

## Comunicación breve

# Cultivo *in vitro* y aclimatación de plantas de *Polystachya concreta* (Orchidaceae)

RECIBIDO: 08/09/2014

REVISIÓN: 15/09/2014

ACEPTADO: 09/10/2014

Billard, C. E.<sup>1</sup> • Barsanti, M. V.<sup>2</sup> • Lallana, V. H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Docentes investigadores. Cátedra de Fisiología Vegetal.

<sup>2</sup>Becaria de iniciación en la investigación PID-UNER 2144. Cátedra de Fisiología Vegetal.

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos.

Ruta 11, Km 10,5. (3101) Oro Verde, Paraná, Entre Ríos.

E-mail: victorl@fca.uner.edu.ar

**RESUMEN:** Los objetivos fueron: a) lograr la germinación axénica de semillas de *Polystachya concreta* y el desarrollo de plantas en condiciones *in vitro*, b) evaluar el agregado de fertilizantes comerciales en la etapa de repique de plantas y c) la aclimatación de plantas. Se usaron semillas de dos frutos para la siembra axénica en medio semisólido de Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su concentración. Se evaluó la germinación y a los 93 días se repicaron protocormos con y sin inicio de formación de yema apical utilizando el medio MS suplementado con 15 g/l de sacarosa y 5 g/l de agar agar. Las plantas completas se repicaron en tres oportunidades, y en el cuarto repique (17 meses) se usaron 7 medios de cultivo, combinando concentraciones del medio MS, de sacarosa, dos fertilizantes y micronutrientes de formulación comercial. A los 15, 17 y 21 meses desde la siembra se inició la etapa de aclimatación, utilizando bandejas multicelda con 4 tipos de sustratos (2 preparados y 2 comerciales). Se logró el 98 % de germinación a los 48 días y plantas completas a los 275 días. El uso de fertilizantes inorgánicos favoreció la

biomasa radical. Con sustratos comerciales se logró más del 90 % de supervivencia de las plantas en invernáculo.

**PALABRAS CLAVE:** cultivo axénico, orquídeas, aclimatación.

**SUMMARY:** *In vitro culture and acclimatization of Polystachya concreta (Orchidaceae).*

The objectives were: a) to achieve axenic germination of *Polystachya concreta* seeds and the *in vitro* development of plants; b) to evaluate the adding of commercial fertilizers in the subculture stage of plants and c) the acclimatization of plants. Seeds from two fruits were used for axenic sowing in a semi-solid medium of Murashige & Skoog (MS) in half its concentration. Germination was evaluated and 93 days after, protocorms with and without apical bud formation were divided using MS medium supplemented with 15 g/l of sucrose and 5 g/l of agar-agar. Complete plants were subcultured in three opportunities, and in the fourth subculture (17 months), 7 culture media or concentrations of MS medium combined with sucrose, two fertilizers and micronutrients of commercial

formulation were used. At 15, 17 and 21 months after sowing, the acclimatization stage was started, using multi-cell trays with 4 substrate types (2 prepared and 2 commercial ones). It was achieved the 98 % of germination at 48 days and complete plants at 275 days. Inorganic

fertilizers usage favored root biomass. Using commercial substrates, more than 90 % of plant survival in glasshouse was achieved.

**KEYWORDS:** axenic culture, orchids, acclimatization.

## 1. Introducción

Del género *Polystachya* (del griego *poly*=muchos y *stachis*=espigas o mazorcas, en alusión a que muchas especies tienen las flores agrupadas en cortos racimos) se conocen más de 200 especies, de las cuales solo cuatro habitan en Bolivia (1). El género presenta una amplia distribución tanto en África, Asia como en América tropical. En América, se la encuentra desde la Florida en los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. Estas plantas son epífitas o rupícolas, presentan tallos nudosos, engrosados en la base o con pequeños pseudobulbos. Hojas dísticas, articuladas. Flores pequeñas, no resupinadas (1).

