activas para seguimiento de las actividades, colecciones y banco de germoplasma de semillas de orquídeas, número de descriptores y de registros (Años 2015 a 2017)

| BD principal | BD complementarias | Detalle resumido (*) | N° de descriptores o campos | N° de registros | Volumen de datos |
|-------------------------|--|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Colección de referencia | ---- | 1) | 14 | 76 especies | 1.064 |
| Catalogo de accesión | Muestras eliminadas Lista alfabética Almacenadas en heladera Lista especies sin repetir | 2) | 28 | 95 especies 114 híbridos | 5.852 |

| | | | | | |
|-------------------------|--|-----|-----------------|--|-------------------|
| Frutos | | 3) | -- | 51 fotos digitales | 51 |
| Ensayos de Viabilidad | Informes Técnicos Fotos semillas | 4) | 9 | 16 Inf. Téc. y 71 muestras 44 fotos digitales | 16 639 44 |
| Germinación "in vitro" | | 5) | 10 | 29 Ensayos | 290 |
| Cruzamientos | Híbridos Autogamia Alogamia | 6) | 11 | 82 cruzamientos | 902 |
| Catálogo Físico | | 7) | 4 | 62 especies | 248 |
| Catálogo Digital | | 8) | 26 | 62 especies | 1.612 |
| Ensayos Aclimatación | | 9) | 20 | 106 Ensayos | 2.120 |
| RGIF | Repiques Ensayos en Ejecución Ensayos eliminados | 10) | 10 12 12 | 38 Ensayos 35 Ensayos 266 | 380 420 266 |
| Dimensiones de semillas | Dimensiones físicas Catalogo digital muestras Volumen, relacion L/A,... | 11) | 4 10 | 41 especies 410 fotos digitales 41 especies | 164 410 410 |
| Conteo semillas | | 12) | 100 cuadrículas | 30 especies | 3.000 |

Total de volumen de datos: **17.888**

(*) Detalle resumido del contenido:

- 1) Especies de orquídeas de plantas adultas mantenidas en invernáculo, provenientes de distintos sitios de la Provincia de Entre Ríos.
- 2) Base de datos principal del BGO donde se incorporan las nuevas muestras de semillas de orquídeas.
- 3) Información digital de los frutos cosechados con escala de referencia
- 4) Informes técnicos de los ensayos de viabilidad y fotos digitales de las muestras viables y no viables.
- 5) Datos de ensayos de germinación, recuentos de protocormos
- 6) Listas de cruzamientos (híbridos inter e intraespecíficos), autogamia y alogamia
- 7) Catálogo de semillas montadas en porta y cubreobjetos para observación bajo lupa
- 8) Catálogo digital ordenado por ID (especie) con varias fotos (7 a 15 por especie)
- 9) Registros de los ensayos de aclimatación de plantas y control de supervivencia en invernáculo
- 10) Resumen General de Inventario de frascos que se encuentran en cámara de crecimiento
- 11) Tabla de registro de las medidas de largo y ancho de semilla y embrión y cálculos del volumen de aire, de semilla y embrión. Relación Largo/Ancho.
- 12) Tabla de conteo de 1 mg de semillas de orquídeas, efectuados sobre una cuadrícula (10 x 10)

A diciembre de 2017 el BGO tenía asentados 384 registros (Tabla 5). Actualmente existen 95 especies no repetidas y 114 híbridos. Considerando las bajas, el saldo es de 286 muestras almacenadas en refrigerador (Tabla 5).

TABLA 5. Evolución anual de la base de datos del Banco de Germoplasma de semillas de orquídeas

| Año | Ingresos | Bajas | Saldos acumulados | Especies no repetidas | Híbridos | Total sp. No repetidas + Híbridos |
|------|----------|-------|-------------------|-----------------------|----------|-----------------------------------|
| 2010 | 80 | 52 | 28 | | | |
| 2011 | 130 | 64 | 66 | 27 | 15 | 42 |
| 2012 | 227 | 83 | 144 | 53 | 36 | 89 |
| 2013 | 270 | 83 | 187 | 63 | 44 | 107 |
| 2014 | 304 | 88 | 216 | 73 | 50 | 123 |
| 2015 | 339 | 91 | 248 | 76 | 58 | 134 |
| 2016 | 367 | 98 | 269 | 69 | 93 | 162 |
| 2017 | 384 | 98 | 286 | 95 | 114 | 209 |

Ingresos: total acumulado del número de ID hasta el último registro de la base de datos.

Bajas: total acumulado anual de muestras eliminadas de la base de datos.

Saldos: diferencia entre ingresos y bajas (cantidad neta de muestras en el banco de germoplasma).

Se realizaron las acciones correspondientes para la inscripción del BGO en el Sistema Nacional de Datos Biológicos, inscribiendo el Jardín Botánico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias registrado provisoriamente como centro número 1245 -361, Acrónimo: JBPA y para el banco de germoplasma de semillas de orquídeas el número 1245 -445, Acrónimo: BGO, quedando pendiente la carga de algunos datos formales del responsable institucional, para luego poder dar inicio a la carga de datos.

Vinculado a esta temática durante 2017 se presentaron 3 trabajos en congresos (Sedano *et al.*, 2017; Michel y Lallana, 2017) de los cuales uno salió publicado como resumen expandido (Michel *et al.*, 2017). También se generaron tres nuevos protocolos vinculados a Método de conteo directo de semillas de orquídeas, Conteo de semillas de orquídeas con software ImageJ y Metodología para la medición de caída libre de semillas de orquídeas.

Caída libre de semillas y conteo de 1 mg

A partir de la descripción del dispositivo experimental de Burgeff (1936), detallado en el trabajo de Arditti y Ghani (2000), se montó a principios de 2017 un dispositivo experimental en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNER, para medir la caída libre de semillas de orquídeas.

El equipo de medición de construcción artesanal consta de un tubo de vidrio de borosilicado de 150 cm de longitud y 4 cm de diámetro abierto en ambos extremos y sostenido mediante pinzas en un soporte metálico con dos agarraderas. En la parte inferior se deja una luz de 3 cm (entre el extremo del vidrio y la base plana de madera) por donde caen las semillas determinando el tiempo necesario (segundos) para alcanzar una placa de vidrio (caja de petri de 5 cm de diámetro) con un papel en la base de color contrastante con la semilla en medición. Para el procedimiento de medición se desarrolló un protocolo específico que básicamente consiste en pesar en balanza analítica de precisión 1 mg de semillas de orquídeas sobre papel de aluminio. Luego colocar la muestra con el papel aluminio en una caja de petri de vidrio, taparla y rotular la tapa. Luego un operario vierte el mg de semillas por el extremo superior y otro registra el tiempo con un cronómetro en dos momentos; cuando observa que caen las primeras semillas (aprox. 1/3 a 1/2 del total) expresa "UNO", corta el cronómetro y sigue grabando digitalmente

hasta que finaliza la caída de las semillas “DOS”, y corta el cronometro del tiempo DOS. Esta operación se realiza en tres repeticiones por muestra. Los ensayos preliminares se hicieron con tres especies (Tabla 6) y luego se midieron velocidades de caída en 13 especies más.

TABLA 6. Valores medios y desvío estándar de velocidad de caída libre de semillas (seg/1,5 m) de tres especies nativas de orquídeas (n= 3). Volumen de aire de la semilla (% Aire) y relación largo ancho (Rel. L/A)

| Especie | Tiempo UNO | Tiempo DOS | % Aire | Rel. L/A |
|-----------------------------|------------|------------|--------|----------|
| <i>Miltonia flavescens</i> | 8,48±1,13 | 17,21±0,95 | 93,50 | 10,42 |
| <i>Oncidium bifolium</i> | 7,66±1,09 | 13,15±1,74 | 52,01 | 4,96 |
| <i>Chloraea membranacea</i> | 9,67±0,77 | 17,10±1,72 | 42,77 | 2,83 |

Las semillas con mayor volumen de aire tardan más tiempo en caer (Arditti y Ghani, 2000), si bien se requiere aún realizar un mayor número de ensayos para confirmar esta hipótesis.

