

Germinación de *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. en medio líquido y evolución de plantas en medio semisólido

Germination of *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. in liquid medium and plant evolution in semi-solid medium

Cristina Ester Billard^{1*}, Carlos Alberto Dalzotto² y Víctor Hugo Lallana¹

¹ Cátedra Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER). Ruta 11, Km 10,5. (3101) Oro Verde, Paraná, Entre Ríos, Argentina.

² Becario de Iniciación en la Investigación del PID-UNER 2144, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER.

*Autor para correspondencia (cbillard@fca.uner.edu.ar).

Recibido: 30/10/2012; Aceptado: 24/04/2013.

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar a) la germinación "in vitro" de semillas de *Bletilla striata* en medios líquidos y b) el crecimiento "in vitro" en medio de cultivo semisólido hasta la rusticación. Se utilizaron semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio (0,5%) y 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. Los tratamientos fueron: T1 (agua destilada) y T2 (medio de cultivo líquido de Murashige & Skoog (MS), a la mitad de la concentración + 30 g L⁻¹ de sacarosa). A los 49 días después de la siembra (dds) se evaluaron los estadios de desarrollo y cantidad de semillas germinadas y no germinadas. Los explantos del T2 se repicaron a un medio de cultivo semisólido de MS a la mitad de su concentración. Se los clasificó en Grupo (G): G1: protocormos; G2: protocormos con 1 a 2 hojas apenas visibles y G3: plántulas con 2 a 3 hojas pequeñas con 1 raíz. Se cultivaron en cámara de crecimiento a 24 ± 1°C y fotoperíodo de 16 h. Luego de 5 meses de cultivo las plantas fueron establecidas "ex-vitro" con sustrato de cáscara de pino, carbón vegetal y musgo de sphagnum en partes iguales. La visualización de embriones verdes comenzó a partir de los 17 dds. La germinación a los 49 dds, en T1 y T2 fue de 23% y 100%. Luego de 156 días de cultivo "in vitro" la mejor tasa de multiplicación de vástagos vegetativos (66%), de vástagos con pseudobulbos (77%) y 23 mm de altura de plantas se logró a partir de plántulas del G3. Se logró la supervivencia de las plantas "ex vitro" sin problemas de muerte o pérdida por ataque de patógenos.

Palabras clave: Orquídea terrestre, germinación, cultivo axénico, tasa de multiplicación.

ABSTRACT

The aims of this work were to evaluate a) *in vitro* germination of *Bletilla striata* seeds in liquid media and b) *in vitro* growing in semi-solid culture medium until rustication. *B. striata* seeds were disinfected with 0.5% sodium hypochlorite and rinsed 3 times with sterilized distilled water. Two treatments were applied: T1 (distilled water) and T2 (Murashige & Skoog (MS) liquid culture medium, half its concentration + 30 g L⁻¹ of saccharose). Forty nine days after sowing (das), the growing stages and quantity of germinated and non-germinated seeds were evaluated. T2 explants were subcultivated to a semi-solid culture medium at half its concentration. They were classified in Group 1: protocorms; Group 2: protocorms with 1 to 2 slightly visible leaves and Group 3: seedlings with 2 to 3 small leaves and 1 root. They were cultured in growth chamber at 24 ± 1°C and a photoperiod of 16 h. After 5 growing months, plants were established *ex-vitro* in trays with equal parts of pine bark substrate, vegetal carbon and sphagnum moss. Green embryos became visible 17 das. After 49 das, germination percentage was 23% and 100% in T1 and T2 respectively. After 156 days of *in vitro* culture, the best multiplication rate of vegetative shoots (66%), shoots with pseudobulbs (77%) and 23 mm of plant height was achieved in Group 3 seedlings. *Ex-vitro* plants survived without death or pathogen attack problems.