*Polystachya* concreta es una planta epífitas de 15 a 30 cm de longitud. En Argentina se la encuentra en las provincias de Salta, Jujuy, Corrientes y Misiones (2), hallándose a diversas alturas, en ambientes húmedos y sombríos, en arboles ribereños, entre musgos o sobre rocas. El crecimiento dentro de la selva Paranaense ocurre a semisombra y a media altura (3) bajo condiciones húmedas, generalmente enraizada entre musgos o líquenes sobre rocas o ramas en ambientes boscosos (4). El cultivo se realiza en ambientes luminosos y aireados. Las hojas son extendidas y arqueadas, verde amarillentas, delgadas, coriáceas y se distribuyen de 2 a 4 por pseudobulbo. Las flores son pequeñas, carnosas, verde amarillen-

tas y están dispuestas en una inflorescencia apical erguida y multiflora. Florece entre enero y abril. Es una especie común, aunque poco cultivada (2).

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 y ornamental (5). Desde 2010 se viene ejecutando un proyecto de investigación en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNER cuyo 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, confeccionando los respectivos protocolos de micropropagación y aclimatación en las especies evaluadas. En tal sentido se han logrado avances en algunas y fracasos en otras.

Experiencias previas (6) en dos especies nativas (*Laelia lundii* y *Miltonia flavescens*) y tres híbridos permitieron lograr la germinación axénica y el desarrollo de plantas completas de *M. flavescens*, *L. lundii*, *Dendrobium kingeanum* y de tres híbridos del género *Oncidium*. Otras especies sobre las que se han logrado resultados exitosos son *Oncidium bifolium* var. "federal" (7), *O. bifolium* (8), *O. viperinum* (9), *Bletilla striata*

(10), *Epidendrum campaccii* y *O. longicornu* (datos no publicados).

Para el caso de plantas epífitas se han desarrollado procedimientos de montaje de las plantas en palos en forma directa, cubriendo las raíces con musgo de *Sphagnum* y atadas en forma firme con hilo encerado (8, 11). En el caso de plantas terrestres es necesario probar distintos tipos de sustratos con preponderancia de materiales orgánicos, a fin de tener éxito en el proceso de aclimatación.

El método más usado para la producción de orquídeas es la propagación *in vitro*, que permite aumentar significativamente la producción de plantas de alta calidad genética, y consecuentemente reducir su costo. Esta técnica es utilizada por muchos productores

de Brasil desde hace más de 20 años (12).

Los objetivos de este trabajo fueron: a) lograr la germinación axénica de semillas de *Polystachya concreta* y el desarrollo de plantas en condiciones *in vitro*, b) probar el efecto del agregado de fertilizantes comerciales en medios de cultivo *in vitro* en la etapa de repique de plantas y c) lograr la aclimatación de plantas en invernáculo.

## 2. Materiales y métodos

El 19/09/11 se cosechó inflorescencias con frutos verdes de *P. concreta* (Figura 1), ingresados al Banco de Germoplasma del PID UNER 2144 con el número ID 109, se los colocó en un desecador con silica gel hasta su secado y a los 9 meses se cosecharon las semillas.

Figura 1. Inflorescencia con frutos de *Polystachya concreta*



La desinfección y siembra de las semillas se efectuó en cámara de flujo laminar horizontal. Se utilizó el método propuesto por Mweetwa (13); McKendrick (14) y Billard (10, 15). Una alcuota de semillas de 3 a 5 mg

se tomó con una espátula metálica esterilizada, se colocaron en tubos de ensayo de 70 mm de altura y 25 mm de diámetro con 5 ml de solución desinfectante de hipoclorito de sodio comercial 0,5 con el agregado de

Tween 20 (0,1 %) como tensioactivo. La solución con semillas se colocó en un agitador orbital de Kline (Vicking) a 225 rpm, durante 7 min y luego se dejó reposar por 8 min. En la cámara de flujo laminar con una jeringa de 5 ml, se eliminó el excedente de solución; se las enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada, empleando jeringa hipodérmica con aguja (1 ml) esterilizada. Al momento del reposo, todas las semillas precipitaron facilitando de esta manera la extracción de la solución desinfectante y el agua destilada de los enjuagues.