Las semillas de orquídeas se caracterizan por ser muy pequeñas, carecer de endosperma y el embrión es inmaduro. Otra característica común de muchas especies de orquídeas es la producción de una altísima cantidad de semillas por cápsula, pero sólo un 5 % germinan en condiciones naturales (Tardeau de Faria, 2006). Una cápsula de *Gomesa bifolia* puede contener 1,7 millones de semillas (Lallana et al. 2010) y una cápsula de *Cycnoches vemtricosum* var. *Chlorochilon* 4 millones de semillas (Arditti, 1961). En otras especies el número de semillas es menor a 100.000 por cápsula (Silva Pereira et al., 2014). La producción de un gran número de semillas por cápsula ha sido descrita como una característica común de plantas que poseen requisitos muy específicos de germinación (Rauh et al., 1975; Rasmussen, 1995).

No obstante que el número de semillas por cápsula puede variar entre especies de la familia, conocer la cantidad de semillas es útil para estudios sobre germinación en condiciones naturales o para la siembra aséptica de semillas (Silva Pereyra et al., 2014).

A partir de las semillas almacenadas en el BGO y de acuerdo a la metodología de conteo propuesta por Lallana (2015) se evaluaron 8 especies y 2 híbridos (Tabla 7) de orquídeas, estableciendo el número de semillas por fruto a partir el peso previo de las semillas. Se puede observar una gran variabilidad entre las especies desde unos pocos miles hasta más de un millón de semillas por fruto.

TABLA 7. Número de semillas por mg, de semillas por fruto y peso medio de semillas en nanogramos, de varias especies de orquídeas.

| ID | Especie | Sem.mg ⁻¹ | Sem.fruto | Peso ng |
|-----|--|----------------------|-----------|---------|
| 352 | <i>Gomesa flexuosa</i> | 14896 | 1.385.328 | 67,13 |
| 353 | <i>Gomesa bifolia</i> | 13025 | 1.055.025 | 76,78 |
| 301 | <i>Brasilorchids picta</i> | 2058 | 143.539 | 485,91 |
| 337 | <i>Cattleya porhyroglossa</i> | 2023 | 1.394.915 | 494,32 |
| 109 | <i>Polystachya concreta</i> | 1949 | 2.729 | 513,08 |
| 274 | <i>Gom_bif x Gom_bif</i> pétalos marrones | 1623 | 15.629 | 616,14 |
| 302 | <i>Chloraea membranacea</i> | 1502 | 31.211 | 665,78 |
| 304 | <i>Oncidium fimbriatum</i> | 1488 | 141.658 | 672,04 |
| 321 | <i>Bletilla striata</i> | 1463 | 138.009 | 683,53 |
| 323 | <i>Oncidium cebolleta</i> | 1326 | 76.942 | 754,15 |
| 277 | <i>Gom_bif</i> CR13 x <i>Gom_bif</i> Pét. amarillo | 836 | 8.694 | 1196,17 |

Viabilidad y longevidad

Periódicamente se efectúan pruebas de viabilidad mediante la prueba de tetrazolio (García y Lallana, 2014) para establecer la longevidad de las semillas almacenadas en frío. Lallana y García (2016), evaluaron la viabilidad de semillas con 2, 3, 4 y 5 años de almacenamiento en frío (5 °C) provenientes del BGO de la FCA-UNER. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

TABLA 8. Resultados de ensayos de viabilidad inicial y final y porcentaje de semillas vanas en 18 especies y 5 híbridos de orquídeas. Los casilleros en blanco indican NO determinado. TA: tiempo de almacenamiento en años, T: hábitat terrestre, E: epífita. Las especies se indican con las tres primeras letras del género y las tres primeras de la especie y están ordenadas de menor a mayor tiempo de almacenamiento (Días VF).

| Especie | TA (años) | Hábitat | Días (VI) | Viabilidad Inicial (%) | % Vanas | Días (VF) | Viabilidad Final (%) | % Vanas |
|-------------------|-----------|---------|-----------|------------------------|---------|-----------|----------------------|---------|
| Onc_fim | <2 | E | | | | 547 | 100 | 0 |
| Pap_ter | <2 | E | 96 | 88 | | 593 | 0 | |
| Bra_spp. | <2 | E | | | | 761 | 0 | |
| Tri_jon | <3 | E | 53 | 97 | 6 | 919 | 99 | 1 |
| Pol_con | <3 | T-E | 270 | 97 | | 954 | 94 | 2 |
| Ble_str | <3 | T | 346 | 92 | 63 | 1093 | 96 | 72 |
| Bra_tub | <4 | E | | | | 1120 | 0 | |
| Gom_bif | <4 | E | 339 | 98 | 2 | 1140 | 62 | |
| Gom_long | <4 | E | 1063 | 99 | 1 | 1140 | 100 | |
| Gom_bif(híbrido) | <4 | E | 339 | 81 | 5 | 1140 | 61 | |
| Cat_nob | <4 | E | 371 | 96 | 14 | 1223 | 98 | |
| Chl_mem | <4 | T | 15 | 16 | 33 | 1231 | 2 | 33 |
| Bip_pen | <4 | T | 9 | 86 | 13 | 1240 | 0 | |
| Cyc_ela | <4 | T | | | | 1240 | 97 | 1 |
| Bra_pic | <4 | E | | | | 1344 | 91 | 12 |
| Cat_leo x Cat_mul | <4 | E | | | | 1372 | 0 | |
| Epi_dif x Epi_iba | <4 | E | | | | 1379 | 0 | |
| Epi_iba | <4 | E-T | 332 | 71 | 33 | 1501 | 0 | |
| Myr_tib | <5 | E | | | | 1523 | 0 | |
| Ble_str | <5 | T | | | | 1558 | 0 | |
| Iso_lin | <5 | T-E | 413 | 91 | | 1624 | 28 | 0 |
| Zig_max | +5 | E | | | | 1915 | 34 | 19 |
| Cat_int x Cat_pao | +5 | E | 52 | 99 | | 1994 | 82 | 19 |
| Lae_ten x Lae_pur | +5 | E | | | | 2201 | 82 | 20 |

De las especies e híbridos evaluados, pocos logran mantener la viabilidad en el tiempo con valores por encima del 60 % comparando situación inicial y final (Tri_jon, Pol_con, Gom_long, Cat_int x Cat_pao). Dos híbridos intragenéricos de Laelia y Cattleya mantuvieron altos valores de viabilidad después de 5 años de almacenamiento en frío (Tabla 8). En solo dos muestras (Bip_pen y Epi_iba) la viabilidad decayó a cero a los 3 y 4 años respectivamente, mientras que Pap_ter en menos de un año decayó a cero (Tabla 8). Dos muestras de Gom_bif disminuyeron su viabilidad un 36 y 20 % entre 1 a 3 años de almacenamien-

to, respectivamente, mientras que Iso_lin decayó un 69 % entre la situación inicial y final (4 años). En algunas especies, la viabilidad final cero, podría explicarse por procesos de incompatibilidad polínica de algunos híbridos o falta de polinizador específico lo cual determina semillas vanas y no viables y no por condiciones de almacenamiento de las muestras. En otros estudios (Lallana y García 2012 y 2015) se halló que la pérdida de viabilidad en la mayoría de las especies se da en forma gradual y leve en el tiempo. Las semillas del género *Gomesa* presentan altos valores de viabilidad (mayor al 90%) recién cosechadas (Lallana y García, 2105), reduciendo a la mitad su viabilidad en un periodo de dos años de almacenamiento en frío, mientras que *Bipinnula pennicillata* en 3,5 años de almacenamiento disminuyó del 87% al 61% su viabilidad y en *Bletilla striata* en 15 meses disminuyó de 70% al 36%.

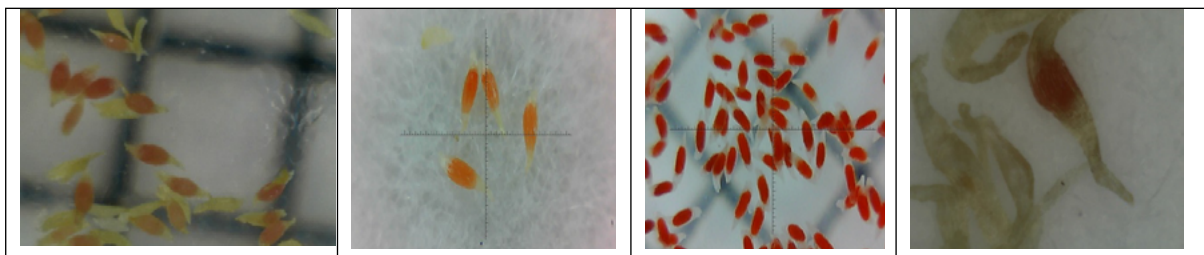


FIGURA 1. Semillas viables (tinción roja a anaranjado) de *Gomesa bifolia*, *G. longicurnu*, *Oncidium fimbriatum* y *Bletilla striata* (viables y no viables).