Key words: Terrestrial orchids, germination, axenic culture, multiplication rate.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Orchidacea se encuentra a *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f., especie terrestre, originaria de Japón y algunas regiones de China (Gibson 2000), que se cultivan comúnmente en jardines de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Una característica es el plegado de sus hojas, que son estriadas (marcados con bandas paralelas o líneas), con nervaduras claras que se alternan con tejido verde. La planta crece a menos de 50 cm de altura con cuatro a seis hojas por tallo. La flor tiene cuatro polinios por anteras y la inflorescencia es terminal. El crecimiento de *B. striata* es determinado (primavera – verano), viviendo sólo una temporada de cultivo para luego perder la parte aérea (otoño – invierno), por lo cual es una orquídea de hoja caduca, herbácea perenne y geófito (terrestre). Crece a través de rizomas cortos de los que forma un pseudobulbo blanco. Las raíces adventicias fibrosas que surgen de todas partes del cormo y los nuevos brotes están conectados por rizomas cortos, cilíndricos (Gibson 2000). Las flores según las especies pueden ser de color fucsia o blanco. Es una de las primeras orquídeas que se documentó para uso medicinal (Reinikka 1995).

Es escasa la bibliografía encontrada en lo que respecta al cultivo “in vitro” de *B. striata*, quizás a causa de su fácil reproducción vegetativa por división de sus pseudobulbos (Gibson 2000). Rodríguez et al. (2001), trabajaron con semillas provenientes de cápsulas cerradas, utilizando carbón activado para inducción de la germinación debido a que este tipo de semillas liberan sustancias fenólicas al medio de cultivo. Además, trabajaron con otra especie de orquídea terrestre (*Oeceoclades*), colocando sus semillas en la oscuridad para favorecer la germinación, la cual ocurrió a las 24 semanas, formó pequeños callos verdes y compactos que dieron lugar a las plantas que necesitan medios de cultivos más complejos para su evolución. Arditi y Ernest (1993) indican que las especies con hábitat terrestre, germinan y desarrollan “in vitro” más lento que las epífitas.

Gayá Suñer (1995) cultivó semillas de las especies *Spiranthes spiralis* y *Bletilla striata* las que germinaron a los 30 y 7 días respectivamente. Las semillas de *B. striata* lograron un 99% de germinación mientras que *S. spiralis* sólo el 25%. *B. striata* tuvo un alto grado de supervivencia (95%) en la etapa de aclimatación (“ex vitro”).

La mayoría de las semillas de orquídeas carecen totalmente de endosperma al lado del embrión (Pierik 1990), pero en algunas del género *Bletilla* las células del endosperma persisten dentro de ellas lo cual puede facilitar el proceso de germinación natural de esta especie (Gibson 2000).

Los objetivos de esta investigación fueron: a) evaluar la

germinación “in vitro” de semillas de *Bletilla striata* en medios líquidos y b) evaluar el crecimiento “in vitro” de plantas de *B. striata* en medio de cultivo semisólido hasta la etapa de rusticación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germinación “in vitro”

Se trabajó con semillas del Banco de Germoplasma (PID-UNER 2144) provenientes de un conjunto de cinco frutos cosechados en condiciones naturales (7/01/11) y conservadas en heladera (3–4°C) en envases herméticos hasta la fecha de siembra (20/12/11).

Se procedió a la desinfección de las semillas, teniendo en cuenta la agitación de las mismas en la solución desinfectante propuesto por Mweetwa et al. (2008) y la utilización de jeringa para la desinfección y posterior siembra en el medio de cultivo líquido esterilizado (McKendrick 2000). Para ello se tomó una alícuota de aproximadamente 4 a 10 mg, con ayuda de una espátula metálica esterilizada y se las colocó en tubos de ensayo de 7 cm de altura con 5 mL de solución desinfectante (hipoclorito de sodio) en una concentración de producto comercial de 0,5%; con el agregado de Tween 20 (0,1%). Los tubos se colocaron en agitador orbital de Kline (Vicking) a 225 rpm durante 7 minutos y luego se dejaron reposar por 8 minutos. Las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, pasando entre enjuagues 3 minutos, empleando para extraer la solución jeringas con aguja de 1 ml.

En la siembra “in vitro” se evaluaron dos tratamientos (T): T1 (siembra en agua destilada) y T2 (siembra en medio líquido de Murashige & Skoog -MS- 1962, a la mitad de la concentración suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa; pH 5,6 – 5,8). Se emplearon cuatro frascos por tratamiento con 20 mL de agua o medio de cultivo, empleando para la siembra una micropipeta automática regulable en una dosis de 0,1 mL de solución con semillas. Ambos medios se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 kg cm⁻² de presión durante 15 minutos. La desinfección y siembra de las semillas se efectuó en cámara de flujo laminar horizontal.