El medio de cultivo empleado fue Muras-hige y Skoog (MS) (16) a la mitad de su concentración, suplementado con 30 g/l de sacarosa, el pH del medio se ajustó a 5,6 – 5,8 previo a la adición de 5 g/l de agar agar. Luego se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 kg cm<sup>2</sup> de presión durante 15 min, fraccionado 10 ml en cada caja de Petri esterilizadas de 5 de diámetro, se les colocó en la base una cuadrícula de 1x1 cm<sup>2</sup> de acetato fijada con cinta adherente transparente para facilitar el posterior recuento de semillas germinadas en tres cuadros seleccionados al azar. En la siembra se empleó una micropipeta, en una dosis de solución de agua y semillas de 0,1 ml/caja. Se utilizaron 8 cajas. Se realizaron 5 recuentos a los 16, 27, 48, 64 y 77 días desde la siembra y se calculó el porcentaje (%) de germinación (protocormos verdes con extrusión de radícula) y el % de protocormos blancos. Tres recuentos se realizaron por caja promediando los resultados. El cultivo se llevó a cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1 °C y un fotoperíodo de 16 h, con luz *grow lux*. En los repiques realizados a los 275 días desde la siembra (dds) se adicionó al medio de cultivo 0,3 g/l de carbón activado (CA) para favorecer el crecimiento de las raíces. El

material obtenido se repicó en tres oportunidades hasta desarrollar plantas completas.

Plantas cultivadas *in vitro* con 493 dds y una altura entre 1,5 y 2 cm fueron seleccionadas, realizando un cuarto repique en siete medios de cultivo, constituidos por concentraciones de sales básicas de MS, suplementadas con sacarosa y dos fertilizantes comerciales según se detalla en la Tabla 1. A los 53 días después del último repique, se cuantificó el número de hojas y raíces por planta y peso fresco de las fracciones hojas y raíces del total de plantas desarrolladas en los siete medios de cultivo, posteriormente se llevó a estufa por 48 horas y se determinó el peso seco total por tratamiento.

Para iniciar la etapa de aclimatación se seleccionaron plantas obtenidas *in vitro* con tiempos de 457, 498 y 629 dds, en tres fechas diferentes, dos en época primaveral (19/09/13 y 30/10/13) y la restante en otoño del siguiente año (11/03/14). Al momento inicial, en un número de 7 a 10 plantas, se registró el número y longitud de hojas y raíces. Los valores medios de cada variable y fecha, fueron evaluados mediante el test T para muestras independientes ( $p < 0,05$ ) (17). Cuatro sustratos fueron utilizados, dos preparados (P1; P2) y dos comerciales (C1; C2), según se detalla en la Tabla 2.

La cascara de pino finamente composta es un producto regional proveniente de un vivero comercial ubicado en Puerto Yerúa (Entre Ríos) y la cáscara de arroz carbonizada también es un subproducto de la industrialización del arroz, al cual se le hace un proceso de combustión incompleta para su uso como sustrato. Los sustratos preparados (P1 y P2) en proporciones vol/vol, previa homogenización manual, se distribuyeron en bandejas multicelda hasta enrase, con dos o tres piedras mora en la base para facilitar el drenaje.

**Tabla 1.** Medios de cultivo empleados para los 6 tratamientos (T) y el testigo (T0), utilizando sales básicas de Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa.

| Componentes                           | T0   | T1       | T2   | T3   | T4   | T5   | T6   |
|---------------------------------------|------|----------|------|------|------|------|------|
| MS [ ]                                | 1/2  | completo | 1/2  | 1/2  | 1/2  | --   | --   |
| Azúcar refinada(g L-1)                | 15   | 30       | 30   | 15   | 15   | 15   | 15   |
| Peter 20: 20: 20(g L-1)               | --   | --       | --   | 1    | --   | --   | --   |
| Peter 20: 20: 20(g L-1)               | --   | --       | --   | --   | --   | 1    | --   |
| + Micronutrientes(g L-1)              | --   | --       | --   | --   | --   | 1    | --   |
| Nuquífol *(mL L-1)                    | --   | --       | --   | --   | 3,5  | --   | 3,5  |
| pH                                    | 5,69 | 5,70     | 5,72 | 5,63 | 6,36 | 5,65 | 6,43 |
| Conductividad eléctrica ( $\mu$ S/cm) |      |          |      | 3750 | 3230 | 1040 | 771  |