El método de almacenamiento empleado, sin secado previo, permitió la conservación de las semillas de orquídeas por largos periodos (uno a cinco años), según las especies, siendo de bajo costo y sencillo de implementar.

Catálogo Físico y Digital

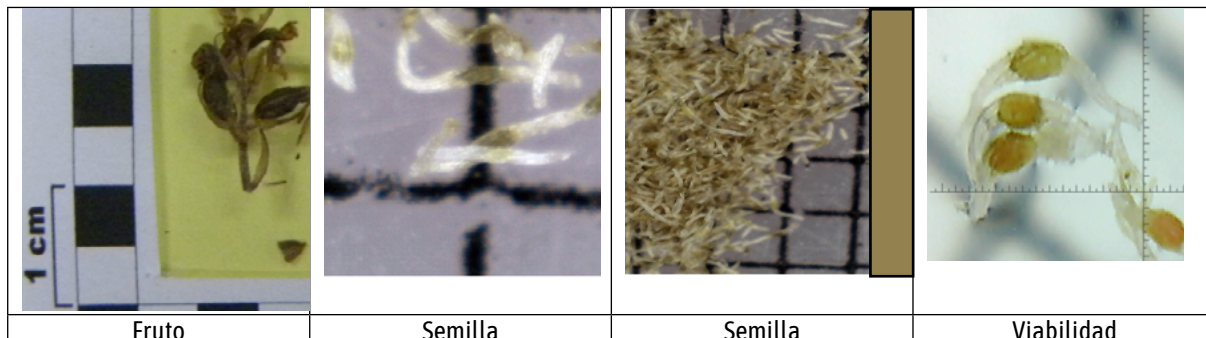
Enmarcado en un plan de beca CIN y dentro de las actividades del proyecto está la conformación de un catálogo físico y digital de semillas. Esta tarea se continúa en forma sistematizada con cada muestra de especies de orquídeas (no híbridos) ingresada al catálogo de accesión. Se tienen catalogadas 62 muestras, de las cuales 30 pertenecen a especies nativas argentinas. Se confeccionó un catálogo físico duplicado, el cual fue entregado en donación al Herbario de la FCA y Jardín Botánico. Además, durante el periodo se trabajó intensamente el armado y llenado de información técnica y de fotografías para conformar un Catálogo Descriptivo de Semillas de Orquídeas (ej. Figura 2) con el fin de difundirlo a través de la página Web del proyecto, y que, a su vez constituye un material básico de la obra de Libro sobre **Semillas de Orquídeas** que se está trabajando. Vinculado a esta temática se presentó un trabajo en la XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores, AUGM (2017) que sintetiza la actividad realizada (Michel y Lallana, 2017).

CATÁLOGO DESCRIPTIVO DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS

Banco de Germoplasma de Orquídeas – FCA – UNER

BGO (2015). Ficha C-11.

| Nº ficha | ID | Especie | ingreso | Polinización |
|----------|-----|--------------------------|------------|--------------|
| C-11 | 211 | <i>Cyclopogon elatus</i> | 22/10/2012 | Natural |



Especie: *Cyclopogon elatus* (Sw.) Schltr.

Distribución geográfica Argentina: Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, Tucumán.
 Brasil: Paraná, Rio Grande Do Sul, Santa Catarina
 Paraguay: Alto Paraná, Guairá, San Pedro
 Uruguay: Artigas, Cerro Largo, Colonia, Lavalleja, Maldonado, Río Negro, Rivera, Rocha, Salto, San José, Soriano, Tacuarembó, Treinta y tres Orientales.
 Elevación (m.s.m): Mín. 0; Máx. 600
 Hábito Hierba perenne
 Nativa Sí

FRUTO

Fecha de colecta: 19/10/2012
 Colector: Jonathan
 Lugar de colecta: Paraná

Dimensiones externas del fruto Largo: 0,489 cm Ancho: 0,224 cm

SEMILLA

Descripción cualitativa de las semillas observadas en lupa:
 Semillas numerosas, de color blanquecino, testa reticulada; presentan forma filiforme, relación largo/ ancho: alargada. De tamaño medio. El embrión es visible, se encuentra en la parte central de las semillas; presenta un color pardo claro caracterizando a las semillas que lo poseen de dicho color; el embrión ocupa aproximadamente 1/3 parte de la semilla.

Dimensiones de la semilla Largo: 0,784 mm Ancho: 0,125 mm

Estimación del número y peso de semillas por fruto:
 Peso total de las semillas cosechadas por fruto: S/D
 Número de semillas por mg: S/D
 Número total de semillas por fruto: S/D

Fecha de determinación: S/D Operador: S/D



Color del pool de semillas: Valor RGB ajustado: 147; 129; 80 
 Valor RGB original: 128; 128; 92 

FIGURA 2. Ejemplo de la ficha C-11 correspondiente a la especie *Cyclopogon elatus* del catálogo descriptivo de semillas de orquídeas

Cultivo “in vitro”

Además del medio básico de Murashige & Skoog (1962), para el repique de algunos ensayos se han preparado medios simplificados (azúcar, banana, fertilizantes y agar), y el medio de Knudson (1946) al 50, 75 y 100% de la concentración de sales. En uno de los ensayos se probó un medio de cultivo simplificado (E1, E2 y E3) que contenía banana, 20 gramos de azúcar, 6 gramos de agar -agar y 2 gramos de carbón activado, más 0,3; 0,6 y 1,2 ml/L de Fertilizante Crop 12 (Macro y micronutrientes), respectivamente, junto con el medio de Knudson al 100 % (N-100). En estos medios se plantaron plantas de *Gomesa bifolia* var federal provenientes de semillas (2do. Repique) con hojas y raíces en principio de desarrollo de menos de 1 cm de altura. El ensayo fue llevado a cámara de crecimiento con 16 h de luz y 8 de oscuridad. A los 90 días se realizó una evaluación del número de hojas, raíces, y longitud radical y se determinó el peso seco en tres plantas de cada tratamiento.

En el tratamiento E2 6C (23/08/16) se observó gran desarrollo de raíces, muchos brotes múltiples en la base de algunas plantas, hojas de color pálido amarillo (Figura 3). El tratamiento E2 12C (concentración más alta de fertilizante) la situación de las plantas fue similar, hojas de color verde claro a amarillo y algunas secas, poco desarrollo de la parte aérea, raíces largas, múltiples brotes.

Respecto a la evaluación de peso de las plantas se observó que los medios Nudkson C al 100 % y el E1 3C, presentaron los mayores valores de materia seca, 11,6 y 12,45 %, respectivamente.



FIGURA 3. Desarrollo plantas de *Gomesa bifolia* var Federal a los 90 días de cultivo “in vitro”, en medio simplificado con fertilizante.

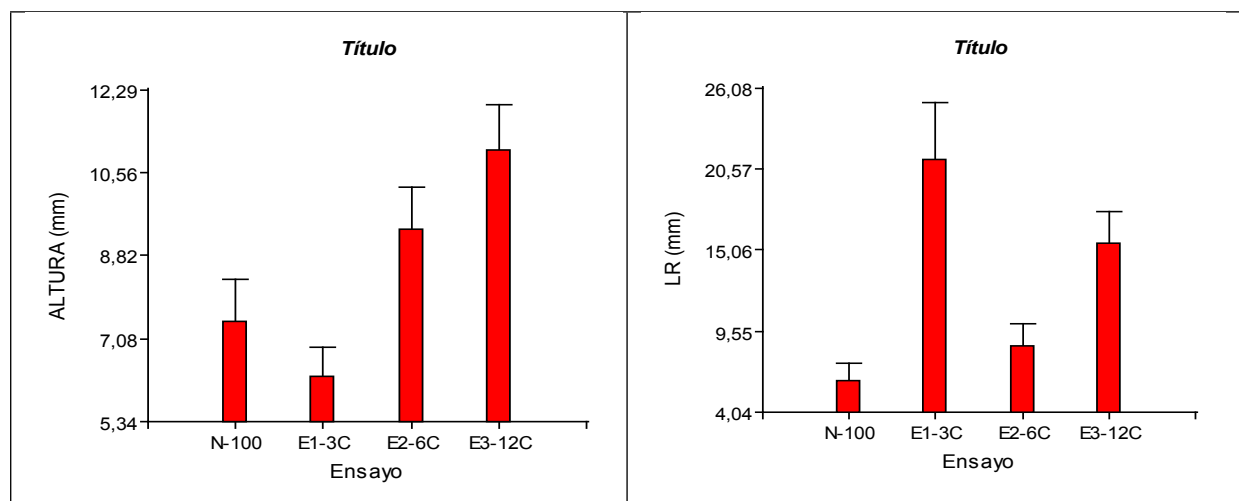


FIGURA 4. Altura media y longitud radical (LR) de plantas de *Gomesa bifolia* var Federal evaluados a 90 días de crecimiento en distintos medios de cultivo “in vitro”.