A los 49 días después de la siembra (dds) se efectuaron observaciones cualitativas de los estadios de desarrollo (semillas sin germinar, embriones verdes, protocormos con una hoja, dos hojas y rizoides y plántulas) y se efectuó el recuento, bajo lupa, de semillas germinadas (color verde) y no germinadas (color pardo claro) del total de frascos de cada tratamiento. Para ello se procedió a extraer parcialmente el agua destilada o el medio líquido contenido en cada frasco con una jeringa de 1 mL y el

remanente de agua con las semillas se vertió en una caja de petri de 5 cm de diámetro y se continuó extrayendo agua hasta que las semillas quedaran adheridas sobre el vidrio.

Crecimiento "in vitro"

Con los explantos obtenidos en medio líquido (49 dds) se procedió a repicarlos a un medio de cultivo semisólido de MS (1962), a la mitad de su concentración, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 5 g L⁻¹ de Agar Agar Britania; pH 5,6 – 5,8. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C y 1 kg cm⁻² de presión durante 15 minutos.

Los explantos fueron separados en tres Grupos según su desarrollo para su posterior repique: Grupo 1: protocormos; Grupo 2: protocormos con una a dos hojas apenas visibles y Grupo 3: plántulas con dos a tres hojas con una raíz.

Los protocormos provenientes del Grupo 1, debido a su tamaño y cantidad, fueron repicados a cuatro frascos de 5 x 10 cm y a los 49 días después del repique (ddr) se efectuó un segundo repique a 58 tubos de 12 cm de largo con 10 mL de medio semisólido MS, colocando una planta por recipiente y cubriéndolo con doble capa de film de PVC. Mientras que, los Grupos 2 y 3 se repicaron en tubos de ensayo de vidrio de 12 cm de largo, conteniendo 10 mL de medio semisólido MS. Posteriormente todos los materiales repicados de cada grupo se llevaron a cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1°C y un fotoperiodo de 16 horas, con luz grow lux e incandescente.

A los 48 y 91 ddr (Grupo1) y a los 48, 61 y 91 ddr (Grupo2 y 3) se evaluó la altura de vástago aéreo, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces con calibre digital. A los 61 ddr a los datos de los Grupos 2 y 3 se les realizó una Prueba de t (p<0,05).

En los tres grupos a los 91 ddr se observó y registró la cantidad de plantas y el número de plantas con pseudobulbos. Los datos fueron analizados con el programa Infostat (Di Rienzo et al. 2008) mediante estadística descriptiva y tablas de frecuencia.

Rusticación

Las plantas logradas "in vitro" fueron acondicionadas para la etapa de aclimatación "ex-vitro". Para ello se retiraron del medio semisólido un total de 100 plantas, se lavaron sus raíces con agua para eliminar restos de medio y luego se las sumergieron unos minutos en una solución de fungicida (Carbendazim, 0,1 mL L⁻¹). Las plantas se colocaron en forma masiva (cuatro a siete plantas) en recipientes de polipropileno de 6 cm de altura x 8 cm de diámetro que en su interior contenían piedra mora partida de tamaño pequeño hasta ¾ partes de la altura. Una vez completados los vasos, se colocaron en una bandeja, se

aplicó nuevamente el fungicida Carbendazim con aspersor manual, y se los cubrió con una bolsa de nylon para evitar la pérdida de agua por evaporación y lograr un efecto de cámara húmeda. En estas condiciones las plantas permanecieron una semana en laboratorio con luz natural difusa. Posteriormente las plantas fueron transplantadas a bandejas multiceldas que contenían un sustrato conformado por cáscara de pino compostado más carbón vegetal de pequeño tamaño (<1 cm), corteza de pino finamente compostada y musgo de sphagnum triturado en una proporción de 2:1:1 vol/vol. Las plantas en las bandejas multiceldas fueron mantenidas con riegos periódicos en condiciones de laboratorio durante 20 días. Las bandejas multiceldas con tapa plástica permitieron mantener un efecto de humedad continuo. Luego fueron llevadas a umbráculo en invernáculo al aire libre y con la tapa sobreelevada para permitir el intercambio gaseoso, a los 30 días después del transplante se evaluó la supervivencia de las plantas.