**Tabla 2.** Composición de los sustratos utilizados para la siembra de plantas de *P. concreta* en bandejas multiceldas.

| Sustrato  | Composición   |
|-----------|---|
| Preparado | <b>P1</b> Cascara de pino finamente compostada, turba de Sphagnum, tierra fértil y perlita (1:1:1:1)  |
|           | <b>P2</b> Cáscara de pino finamente compostada, cáscara de arroz carbonizada y perlita (2:1:1)  |
| Comercial | <b>C1</b> Mezcla especial para plantas de interior (TerraFértil®) compuesto por compost orgánico, turba de Sphagnum, acícula de pino, resaca de río y perlita, según marbete. |
|           | <b>C2</b> SuperResaca® ((TerraFértil®) compuesto por compost orgánico, acícula de pino y resaca de río según marbete.   |

En los dos primeros casos (primavera) se procedió a la extracción de plantas de los frascos, se lavaron con agua para retirar restos de medio de cultivo y se registró el número y longitud de hojas, y el número y longitud de raíces, en 8 y 10 plantas al azar respectivamente. Las plantas se dejaron en bandeja con agua destilada a humectación durante 48 horas y luego se llevaron a bandeja multicelda, dos plantas por celda

empleando el sustrato preparado denominado P1. Durante dos semanas se dejaron en condiciones de laboratorio con luz difusa y riego periódico, luego se llevaron al umbráculo del invernadero. El número inicial de plantas trasplantadas fue de 17 para la primera fecha y de 40 en la segunda.

Por otra parte, en la fecha de extracción del 11/03/14 (otoño) se procedió a lavar las plantas con abundante agua destilada

y luego se clasificaron por tamaño. Aquellas menores a 3 cm se dejaron en vasos de poliestireno expandido (marca comercial Telgopor) sobre sustrato de piedra negra partida húmedo. Se acondicionaron cinco macetas plásticas (5,5 cm de diámetro y 5,5 cm de alto) con sustrato de piedra negra partida en la base (1 cm aproximadamente), sustrato P2, unos 2 cm, luego se mojó con pulverizador manual y sobre el sustrato se colocaron las plantas de *P. concreta* en grupos de 2 o 3 con sus raíces envueltas firmemente en musgo de *Sphagnum* húmedo. Nuevamente se regaron con rociador y se colocaron en una bandeja con alveolos y tapadas con una bolsa de nylon. Setenta y dos plantas > a 3 cm se montaron sobre sustratos en bandejas multicelda (4 cm de diámetro y 6 de profundidad). Previamente se seleccionaron 7 plantas y se midió número y longitud de hojas y raíces. En cada bandeja (24 celdas) se colocó dos a tres piedras negra partida en el fondo para evitar la pérdida de sustrato y se llenaron al ras con 3 sustratos diferentes, P2, C1 y C2.

El trasplante se realizó manualmente colocando una planta por celda y tapando las raíces con el sustrato correspondiente. Luego cada bandeja multicelda se colocó dentro de otra más grande con 1 cm de agua en el fondo y se taparon con plástico transparente permitiendo la entrada de aire. Permanecieron en estas condiciones durante 1 semana, en laboratorio con luz difusa. Luego se retiraron de la bandeja con agua y se dejaron en laboratorio durante 3 semanas más; con riegos periódicos empleando un pulverizador manual, concluida esta etapa se las llevó a invernáculo. A los 30, 60 y 90 días se registró altura y número de hojas por planta y se calculó el porcentaje de sobrevivencia, en

función del número inicial de plantas de cada tratamiento.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Germinación *in vitro*

El porcentaje de germinación máximo se observó a los 48 días (97 %). En los últimos dos recuentos dicho valor se vio disminuido significativamente un 35 y 22 %, respectivamente, por el cambio de estado de los protocormos verdes que pasaron a blancos y detuvieron su crecimiento, por lo que se consideró como protocormos muertos. Este fenómeno es común que ocurra en las etapas de germinación de las semillas de orquídeas, por efecto de la concentración de hipoclorito de sodio empleado en el proceso de desinfección previa a la siembra, tal como fue demostrado para otras especies (9, 18, 19).