La altura de las plantas mostró diferencias entre los tratamientos de máxima fertilización y el N-100 y E1 3C, no obstante el desarrollo de hojas (color y tamaño) fue significativamente mejor en N-100. En cuanto a la longitud radical (Figura 4), se observa un efecto significativo en el tratamiento E1 3C (menor dosis de fertilizante), pero el desarrollo de la parte aérea (hojas) fue pobre y con hojas de color amarillento.

En síntesis, se concluye que el medio de cultivo simplificado no reemplaza totalmente a los medio completos y presenta deficiencia de algunos nutrientes que impide un normal desarrollo de la parte aérea. Por otra parte se observó un importante estímulo al crecimiento radical (número y longitud de raíces) en los tratamientos fertilizados (Figura 5).

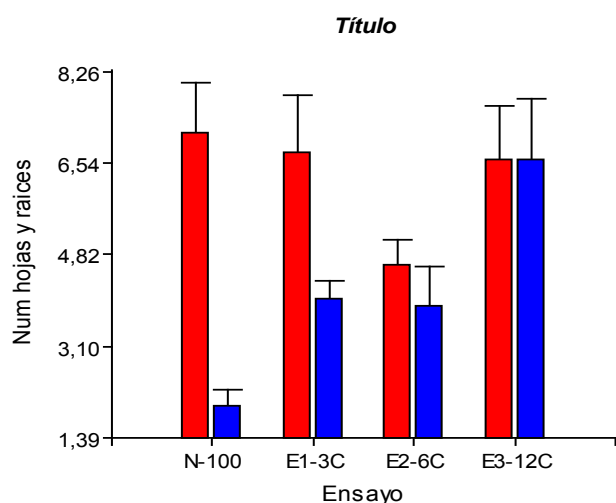


FIGURA 5. Numero de hojas y de raíces de plantas de *Gomesa bifolia* var Federal evaluados a los 90 días de crecimiento en distintos medios de cultivo "in vitro".

En otro ensayo montado en paralelo E08-16 (24/08/16), con la misma especie, se evaluó el crecimiento y desarrollo de plantas en dos medios: medio simplificado con Crop 12 ($0,3 \text{ mL}^{-1}$) versus Murashige y Skoog al 50 % de la concentración de sales.

Las plantas en medio simplificado presentaron poco desarrollo de la parte aérea, hojas de color verde amarillento a marrón y algunas secas. Buen desarrollo de raíces. Las mismas plantas en medio M&S al 50 % presentaron color verde intenso, gran desarrollo de la parte aérea y desarrollo de raíces, evaluados a los 90 días (Figura 6).

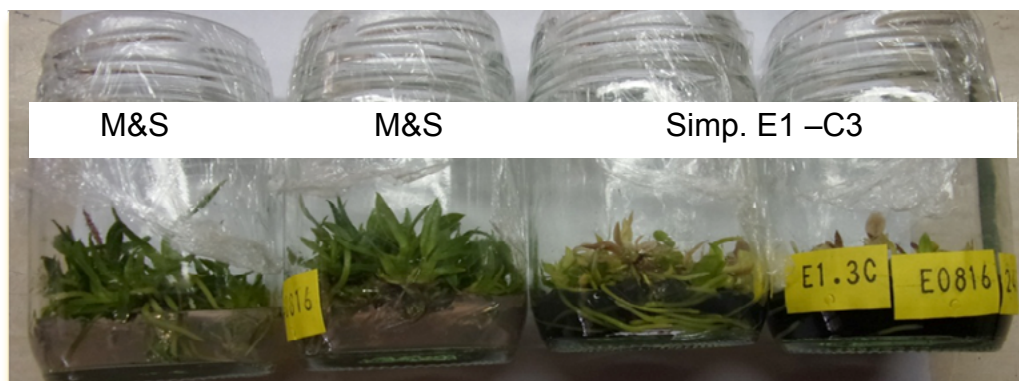


FIGURA 6. Desarrollo de plantas de *Gomesa bifolia* var Federal a los 90 días de cultivo "in vitro" en dos medios (M&S; Murashige and Skoog y Simp.; simplificado).

En tres años de ejecución del proyecto se han iniciado 35 nuevos ensayos de cultivo “in vitro”, mantenido 38 ensayos en repiques, cultivado 18 especies y 20 híbridos de orquídeas (Tabla 9).

TABLA 9. Número de nuevos ensayos por año, repiques, especies e híbridos mantenidos en cámara de crecimiento y detalle de las especies nativas en cultivo por año.

| Año | Ensayos nuevos | Ensayos Repiques | especies | híbridos | Especies nativas (nuevos ensayos) |
|------|----------------|------------------|----------|----------|---|
| 2015 | 8 | 14 (1) | 6 | 12 | <i>Brasylorchis picta</i> , <i>Brassavola tuberculata</i> , <i>Oncidium fimbritum</i> , <i>Encyclia argentinensis</i> , <i>Isochilus linearis</i> |
| 2016 | 16 (2) | 9 | 6 | 6 | <i>Cyrtopodium punctatum</i> , <i>Leptotes unicolor</i> , <i>Chloraea membranacea</i> , <i>Brassavola tuberculata</i> |
| 2017 | 11 (3) | 15 | 6 | 2 | <i>Microlaelia lundii</i> , <i>Isabella pulchella</i> , <i>Chloraea membranacea</i> , <i>Oeceoclades maculata</i> |

(1) *Cyclopogon elatus*, *Gomesa bifolia* x *G. flexuosa*; (2) Seis híbridos de *Gomesa bifolia* var *Federal* por otros *Oncidium* de pétalos amarillos, marrones y un híbrido intraespecífico (*Maxilaria variabilis* x *Brasylorchis picta*); (3) *Sophrolaelia* (híbrido), *Epidendrum* sp.; *Catleya labiata*, *C. aurantiaca*, *C. gutata* y *Neobentania graciliens*

Para el control y seguimiento de los ensayos en cámara de crecimiento se ha desarrollado una planilla Excel semiautomática permite actualizar las altas y bajas de los frascos en cultivo, debido a: contaminación, repique, secado del medio de cultivo o extracción para aclimatación.

Vinculado a la micropropagación de especies nativas de orquídeas de la región litoral se presentó una ponencia oral sobre “Conservación y multiplicación de orquídeas Nativas Argentinas” en el I Congreso de Jardines Botánicos del Cono Sur (Córdoba, 2016). Se hizo un balance de las distintas experiencias en micropropagación de orquídeas del proyecto, y se mostraron ejemplos de plantas que alcanzaron la floración construyendo una planilla modelo “Historia de vida de una planta de orquídea” donde se visualizan las distintas etapas del proceso. En el trabajo se menciona que los resultados del proyecto serán transferidos a aficionados, viveristas y público en general, a través de charlas técnicas y cursos de capacitación, lo cual contribuirá a la toma de conciencia en preservación de especies nativas y a la compra de plantas producidas por esta técnica. En 5 años se logró la micropropagación y aclimatación de 18 especies nativas y cuatro híbridos (Tabla 10), de los cuales 6 especies y dos híbridos fueron obtenidos en los tres últimos años (2015-2017).