RESULTADOS

Germinación "in vitro"

Las semillas de *Bletilla striata*, presentan un color amarillo claro o blanco verdoso. La testa es blanca, brillante, perlada, estriada (estrías paralelas). En la zona del embrión presenta un color verde amarillento. El embrión representa aproximadamente 1/3 de la longitud de la semilla, y se observa de color verde claro o verde amarillento. Las semillas viables logran una adecuada tinción en la prueba de tetrazolio (**Figura 1**).

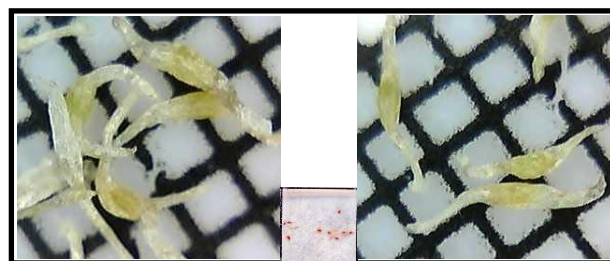


Figura 1. Imágenes (microscopio digital SuperEyes) de semillas de *Bletilla striata*. Cada lado de la cuadrícula debajo de la imagen tiene 1mm. En el centro, semillas viables de color rojo, por tinción con tetrazolio (imagen de escáner, resolución 600 dpi). El marco de la imagen representa un cuadrado de 1 cm de lado.

La visualización de embriones verdes fue a partir de los 17 dds. A los 30 dds se encontraron protocormos con inicio de desarrollo de la yema apical y rizoides (**Figura 2 A**).

A los 49 dds, en el T1 se encontraron semillas no germinadas y germinadas, mientras que en el T2 todas las semillas germinaron (**Tabla 1**). Los tratamientos no presentaron contaminación.

Tabla 1. Porcentajes de germinación de los tratamientos en medio líquido de *Bletilla striata* a los 49 días después de la siembra.

Tratamiento (T)	Semillas no germinadas	Semillas germinadas	Total semillas
T1	97 (77%)	28 (23%)	125
T2	0 (0%)	177 (100%)	177

Las semillas germinaron en ambos medios de cultivo, en agua destilada fue del 23% (semillas con embriones

verdes y protocormos con una hoja) y en el T2 fue de 100%.

El tamaño de los explantos fue mayor cuando fueron cultivados en medio nutritivo (T2), de allí es que se emplearon únicamente estos explantos para el repique, conformando tres grupos: protocormos (Grupo 1); protocormos con una hoja (Grupo 2) y plántula con dos a tres hojas (Grupo 3), que representaron 19, 118 y 40 casos para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente.