El valor alto de germinación registrado indica la buena calidad fisiológica de la semilla y que el medio utilizado actuó favorablemente en su expresión.

#### 3.2. Cultivo *in vitro*

Los protocormos verdes ( $0,067 \pm 0,01$  mm de diámetro) desarrollaron plantas completas de 1 cm de altura, con 1 a 2 raíces verdes de 0,5 cm de longitud a los 275 dds, plantas que fueron repicadas a 7 medios de cultivo (Figura 2).

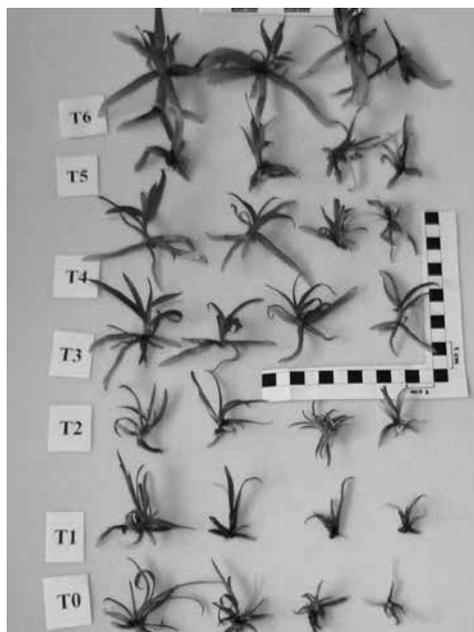
A los 53 días desde el repique las plantas del ensayo con fertilizantes comerciales en medios de cultivo manifestaron diferencias (Fig. 3) en las fracciones peso seco de raíz por planta (PSR/Planta) respecto del peso seco de hoja por planta (PSH/Planta). Los tratamientos T3 y T4 presentaron los mejores desarrollos de plantas con un crecimiento equilibrado de hojas y raíces (Figura 3 y 4). En el tratamiento 6 donde el medio solo contó con el fertilizante Nuquifol®, se

observó un mayor crecimiento en longitud y biomasa de la fracción raíz (Fig. 4). Por otra parte, se manifestó para este tratamiento la menor relación entre ambas fracciones. Para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 se observó un equilibrio entre PSH/Planta y PSR/Planta, al igual que en testigo, pero éste de menor magnitud (Fig. 4).

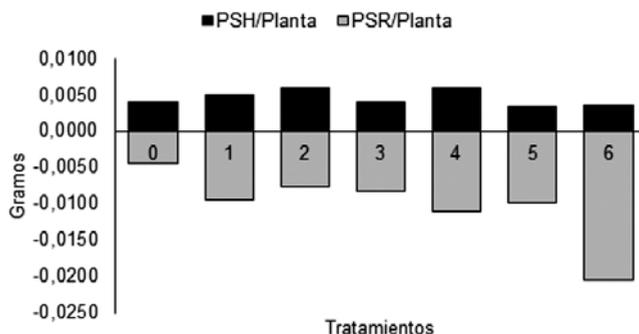
**Figura 2.** Plantas repicadas (275 días de cultivo) en siete tratamientos utilizando combinaciones de sales básicas de Murashige y Skoog (MS) y dos tipos de fertilizantes (Ver referencias Tabla 1)



**Figura 3.** Crecimiento de las plantas a los 53 días después del repique (574 días de cultivo) para los 7 tratamientos (Ver referencias Tabla 1). T0 (testigo)



**Figura 4.** 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 1). T0 (testigo). Los valores negativos deben leerse como positivos.

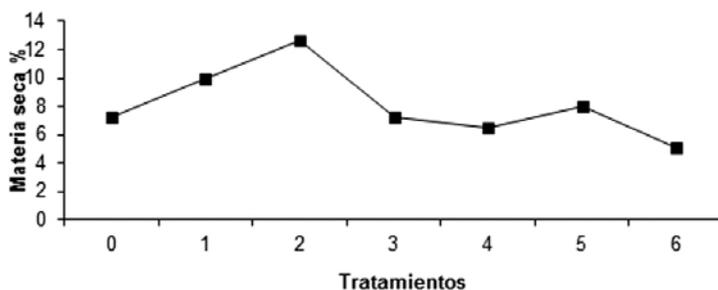


Respecto al porcentaje de materia seca de las plantas completas, al final del ensayo, se observó en los tratamientos 1 y 2 mayores porcentajes respecto al resto de los tratamientos (Fig. 5). Los otros tratamientos 3 al 6 presentaron bajos valores (5 a 7 %).