TABLA 10. Especies e híbridos de orquídeas nativas micropropagadas en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos-FCA.

| | |
|---|--|
| <i>Bipinnula pennicillata</i> (T) - *C y *P | <i>Isochilus linearis</i> (T) - *C y *P |
| <i>Cyclopogon elatus</i> (T) - *C | <i>Oncidium fimbriatum</i> (E) - *C |
| <i>Encyclia argentinensis</i> (E) - *C | <i>Polystachya concreta</i> (T-E) - *C y *P |
| <i>Gomesa bifolia</i> (E) - *C y *P | <i>Microlaelia lundii</i> (E) - *C |
| <i>G. bifolia</i> “federal” (E) - *C y *P | <i>Miltonia flavescens</i> (E) - *C |
| <i>G. bifolia</i> “pétalos amarillos” (E) - *C y *P | <i>Trichocentrum jonesianum</i> (E) - *C y *P |
| <i>G. longicornu</i> (E) - *C y *P | <i>Gomesa bifolia</i> x <i>Miltonia flavescens</i> (E) - *C |
| <i>Oncidium bifolium</i> var. <i>Majus</i> (E) - *C y *P | <i>Brassavola tuberculata</i> (E) - *C y *P |
| <i>Gomesa bifolia</i> pétalos marrones (E) | <i>Gomesa bifolia</i> Federal x Gom_bif pétalos amarillos (E) |

| | |
|---|--|
| Gom_bif (Salta) x Gom_bif pétalos marrones (E) | Gom_bif (ID36) x Gom_bif pétalos marrones (E) |
| Leptotes unicolor (E) | Chloraea membranacea (T) |

*Referencias: (*P) Especies sobre las que existen trabajos publicados (Billard *et al.*, 2014 a,b; Dalzoto, 2013; Dalzoto y Lallana, 2013 a y b, 2015; Dalzotto *et al.* 2013, 2015; Di Persia y Lallana 2015; Lallana y García, 2012, 2013, 2015, 2016; Lallana *et al.*, 2010; 2016; Lallana y Barsnti, 2016; Lallana y Wagner, 2017; Michel *et al.*, 2017) y/o presentados en congresos (*C), (E) plantas epífitas, (T) plantas terrestres.

Posteriormente se procedió a la distribución gratuita de plantas de orquídeas, obtenidas por micro-propagación en el Laboratorio de Cultivos Tejidos Vegetales de la FCA, a los jardines botánicos presentes en el evento, a fin de que dispongan de plantas de orquídeas para su conservación y preservación. Las especies distribuidas correspondieron a tres epífitas del género *Oncidium* y tres terrestres. Todas plantas adultas entre 2 y 3 años de cultivo, algunas florecidas y otras próximas a florecer.

Aclimatación

En general se observa que cuando las plantas son aclimatadas con tamaños menores a 3 cm de altura, se obtienen magros resultados de sobrevivencia. El tiempo de aclimatación en laboratorio (alta humedad y baja intensidad lumínica) también es importante en lograr una mayor tasa de sobrevivencia. Los cambios ambientales que sufren las vitro plantas son importantes y drásticos, por lo cual el proceso de aclimatación deber realizarse en forma gradual.

Con el propósito de sistematizar la historia de vida de las plantas micropropagadas y aclimatadas se elaboró una ficha tipo con información técnica de los pasos metodológicos y que concluye con una infografía ilustrativa de los meses de cada etapa (Germinación, cultivo "in vitro", Aclimatación) hasta la floración de la planta. Las especies de las cuales se dispone de información sistematizada son seis, cuya infografía se muestra a continuación:

Oncidium fimbriatum: Tiempo de cultivo desde semilla hasta primera floración: 26 meses.

Tiempo en meses →

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|--------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|------|----|----|
| 1 | 2 | 4 | 5 | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 13 | 14 | 15 | 16 | .. | .. | .. | .. | 25 | 26 | 27 | 28 |
| Germi-nación | | Cultivo "in vitro" | | | | | | | | | | Aclimatación - crecimiento vegetativo | | | | | | | | Flor | | |

Ciclopogon elatus: Tiempo de cultivo desde semilla hasta primera floración: 22,5 meses

Tiempo en meses →

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|--------------------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|------|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | .. | .. | .. | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| Germ. | | Cultivo "in vitro" | | | | | | | | | | Aclimatación - crecimiento vegetativo | | | | | | | | Flor | | |

Polystachya concreta: Tiempo de cultivo desde semilla hasta primera floración: 46 meses

Tiempo en meses →

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|--------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|------|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 25 | 26 | 27 | 28 | .. | .. | .. | .. | 44 | 45 | 46 | 47 |
| Germina-ción | | Cultivo "in vitro" | | | | | | | | | | Aclimatación - crecimiento vegetativo | | | | | | | | Flor | | |

Epidendrum campaccii: Tiempo de cultivo desde semilla hasta primera floración: 35 meses

Tiempo en meses →

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|---|--------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------------------------|----|----|----|----|----|------|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 15 | 16 | 17 | 18 | .. | .. | .. | .. | 33 | 34 | 35 | 36 |
| Germi- nación | | Cultivo "in vitro" | | | | | | | | | | Aclimatación - crecimiento vegetativo | | | | | | Flor | | | |

Gomesa bifolia "Federal": Tiempo de cultivo desde semilla 50 meses (sin floración)

Tiempo en meses →

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|--------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------------------------|----|----|----|-----|-----|-------|----|----|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 | .. | .. | .. | .. | .. | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | .. | .. | ... | ... | 48 | 49 | 50 | |
| Germ. | | Cultivo "in vitro" | | | | | | | | | | Aclimatación - crecimiento vegetativo | | | | | | Flor? | | | |

Gomesa longicornu: Tiempo de cultivo desde semilla 70 meses (sin floración)

Tiempo en meses →

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|--------------------|---|----|----|----|----|----|---|--|--|---------------------------------------|----|----|----|-----|-----|-------|----|----|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 | .. | .. | .. | .. | .. | 9 | | | 10 | 11 | .. | .. | ... | ... | 68 | 69 | 70 | |
| Germ. | | Cultivo "in vitro" | | | | | | | | | | Aclimatación - crecimiento vegetativo | | | | | | Flor? | | | |

El ciclo completo a floración es variable según las especies, desde 22 meses hasta 46 meses, y algunas plantas como *Gomesa longicornu* aún no han florecido, llevando 70 meses en cultivo.

A partir de la información generada en el marco del proyecto, se hizo un análisis de 65 ensayos de aclimatación correspondientes a los años 2015 y 2016, ordenando en tablas de frecuencia por especie y por año, los porcentajes de supervivencia y estableciendo rangos para caracterizar las muestras empleando estadística descriptiva (Lallana y Wagner, 2017). Un 20 % de los ensayos correspondieron a plantas de orquídeas cultivadas en contenedores con sustrato de cáscara de pino finamente compostada, mas perlita y musgo de *Sphagnum* (5:1:1), el resto son plantas de hábito epifito y se montan directamente en palos con musgo de *Sphagnum*.

Una síntesis de los resultados de este trabajo se presenta en forma gráfica (Figura 7) y las conclusiones del mismo son:

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 (Tadeu de Faria *et al.*, 2001; Deb e Imchen, 2010) y normalmente evalúan la aclimatación a los 60-90 días. Los resultados presentados en este trabajo indican largos periodos de evaluación superior en muchos casos a los 3 meses y hasta 10 meses.

Existen diferencias según las especies en los resultados de aclimatación de acuerdo a la época del año, por lo que es necesario establecer para cada una el momento adecuado. Las especies con mayor

supervivencia (70 al 100 %) aclimatadas en invierno-primavera fueron: *Brassavola tuberculata*, un híbrido de *Cattleya* y otro de *Laelia*, *Cyclopogon elatus*, *Bletilla striata* alba, *Microlaelia lundii* y *Encyclia argentinensis*. En el 50 % de los ensayos la supervivencia fue mayor al 80 % (Figura 7).