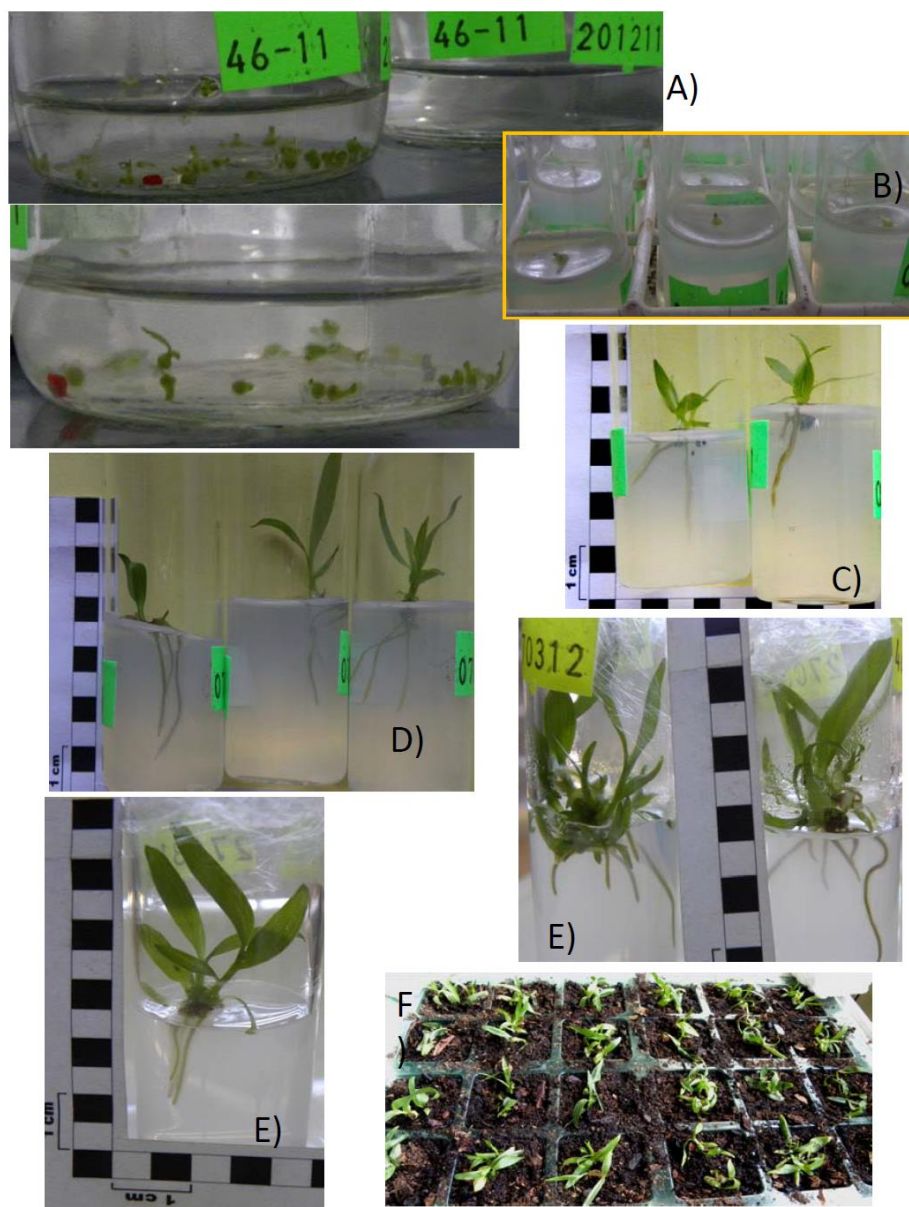


Figura 2. **A)** Germinación en medio líquido de semillas de *B. striata* con y sin nutrientes en el medio (36 días después de la siembra – dds), **B)** Repique de protocormos en medio semisólido (50 dds), **C)** Establecimiento de protocormos – Grupo 1 (48 días después del repique – ddr) y **D)** Establecimiento de protocormos con hojas – Grupo 2 (48 ddr), **E)** Multiplicación de brotes y formación de pseudobulbos y raíces (91 ddr) y **F)** Rusticación de plantas en sustrato (30 días “ex vitro”).

Crecimiento “in vitro”

La evolución del crecimiento de protocormos hasta plántulas en el medio semisólido, provenientes de plantas de los tres grupos (G1, G2 y G3) durante 48, 61 y 91 días después del repique (ddr) se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Evolución del crecimiento en valores medios y desvío estándar para las variables altura, longitud de raíces, número de hojas y raíces a través del tiempo (48, 61 y 91 días después del repique: ddr). Np: número de plantas. A los 61 ddr, letras distintas indican diferencia significativa (p<0,05).

ddr	Grupo	Np	Altura (mm)	Np	Longitud (mm)	Np	Nº hojas	Np	Nº raíces
48	G1	32	8,82 ± 2,82	26	6,43 ± 3,24	32	4,03 ± 1,47	26	1,81 ± 0,69
	G2	15	10,80 ± 4,97	34	11,68 ± 5,94	15	4,73 ± 1,44	14	2,43 ± 0,76
	G3	43	13,28 ± 5,11	99	14,63 ± 6,61	43	3,95 ± 0,84	37	2,51 ± 1,07
61	G1	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
	G2	20	11,63 ± 5,59 a	45	15,12 ± 8,24 a	20	4,05 ± 1,32 a	13	3,46 ± 1,13 a
	G3	45	17,11 ± 6,68 b	128	16,04 ± 9,62 a	45	4,47 ± 1,29 a	37	3,58 ± 1,18 a
91	G1	112	21,26 ± 9,55	270	15,72 ± 7,52	113	4,27 ± 1,55	57	4,74 ± 1,52
	G2	25	16,52 ± 7,71	51	17,85 ± 9,56	13	8,08 ± 3,75	13	3,92 ± 0,76
	G3	53	22,99 ± 9,72	145	17,68 ± 9,51	25	5,24 ± 3,47	36	4,03 ± 1,53