En cuanto al número de hojas y de raíces los datos presentaron elevado desvío estándar y no se evidenciaron diferencias entre los tratamientos (Tabla 3). Los tratamientos T3,

T4 y T6 manifestaron mayor longitud de raíces con diferencias significativas con el resto de los tratamientos, En el caso de la longitud de las hojas el T3, T4 y T1, presentaron mayor crecimiento y difieren significativamente con el resto de los tratamientos (Tabla 3), lo cual indica que el agregado de fertilizantes a los medios de cultivo o la utilización del medio M y S completo (T1) produjo mayor crecimiento en longitud de hoja y raíces.

**Figura 5.** Porcentaje de materia seca de la planta completa según los tratamientos de medio de cultivos (ver referencias Tabla 1). T0 (testigo)



**Tabla 3.** Valores medios del número de hojas y raíces; promedio y desvío estándar de longitud de hojas y raíces de plantas de *P. concreta* a los 53 días de crecimiento en 7 medios de cultivo (ver referencias de tratamientos en Tabla 1). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Coeficiente de variación 21,41%

| Tratamientos | n  | Nº hojas  | Nº raíces | Longitud (mm)  |               |
|--------------|----|-----------|-----------|----------------|---------------|
|              |    |           |           | Hojas          | Raíces        |
| 0            | 18 | 5,61±2,15 | 3,22±1,00 | 13,54±3,23 ab  | 10,31±4,20 a  |
| 1            | 17 | 4,41±1,46 | 3,88±1,36 | 16,87±3,09 c   | 11,75±3,81 ab |
| 2            | 16 | 5,19±1,83 | 4,06±1,53 | 15,21±3,32 abc | 8,84±3,45 a   |
| 3            | 19 | 6,00±1,11 | 4,26±1,66 | 16,32±3,45 bc  | 15,57±3,77 bc |
| 4            | 20 | 5,80±1,61 | 4,25±1,29 | 16,82±3,45 bc  | 16,03±4,48 bc |
| 5            | 12 | 4,17±1,59 | 4,25±2,22 | 12,33±2,68 a   | 9,63±4,74 a   |
| 6            | 19 | 5,37±1,67 | 4,42±1,26 | 12,51±2,87 a   | 19,84±4,88 c  |

### 3.3. Aclimatación

En el tamaño inicial de las plantas de cada ensayo de aclimatación (Tabla 4) se pueden apreciar algunas diferencias significativas entre las fechas de primavera y otoño. La prueba de T para muestras independientes ( $p < 0,05$ ) indicó que con respecto al número de hojas no se encontraron diferencias significativas entre fechas, pero sí en la longitud de hojas, número de raíces y longitud de raíces (Tabla 4). En general se observa que las muestras de la fecha 2 (primavera) presentan los menores valores medios en todas las variables. Las plantas de las fechas 1 y 3 presentan diferencias significativas en cuanto la longitud de hojas y número de raíces. Las plantas de la primera fecha presentaron mayor desarrollo de raíces (número y longitud), pero menor desarrollo de la parte aérea, mientras que las de otoño presentaron un crecimiento más equilibrado (longitud de hojas/raíces).

Para el caso de las plantas extraídas el 19/09/13, se inició con 17 plantas y al mes se observó una supervivencia de 35 %.

Para las plantas extraídas el 30/10/13 se comenzó con 40 plantas y al mes se obtuvo una supervivencia de 7,5 %. En ambas situaciones se dio por finalizado el ensayo al transcurrir dos meses de comenzado el mismo por pérdida total de plantas.

En el caso de las plantas extraídas el 11/03/14, transcurrido un mes de aclimatación se observó en la bandeja con sustrato P2 19 plantas muertas. En los demás sustratos, la supervivencia fue de 100 %, y las plantas en el sustrato C1 manifestaron más vigor y coloración que en el C2 (Fig. 6).