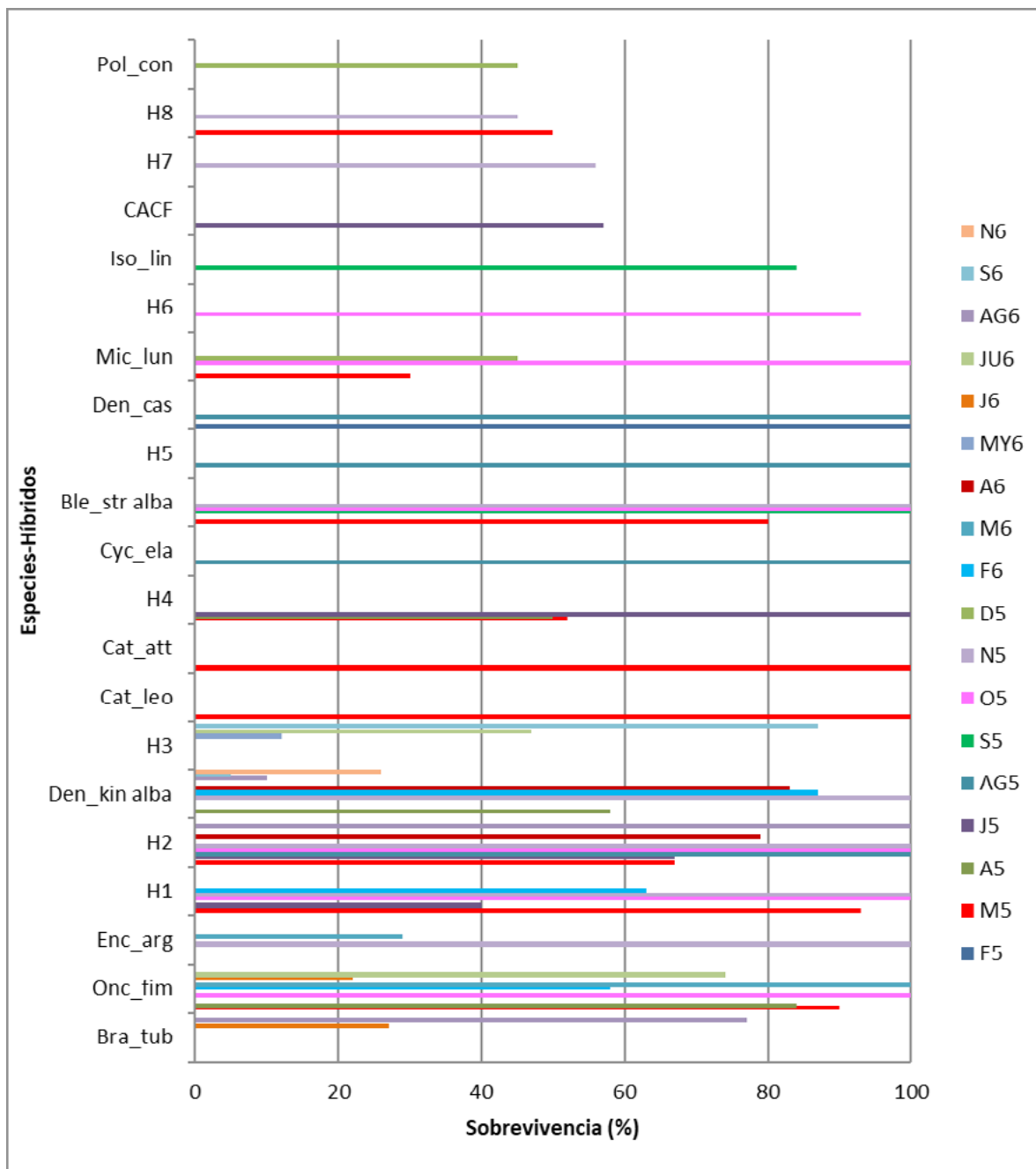


FIGURA 7. Valores finales de supervivencia de 65 ensayos de aclimatación de especies e híbridos de orquídeas en distintos meses. Las letras mayúsculas y números hacen referencia a los meses y año de cada ensayo (5=2015 y 6=2016).

Referencias: H1: *Oncidium bifolium* (CR-06) x *G. flexuosa*, H2: *Cattleya* híbrido 269, H3: *Brassavola* (boliviana) x *L. purpurata*, H4: *L.C. Roseliensis* x *Sgto. Cabral*, H5: *Laelia superbiers* x *L. rubescens aurea*, H6: *Dendrobium amarillo* x *D. blanco*, H7: *Cattleya intermedia* x *C. pao azucar*, H8: *Laelia purpurata* x *L. purpurata*, CACF: *Cattleya* An Carol Freckle s "Attacky"

En las tablas 11 y 12 se sintetizan los resultados de 3 años de ensayos de aclimatación conducidos en

el invernáculo de la FCA-UNER. Los porcentajes anuales resultan elevados, entre el 58 y 80 % (Tabla 11), evaluados en largos periodos de tiempo.

TABLA 11. Numero de ensayos de aclimatación por año, número total de plantas y porcentaje medio de supervivencia

| Año | Número de: | | | Número de plantas | | Porcentaje medio de supervivencia |
|------|------------|----------|----------|-------------------|-------|-----------------------------------|
| | ensayos | especies | híbridos | INICIO | FINAL | |
| 2015 | 40 | 11 | 8 | 762 | 614 | 80 % |
| 2016 | 25 | 5 | 4 | 912 | 531 | 58 % |
| 2017 | 57 | 4 | 7 | 1482 | 1008 | 68 % |

TABLA 12. Clasificación del número de ensayos de aclimatación por año, en función de cuatro rangos porcentuales de supervivencia de plantas

| Rango (%) Supervivencia | 2015 | 2016 | 2017 |
|-------------------------|------|------|------|
| 0 - 10 | 1 | 6 | 5 |
| 11 - 39 | 2 | 5 | 12 |
| 40 - 80 | 12 | 6 | 22 |
| 81 - 100 | 25 | 8 | 18 |

De análisis de la Tabla 12 surge que la supervivencia en el rango entre el 40 y 100 % fue de 95%, 56 % y 70%, para los años 2015, 2016 y 2017, respetivamente. Estos resultados indican altos porcentajes de supervivencia para esta etapa crítica de la aclimatación de plantas de orquídeas, en su gran mayoría epífitas (más del 80 %).

Por último, es importante destacar que los porcentajes de supervivencia son variables según las especies y dentro de una misma especie se observan casos con cero (%) de sobrevivencia, según la época del año en que las plantas fueron aclimatadas (Lallana y Wagner, 2017). En el caso de los híbridos del género *Gomesa* (*Gom_bif* x *Gom_bif* pétalos marrones), a partir de mayo en adelante se registran mayores porcentajes de supervivencia (80 a 100%), para el híbrido de *Gomesa bifolia* "Federal" la situación es más regular y no se observan tantas diferencias entre los meses de febrero a junio oscilando entre 36 y 100 %, mientras que el híbrido *Gom_bif* x *Gom_bif* pétalos amarillos los porcentajes más bajos (31 %) se obtuvieron cuando las plantas se aclimataron en marzo, mientras que las extraídas entre mayo y septiembre alcanzaron porcentajes más altos (50 al 100 %).

Protocolos

Como ya se indicó al inicio de Material y métodos, todos los protocolos están disponibles para su consulta en Orquier, (2017). Código QR:



El listado de los mismos es:

Protocolo General LCTV ↓

Equipos de laboratorio ↓

pH -Metro [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Conductímetro [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Agitador orbital [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Vortex-Mixer [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Mesa de flujo laminar horizontal [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Autoclave [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Cámara de crecimiento [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Pipeta volumétrica ajustable [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Mapa de riesgos del Laboratorio [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Preparación de medios de cultivo ↓

Preparación solución desinfectante [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Esterilización [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Medio básico M&S concentrado [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Preparación 1 L Medio M&S [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Preparación de soluciones hormonales [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Otros procedimientos ↓

Solucion a partir de droga pura [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Soluciones de volumen o concentración conocida [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Rotulación de ensayos en cámara de cultivo [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Estructura de informes técnicos [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Banco de Germoplasma de semillas de orquídeas ↓

Semillas - BGO ↓

Conteo de semillas de orquídeas [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Catálogo de accesión de frutos de orquídeas [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Acondicionamiento y almacenamiento de semillas [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Plantilla para conteo de semillas germinadas [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Catalogo físico de semillas de orquídeas [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Catalogo digital de semillas de orquídeas [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Ensayos de viabilidad ↓

Análisis de viabilidad de semillas de orquídeas con la prueba topográfica por tetrazolio [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Ensayos de aclimatación ↓

Aclimatación de plántulas (Fase Ex Vitro) [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Informes técnicos de ensayos de aclimatación [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Ficha técnica para la colecta de especies [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Montaje de plantas de orquídeas en palo [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Estadística y software ↓

Medición digital de la longitud y ancho de semillas de orquídeas [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Medición digital de la longitud radical [\[Ver el archivo adjunto\]](#)

Además, se han generado 3 nuevos protocolos en 2017 en la Categoría. **Banco de germoplasma de semillas de orquídeas**, Subcategoría 1. Semillas – BGO:

1.7. Método de conteo directo de semillas de orquídeas

1.8. Conteo de semillas de orquídeas con el software ImageJ

1.9. Metodología para la medición de velocidad de caída libre de semillas de orquídeas

Conclusiones

Se logro mantener y actualizar el Banco de Germoplasma de Semillas de orquídeas, estableciendo protocolos para el ingreso de frutos, cosecha de semillas, almacenamiento y rotulación de las muestras, alcanzando al momento un catálogo de accesión con 286 registros con 95 especies no repetidas y 114 híbridos. La base de datos estará próximamente disponible en el Sistema Nacional de Datos Biológicos.