Para los tres grupos todas las variables evaluadas (altura, longitud de raíces, número de hojas y de raíces) evidenciaron crecimiento. El G1 partió de 32 individuos llegando a los 91 ddr a 112.

En el Grupo 1, a los 48 ddr, el 38% de las plántulas presentaban una altura comprendida entre 9,8 – 12,9 mm, el 69% con dos a cuatro hojas, el 50% con 1,7 a 2,3 raíces y el 46% con una longitud de las raíces entre 1,7 y 5,5 mm (**Tabla 3, Figura 2 C**).

Tabla 3. Tabla de frecuencia absoluta (FA) y relativa (FR) y sus límites inferior (LI) y superior (LS) en tres clases para las medidas de altura, número de hojas, de raíces y longitud de raíces de plantas de *Bletilla striata* cultivadas en medio semisólido a los 48 días después del repique (ddr) de plantas provenientes del Grupo 1.

48 ddr	Grupo 1				
	Clase	LI	LS	FA	FR
Altura (mm)	1	3,67	6,75	9	0,28
	2	6,75	9,83	11	0,34
	3	9,83	12,91	12	0,38
Nº hojas	1	2,00	4,00	22	0,69
	2	4,00	6,00	8	0,25
	3	6,00	8,00	2	0,06
Nº raíces	1	1,00	1,67	9	0,35
	2	1,67	2,33	13	0,50
	3	2,33	3,00	4	0,15
Longitud Raíces (mm)	1	1,70	5,53	12	0,46
	2	5,53	9,37	8	0,31
	3	9,37	13,20	6	0,23

La evolución de plántulas en el medio semisólido, provenientes de los Grupos 2 y 3, y sus medidas de

crecimiento registradas a los 48 y 61 ddr se observa en la **Tabla 4**. En el Grupo 2, a los 61 ddr, el 50% de las plántulas presentaban una altura comprendida entre 4,7 y 10,3 mm, el 40% con dos a tres hojas, el 62% con dos a tres raíces y el 51% con una longitud de las raíces entre 2,4 a 14,7 mm. Mientras que para el Grupo 3 y para la misma fecha de observación, el 51% de las plantas presentaban una altura comprendida entre 13,8 y 24,1 mm, 51% con dos a cuatro hojas, 67% con tres a cuatro raíces y el 75% de plantas con una longitud de las raíces comprendido entre 2 y 21,7 mm (**Tabla 4**). A los 61 ddr se comparó el crecimiento de plántulas obtenidas entre el Grupo 2 y Grupo 3. Se hallaron diferencias significativas (p<0,0022) sólo en la variable altura de plantas (parte aérea), en el resto no hubo diferencias (**Figura 3**).

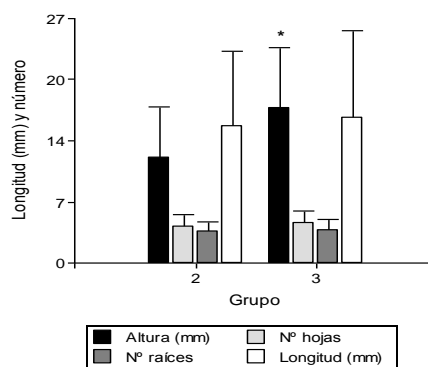


Figura 3. Valores promedio y desvío estándar de las variables altura de plantas; número de hojas y raíces; longitud de raíces a los 61 días después del repique. Grupo 2: protocormos con una a dos hojas apenas visibles (n= 20) y Grupo 3: plántulas con dos a tres hojas con 1 raíz (n= 45). * Indica diferencia significativa (p<0,05) para la variable altura.