A los 60 días de iniciado el proceso de aclimatación la supervivencia fue de 0 % para el sustrato preparado (P2) y de 100 % para los sustratos comerciales (C1 y C2). La última observación (90 días) la situación se mantuvo prácticamente igual registrándose 2 plantas muertas en el sustrato C2, por lo tanto la supervivencia fue de 91,6 % y se mantuvo en 100 % para el C1, observándose una mejor calidad y aspecto de las plantas en el sustrato C1 (Tabla 5 y Figura 6).

Una de las principales características de los sustratos comerciales (C1 y C2) es que en su composición tienen un alto contenido de materiales orgánicos estabilizados (compost orgánico, resaca de río, acícula de pino) lo cual podría estar favoreciendo

el crecimiento de estas plantas que en su hábitat natural crecen sobre sustrato orgánico (hojarasca, restos vegetales) o generalmente enraizada entre musgos o líquenes sobre rocas o ramas en ambientes boscosos (4).

**Tabla 4.** Datos promedio y desvío estándar del número y longitud de hojas y raíces de las plantas de *P. concreta* para el proceso de aclimatación

|          | n  | N° hojas    | Longitud de hoja (mm) | N° raíces   | Longitud de raíces (mm) |
|----------|----|-------------|-----------------------|-------------|-------------------------|
| 19/09/13 | 8  | 5,88 ± 0,64 | 17,36 ± 3,63          | 6,38 ± 2,00 | 33,03 ± 15,03           |
| 30/10/13 | 10 | 5,80 ± 0,79 | 18,09 ± 4,20          | 3,60 ± 1,07 | 19,08 ± 11,50           |
| 11/03/14 | 7  | 6,71 ± 1,60 | 35,00 ± 9,13          | 4,14 ± 1,57 | 30,71 ± 7,32            |

**Pueba T para muestras independientes**

| Fecha | N° hojas  | Longitud de hoja | N° raíces | Longitud de raíces |
|-------|-----------|------------------|-----------|--------------------|
| 1     | 1 vs 2 ns | 1 vs 2 ns        | 1 vs 2 *  | 1 vs 2 *           |
| 2     | 1 vs 3 ns | 1 vs 3 *         | 1 vs 3 *  | 1 vs 3 ns          |
| 3     | 2 vs 3 ns | 2 vs 3 *         | 2 vs 3 ns | 2 vs 3 *           |

ns: no significativo, \*significativo ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 5.** Datos promedios y desvío estándar de la altura de plantas y numero de hojas de *P. concreta* en tres sustratos a los 30, 60 y 90 días de aclimatación

|         | Sustrato | n  | Altura      | N° hojas    |
|---------|----------|----|-------------|-------------|
| 30 días | P2       | 5  | 2,40 ± 0,42 | 2,80 ± 1,09 |
|         | C1       | 24 | 2,77 ± 0,85 | 5,08 ± 2,14 |
|         | C2       | 24 | 2,58 ± 0,96 | 4,41 ± 1,58 |
| 60 días | P2       | 0  | -           | -           |
|         | C1       | 24 | 2,08 ± 1,02 | 4,46 ± 0,88 |
|         | C2       | 24 | 1,98 ± 0,88 | 3,58 ± 0,88 |
| 90 días | P2       | 0  | -           | -           |
|         | C1       | 24 | 2,48 ± 0,98 | 3,96 ± 1,00 |
|         | C2       | 22 | 2,20 ± 0,72 | 2,68 ± 0,72 |

**Figura 6.** Estado de las plantas de *P. concreta* a los 90 días de cultivo en condiciones de invernáculo en los sustratos P2, C1 y C2 (ver características en Tabla 2)



## 6. Conclusiones

La semilla mostró un alto poder germinativo a los 48 días en cultivo axénico.

El cultivo *in vitro* se realizó sin problemas de contaminación obteniendo al cabo de 457 días plantas aptas para el proceso de aclimatación.

El agregado de fertilizantes inorgánicos al medio de cultivo básico o fertilizantes más MS a la mitad de su concentración, permitió un crecimiento de las plantas de *P. concreta*, con predominio de mayor biomasa radical y menor porcentaje de materia seca.