A través de las pruebas de viabilidad periódica que se efectúan en el BGO se pudo comprobar que el método de almacenamiento en frío (5 °C) sin secado previo de las muestras, permite la conservación de semillas por largos periodos de tiempo (1 a 4 años) sin grandes pérdidas de viabilidad.

Se ajustaron técnicas de conteo y medición de semillas estableciendo nuevos protocolos y procedimientos, en particular se puso a punto la técnica de evaluación de caída libre de semillas.

Por otra parte se ha confeccionado un Catálogo Físico y otro Digital de las muestras de semillas del BGO, uno de los objetivos centrales del Proyecto.

Se logró el cultivo “in vitro” de semillas de orquídeas de 6 (seis) especies nativas y dos híbridos, con resultados de obtención de plantas completas para el proceso de aclimatación.

La aclimatación de plantas, en particular las especies epifitas, ha sido relativamente exitoso, logrando en la mayoría de las especies sobrevivencia del 40 al 100 %, manteniendo 1008 plantas en invernáculo originadas por esta técnica.

En noviembre de 2017 se presentó la propuesta de edición de un libro multiautoral que compila gran parte de la producción científica y técnica generada en el marco de dos proyectos de investigación sobre Orquídeas PID 2144 (2010-2014) y PID 2172 (2015-2017). La obra se presenta en 6 capítulos o títulos principales y dos Anexos. La propuesta de la obra fue avalada por el Consejo Directivo de la FCA mediante Resol. N° 8.775/17, siendo el contenido básico:

Banco de Germoplasma de semillas de orquídeas, viabilidad y germinación. Longevidad y flotabilidad. Forma color y estructura de las semillas, dimensiones físicas, conteo y medición de la caída libre. Modelo de dispersión de semillas. Catálogo Físico y Digital. Fichas informativas de las semillas de orquídeas nativas del litoral.

La difusión de los resultados del proyecto se logró a través de numerosas presentaciones en reuniones científicas, conferencias, charlas técnicas, un curso y 10 publicaciones científicas en revistas nacionales e internacionales según se detalla en los siguientes indicadores de producción:

Presentaciones en congresos y reuniones científicas: 18 (dieciocho)

Nacionales: 15

Internacionales: 3

Publicaciones científicas con referato: 10 (diez)

Nacionales (7): Michel y Lallana, 2015; Di Persia y Lallana, 2015; Lallana et al., 2016; Lallana y Barsanti, 2016; Lallana y García, 2016; Lallana y Wagner, 2017; Michel y Lallana, 2017
Internacionales (3): Dalzotto et al., 2015; Lallana y García, 2015; Dalzotto y Lallana, 2015

Trabajo Final de Graduación (Tesis de grado) en el marco del PID 2172: 1(una) (Di Persia, 2015).

Acciones de transferencia: 14 (catorce)

Año 2015: 2 charlas técnicas

Año 2016: 1 curso de capacitación, 2 charlas técnicas, 1 conferencia, donación de plantas a jardines botánicos de Argentina, diseño página WEB y carga de contenidos,

Año 2017: 2 entrevistas televisivas, 1 video institucional de difusión del proyecto, Catálogo físico, 1 charla técnica, proyecto Libro "Semillas de orquídeas"

Referencias Bibliográficas

- 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. (1961). *Cycnoches ventricosum* Batem. var. *chlorochilon* (Klotzsch) P. H. Allen comb. nov. *Ceiba*, 9:11-22.
- ARDITTI, J. (2008). *Micropropagation of Orchids*, Second Edition. Volumen I y II. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. 1560 pp.
- ARDITTI, J.; Ernst, R. (1993). *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Sons, New York. USA. 640 p.
- 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. (2014b). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, 38:69-81.
- BURGEFF, H. (1936). *Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen*. Jena, Germany: Verlag von Gustav Fischer.
- CAÑAL, M.J.; Rodríguez, R.; Fernández, B.; Sánchez-Tames, R.; Majada, J.P. (2001). Fisiología del cultivo "in vitro". *Biotecnología vegetal* 1:3-9.
- CELLINI, J.M.; Salomon, L.; García, R.; Cellini, L.; Sánchez, M. (2009). Límite sur del área de distribución de *Oncidium bifolium* Sims. *Bol. Soc. Arg. de Bot.*, 44 (suplemento):83.
- 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. (2013a). Viabilidad, Germinación asimbiótica y vigor de tres especies de orquídeas nativas. *Rev. Cient. Agropecu.*, 17(1-2): 39-49
- DALZOTTO, C.A.; Lallana, V.H. (2013b). Tiempos de desinfección con hipoclorito de sodio para la siembra "in vitro" de semillas de *Oncidium longicornu* Mutel. (pp 67-69). En: *I Congreso Brasileiro de Producción de Orquídeas*. Fortaleza, Brasil. 05 al 10 de marzo de 2013. Edición CD-ROM.
- 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. (pp. 42-44). En: *I Congreso Brasileiro de Producción de Orquídeas*. Fortaleza, Brasil. 05 al 10 de marzo de 2013. Edición CD-ROM
- DALZOTTO, C. A.; Lallana, V. H. (2015). Efecto de la testa en la germinación in vitro de *Bipinnula penicillata* (Rchb. F.) Sisternas & Salazar (Orchidaceae). *Investig. Agrar.*, 17(2):116-121. <http://dx.doi>

org/10.18004

- 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 (pp. 60-64). En: *Livro de Resumos. II SIMBRAORQ, Simposio Brasileiro de produção de Orquídeas*. Jaboticabal, SP, Brasil. UNESP/FACV 03 al 06 /03/2015.
- 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. (2015). *Catálogo de semillas de orquídeas nativas del litoral Argentino*. Trabajo Final de Graduación. 49 p. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UNER.
- DI PERSIA, J.F.; Lallana, V.H. (2015). Colección de referencia de semillas de orquídeas de la región litoral (pp. 14-18). En: *X Jornada de Comunicación de Producciones Académicas y Científicas de Biología*. FCYT. UADER. Paraná, 8/10/15. Edición CD-ROM
- DRESSLER, R.L. (2005). Pieza fundamental entre los libros de orquídeas (p. 5). En: 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.
- FERREIRA, T.; Rasband, W. (2011). *ImagenJ user guide*. IJ 1.45 m 152p. Disponible en: <http://imagenj.nih.gov/ij/docs/user_guide.pdf> [4 de agosto de 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.
- FLORA VASCULAR DE LA REPÚBLICA ARGENTINA. Disponible en: <<http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm>> [21 de octubre de 2015].
- FREULER, M.J. (2003). *100 Orquídeas Argentinas*. Ed. Albatros, Buenos Aires. 128 pp.
- 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.
- INSAURRALDE, I.S.; Radins, J.A. (2007). *Misiones orquídeas*. 1 ed. Golden Company, Buenos Aires. 192 p.; il.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA. (2012). *International Rules for Seed Testing*. Basserdorf, Switzerland 362 p.
- JONHSON, A.E. (1992). Listado tentativo de las orquídeas de la Argentina (Abundancia, distribución, conservación). *Boletín Técnico Fundación Vida Silvestre Argentina*, N° 11. 82 p.
- KANJILAL, B.; De Sarker, D.; Mitra, J.; Datta, K. B. (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.; García, L.F. (2013). Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). *Investig. Agr.*, 15(2):129-132.
- LALLANA, V.H., Billard, C.E.; Klug, L.M. (2010). Germinación y desarrollo de plántulas "in vitro" de *Oncidium bifolium* Sims var. *bifolium* (Orchidaceae). (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. (2015). Nuevo método para el conteo de semillas de orquídeas. (p. 119). En: *XII Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral*. Organizadas por la Asoc. Cienc. Nat. Del Litoral y la UADER. Paraná, 2 y 3 noviembre de 2015
- LALLANA, V.H.; García, L.F. (2015). Longevidad de semillas de orquídeas almacenadas en frío (pp.26-30). En: *Livro de Resumos. II SIMBRAORQ, Simposio Brasileiro de produção de Orquídeas*. Jaboticabal, SP,