Tabla 4. Tabla de frecuencia absoluta (FA) y relativa (FR) y sus límites inferior (LI) y superior (LS) en tres clases para las medidas de altura, número de hojas, de raíces y longitud de raíces de plantas de *Bletilla striata* cultivadas en medio semisólido a los 61 días después del repique (ddr) de plantas provenientes de los Grupo 2 y 3.

61 ddr	Clase	Grupo 2				Grupo 3			
		LI	LS	FA	FR	LI	LS	FA	FR
Altura (mm)	1	4,70	10,37	10	0,50	3,50	13,83	17	3,50
	2	10,37	16,03	5	0,25	13,83	24,17	23	0,51
	3	16,03	21,70	5	0,25	24,17	34,50	5	0,11
Nº hojas	1	2,00	3,33	8	0,40	2,00	4,00	23	0,51
	2	3,33	4,67	5	0,25	4,00	6,00	20	0,44
	3	4,67	6,00	7	0,35	6,00	8,00	2	0,04
Nº raíces	1	2,00	3,33	8	0,62	1,00	2,67	4	0,11
	2	3,33	4,67	3	0,23	2,67	4,33	24	0,67
	3	4,67	6,00	2	0,15	4,33	6,00	8	0,22
Longitud raíces (mm)	1	2,40	14,70	23	0,51	2,00	21,73	96	0,75
	2	14,70	27,00	19	0,42	21,73	41,47	30	0,23
	3	27,00	39,30	3	0,07	41,47	61,20	2	0,02

Transcurridos 91 ddr se analizó el número de vástagos vegetativos y número de vástagos con pseudobulbos en los tres Grupos estudiados. La mejor respuesta, respecto a la multiplicación por formación de múltiples vástagos y el desarrollo de pseudobulbos (**Figura 2 E**) se dio cuando se parte de plántulas con dos a tres hojas con una raíz (Grupo 3) desarrollada en medio líquido (**Tabla 5**).

Tabla 5. Valores finales absolutos y en porcentaje de la tasa de multiplicación y plantas con pseudobulbos obtenidos en los tres grupos (1: protocormos, 2: protocormos con una a dos hojas apenas visibles y 3: plántulas con dos a tres hojas con una raíz) a los 91 días después del repique.

Gru	Nº Plantas iniciales	Nº vástagos vegetativos	Multipli cación (%)	Nº vástagos con pseu dobulbos	Vástagos con pseu dobulbos (%)
1	58	112	52	45	40
2	13	25	52	8	32
3	35	53	66	41	77

A los 91 ddr, las mayores alturas de plantas correspondieron a aquellas que provenían de los Grupos 1 y 3, siendo de 21,2 mm y 22,9 mm, respectivamente. Las plantas obtenidas del Grupo 2 fueron las que presentaron mayor número de hojas por planta (8). En cuanto al número de raíces y longitud de las mismas no difirieron entre los tres grupos estudiados (**Figura 4**).

Rusticación

Con el método empleado para la aclimatación de las plantas, a los 30 días después del trasplante se ha logrado la supervivencia del 100% de las plantas. También se ha observado que todas las plantas presentaban pseudobulbo bien desarrollado y el 34% de las mismas con presencia de hojas senescentes, pero con los pseudobulbos de color verde (**Figura 2 F**). El proceso

de obtención de plantas desde germinación hasta la etapa de rusticación tuvo una duración de 156 días.

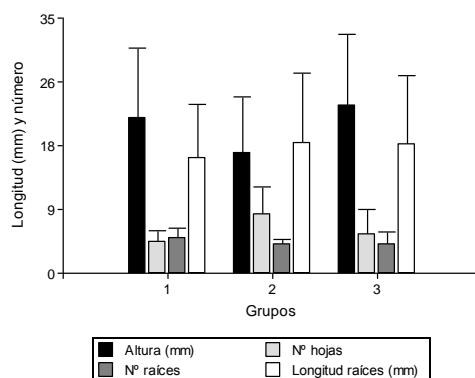


Figura 4. Valores promedios y desvío estándar de las variables altura de plantas; número de hojas y raíces; longitud de raíces a los 91 días después del repique. Grupo 1: protocormos (n= 112), Grupo 2: protocormo con una o dos hojas apenas visibles (n= 25), Grupo 3: plántulas con dos a tres hojas con una raíz (n= 53).