Los sustratos preparados usados en época primaveral y otoñal no ofrecieron las condiciones necesarias para lograr la sobrevivencia de plantas de *P. concreta* cultivadas *in vitro*. Si lo hicieron los dos sustratos comerciales empleados en época otoñal, donde se logró más del 90 % de sobrevivencia a los 90 días del trasplante en condiciones de invernáculo. De los sustratos ensayados, en época otoñal los que presentaron mejor performance contienen alta proporción de materiales orgánicos.

Las plantas soportaron bien el proceso de aclimatación, aun con las bajas temperaturas invernales.

## Agradecimiento

El presente trabajo fue financiado por un PID-UNER N° 2144: Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*.

## Referencias bibliográficas

1. Vásquez, R. y Ibish, P. L. (eds.), 2004. Orquídeas de Bolivia. Diversidad y estado de conservación / Orchids of Bolivia. Diversity and conservation status. Vol. II. Ed. FAN, Bolivia. 649 pp.
2. Insaurralde, I; Radins, J., 2007. Misiones Orquídeas – orchids. 1ra Ed. Editorial Golden Company. Buenos Aires, 192 pp.
3. Schinini, A., 2010. Orquídeas nativas del Paraguay. *Rojasiana* 9: 11–292.
4. Johnson, A. E., 2001. Las orquídeas del Parque Nacional de Iguazú. LOLA (Argentina) 296 pp.
5. Lallana, V., 2012. Conservación de orquídeas nativas de la provincia de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos "in vitro". 3er. Congreso de Orquideología, Conservación y Bromeliáceas. Resúmenes de trabajos y Ponencias pp. 13–16. Montecarlos, Misiones 18, 19, 20, 21 de julio.
6. Lallana, V.; Billard C., 2009. Propagación de cuatro especies y tres híbridos de orquídeas por técnicas de cultivo "in vitro" hasta la etapa de aclimatación. Libro de Resúmenes. V Jornada

- de Comunicación de Producciones Académicas y Científicas en Biología – Facultad de Ciencia y Tecnología – UADER. Paraná, 12 de noviembre de 2009. p. 40 (CD–Rom).
- 7.** Dalzotto, C., 2013. Efecto de medios de cultivos en el crecimiento *in vitro* de *Oncidium bifolium* Sims. "federal". Rev. Cien. Agrop. RCA **17**(1–2):7–15.
- 8.** Lallana, V.; Billard, C.; Klug, L., 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.
- 9.** Dalzotto, C; Lallana, V., 2013. Viabilidad, germinación asimbiótica y vigor de tres especies de orquídeas nativas. Rev. Cien. Agrop. RCA **17**(1–2):39–47.
- 10.** Billard, C.; Dalzoto, C.; Lallana, V., 2013. Germinación de *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. en medio líquido y evolución de plantas en medio semisólido. Investig. Agrar. **15**, 1:7–14.
- 11.** Barsanti, M. V. y 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. Vol. II, pp. 1053–1054
- 12.** Tardeu de Faria, R; Durigan Salio, R.; Uнемoto, 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.
- 13.** Mweetwa, A.; Welbaum G.; Tay, D., 2008. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on in vitro germinability of *Phalaenopsis* seeds. Sci. Hort., **117**:257–262.
- 14.** 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].
- 15.** Billard, C. E.; Dalzotto, C. A.; Lallana, V. H., 2014. Desinfección y siembra de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. Polibotánica **38**:69–81.
- 16.** Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phy. Plant. **15**:473–497.
- 17.** Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2012, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- 18.** Salazar – Mercado, SA, 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). Acta Agronómica. **61**(1):69–78.
- 19.** Dalzotto, C. A.; García, L. F.; y Lallana, V.H. 2013. Efecto del pretratamiento con hipoclorito de sodio en la prueba de viabilidad de semillas de *Oncidium bifolium* Sims. En: I Congreso Brasileiro de Produção de Orquídeas. Fortaleza, Brasil. 05 al 10 de marzo de 2013. Resumen expandido, pp. 42–44. Edición CD–ROM.