- Brasil. UNESP/FACV 03 al 06 de marzo de 2015.
- LALLANA, V.H.; García, L.F. (2016). Viabilidad de semillas de orquídeas almacenadas en frío. (pp. 143-144). En: *Libro de resúmenes de la I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. XVII Jornada de Divulgación Técnico-Científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR. II Jornadas de Ciencia y Tecnología / Néstor Di Leo; Hugo Labria; Ada Seghesso. - 1a ed. - Rosario: Foja Cero, 2016. Libro digital.*
- LALLANA, V.H.; Barsanti, V.M. (2016). Geminación, cultivo *in vitro* y aclimatación de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae) (pp. 141-142). En: *Libro de resúmenes de la I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. XVII Jornada de Divulgación Técnico-Científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR. II Jornadas de Ciencia y Tecnología / Néstor Di Leo ; Hugo Labria; Ada Seghesso. - 1a ed. - Rosario : Foja Cero, 2016. Libro digital.*
- LALLANA, V.H.; Billard, C.E.; Martínez, V.A.; García, L.F.; Barsanti, M. V.; Di Persia, J.F.; et al. (2016). Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos "in vitro". *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, v. 6, n. 6 (94-121).
- LALLANA, V. H.; Wagner, J. B. (2017). Aclimatación y sobrevivencia de plantas de orquídeas provenientes de cultivo "in vitro". (pp. 119-120). En: *Libro de resúmenes de la II Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. XVIII Jornada de Divulgación Técnico-Científicas de la Facultad de Cs. Veterinarias, UNR. III Jornadas de Ciencia y Tecnología*; compilado por Ada Seghesso; Hugo Labria; Néstor Di Leo; editado por Augusto Nascimbene; ilustrado por Juan Manuel Vázquez. - 1a ed. compendiada. - Zavalla: Fundación Ciencias Agrarias, 2017. Libro digital.
- 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)> [01 de septiembre de 2011].
- MICHEL, A.; Lallana, V.H. (2015). Conteo de semillas de frutos de *Chloraea membranacea* Lindl. y un híbrido de *Gomesa bifolia* (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams. (pp. 10-13). En: *Libro de Resúmenes X Jornada de Comunicación de Producciones Académicas y Científicas de Biología*. FCYT. UADER. Paraná, 8/10/15.
- MICHEL, A.; García, L. F.; Lallana, V. H. (2017). Crecimiento, recuento de semillas y análisis del crecimiento de frutos de orquídeas nativas. (pp. 125-126). En: *Libro de resúmenes de la II Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. XVIII Jornada de Divulgación Técnico-Científicas de la Facultad de Cs. Veterinarias, UNR. III Jornadas de Ciencia y Tecnología*; compilado por Ada Seghesso; Hugo Labria; Néstor Di Leo; editado por Augusto Nascimbene; ilustrado por Juan Manuel Vázquez. - 1a ed. compendiada. - Zavalla: Fundación Ciencias Agrarias, 2017. Libro digital.
- MICHEL, A.; Lallana, V.H. (2017). Catálogo físico y digital de semillas de orquídeas argentinas. (p. 631). En: *Resúmenes de la XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores, AUGM*. Universidad Nacional de Itapúa - Encarnación, Paraguay. 18,19 y 20 de octubre de 2017.
- MITCHELL, R. (1989). Growing hardy orchids from seeds at Kew. *Plantsman*, 11: 152-169. En: Verdugo, G.; Marchant, J.; Cisternas, M.; Calderón, X. y Peñaloza, P. (2007). Caracterización morfológica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl. (Orchidaceae) usando análisis de imagen. *Gayana Bot.* 64(2): 232-238.
- 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.
- ORQUIER (2017). Orquídeas de Entre Ríos. Disponible en: <www.orquier.fca.uner.edu.ar>

- PENNINGSFELD, F. (1985). Soiless propagation and cultivation of orchids. Possibilities, advantages and disadvantages. *Soiless culture*, 1(1): 55-66.
- PIERIK, R.L.M. (1994) Biotecnología Vegetal como herramienta en la Horticultura Ornamental. *Chapingo*, 1: 45-57.
- PRITCHARD, H. (Ed.). (1989). *Modern Methods in Orchid Conservation*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511551307
- RASMUSSEN, H.N. (1995). *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press, 460 p.
- RAUH, W.; Barthlott, W.; Ehler, N. (1975). Morphologie und funktion der testa staubförmiger flugsamen. *Botanische Jahrbucher fur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 96:353-374.
- RODRÍGUEZ, L.; González, R.; Díaz, E.; Fajardo, E.; Sánchez, E.; Hernández, J.; et al. (2005). Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. 14 pp. Disponible en: <www.dama.gov.co> [01 de septiembre de 2011]
- SEATON, P. T.; Pritchard, H.W. (2003). Orchid germplasm collection, storage and exchange. (pp. 227-258): En: *Orchid conservation* (ed. K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett, and P. J. Cribb). Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
- SEDANO, C.G.; Aguirre, C. A.; Lallana V.H. (2017). Análisis de la dispersión de semillas de orquídeas autóctonas del litoral argentino utilizando una herramienta de simulación computacional. (p. 13). *Resúmenes de ponencias X Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas y VIII Reunión de Extensión de la Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Oro Verde, 8 de junio de 2017.
- SILVA PEREIRA, Sabrina; Damásio Da Costa Júnior, Otalício; Azevedo Dos Santos, Lucinalva; Pessoa Felix, Leonardo; Pereira Da Costa, Núbia (2015). Contagem de sementes de cápsulas de *Spathoglottis plicata* Blume e *Polystachya estrellensis* Rchb. f. (pp. 22-25). Em: *Livro de Resumos II SIMBRAORQ, Simposio Brasileiro de produção de Orquídeas*, Jaboticabal, SP, Brasil. UNESP/FACV 03 al 06 de marzo de 2015
- STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]. will do. Disponible en: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/AP-web/>>.[18 de octubre de 2017].
- 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*, 44:337-342.
- TARDEU de Faria, R.; Durigan Salio,R.; Unemoto,L.; Lopes da Silva, G. 2006. Propagação in vitro de *Oncidium baweri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de agar. *Acta Sci. Agron.*, 28(1): 71-74.
- VACIN, E.F.; Went, F.W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, 110: 605-613.
- 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.

PID 2172

Denominación del Proyecto

Banco de Germoplasma de orquídeas nativas de la región litoral

Director

LALLANA, Víctor Hugo

Unidad de Ejecución

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Dependencia

Universidad Nacional de Entre Ríos

Cátedra, área o disciplina científica

Fisiología Vegetal, Botánica Sistemática

Instituciones intervinientes públicas o privadas.

Convenios o acuerdos debidamente acreditados

INTA CASTELAR. Jardín Botánico Arturo Ragonese

Contacto

victor.lallana@fca.uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Ing. Agr. Cristina E. Billard (FCA, Cátedra de Fisiología Vegetal, Laboratorio de Cultivo de Tejidos) Hasta diciembre 2015; Ing. Agr. MSc. Patricia Diana Reinoso (FCA, Cátedra de Botánica Sistemática) Ing. Agr. Vanina Andrea Martínez (FCA, Cátedra de Botánica Sistemática) Ing. Agr. Luz Fabiola García (Laboratorio de Semillas y Cátedra de Fisiología Vegetal)

Becarios

María Virginia Barsanti, FCA-UNER, Beca de Iniciación en la Investigación (2014-2016) Juan Francisco Di Persia, FCA-UNER, Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (CIN). (2014-2015) Michel Analía, FCA-UNER, Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (CIN). (2015-2018)

Becas de Formación (FCA-UNER)

Fontana, María P. (2015); Wagner, Johana B. (2016-2017); Tiche, Jonathan A. (2017)

Alumno

Diego Heinze

Colaboradora

Ing. Agr. MSc. Marcela Sánchez

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

01/02/2015 y 31/01/2018

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N° CS 049/19 (15/04/2019)