DISCUSIÓN

El tiempo para el inicio de la germinación en orquídeas terrestre varía según la especie. En esta investigación con *Bletilla striata* se observó embriones verdes a los 17 días en medio líquido de MS a la mitad de la concentración, mientras que Gayá Suñer (1995) obtuvo la germinación a los siete días en medio de cultivo semisolido MS con el agregado de 0,5 ppm de quinetina o con 0,5 ppm 6 – bencilaminopurina. Para *Phragmipedium longifolium* y *P. pearcei* ocurrió entre los 14 a 21 días (Muñoz y Jiménez 2008); *Oeceoclades maculata* a los 168 días (Rodríguez et al. 2001); *Aplectrum hyemale* a los 30 días (Lauzer et al. 2007).

Los distintos estados de desarrollo de los explantos de la especie en estudio no mostraron diferencias de crecimiento a los 60 y 90 ddr, en cuanto al número de hojas y raíces y longitud de raíces, sólo los de mayor tamaño inicial (Grupo 3), presentaron diferencias significativas en la altura de plantas respecto al Grupo 2.

La diferencia más importante se halló en la tasa de multiplicación de vástagos vegetativos con valores mayores al 50% y sin el agregado de hormonas inductoras en el medio de cultivo, lo cual indicaría una alta tasa de multiplicación vegetativa de esta especie desde los inicios de su desarrollo.

Como está ampliamente probado para numerosas especies de orquídeas el medio MS a la mitad de la concentración es utilizado con éxito para la etapa de germinación (Arditti y Ernst 1993; Flachslan et al. 1996; Kitsaki et al. 2004; Flores – Escobar et al. 2008; Rodríguez et al. 2001, 2005). En este trabajo se utilizó el medio de MS líquido a la mitad de la concentración, demostrando que es posible la germinación de *B. striata* en estas condiciones. En agua destilada estéril la germinación fue menor, lo cual demuestra que esta semilla tiene algo de reserva en su endospermo que le permite iniciar el proceso de germinación en ausencia de nutrientes en el medio tal como lo señala Gibson (2000).

Los resultados aquí presentados demuestran que *B. striata* no tendría impedimentos físicos en su testa que limiten la entrada de agua y nutrientes. Por lo contrario Lauzer et al. (2007), demostró para *Aplectrum hyemale* (Muhl. Ex Willd.) Torr (orquídea terrestre) que la testa limita la germinación.

Gayá Suñer (1995), en una prueba de aclimatación con *B. striata* obtuvo a los 30 días, el 95% de las plántulas enraizadas y rebrotadas, adoptando un color verde intenso, resultados muy similares a lo logrado en este trabajo.

CONCLUSIONES

La germinación de semillas en medio líquido enriquecido con nutrientes fue posible en *B. striata*, permitiendo seleccionar plantas en distintos estados de desarrollo para su repique en medio semisólido.

La evolución de las plantas en medio semisólido fue mejor cuantitativamente, cuando se parte de plántulas con dos hojas, obteniendo una mayor tasa de multiplicación.

En condiciones “ex vitro” se logró la supervivencia de las plantas sin problemas de muertes o pérdidas por ataques de patógenos.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Entre Ríos en el marco del PID UNER 2144.

A Luz García por los ensayos de viabilidad y fotos de semillas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arditti, J; Ernst, R. 1993. Micropropagation of Orchids. New York, John Wiley & Sons. 640 p.

Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA. Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.

Flachslan, E; Terada, G; Rey, H; Mroginski, L. 1996. Medios de cultivo para la germinación “in vitro” de 41 especies de orquídeas. FACENA 12: 93-100.

Flores-Escobar, G; Legaria-Solano, JP; Gil-Vásquez, I; Colinas-León, MT. 2008. Propagación “in vitro” de *Oncidium stramineum* Lindl: una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo, Serie Horticultura 14(3):347-353.

Gayá Suñer, T. 1995. Cultivo “in vitro” de orquídeas. Hort 108:99-100.

Gibson, A. 2000. Plant Novelties: *bletilla striata* (en línea). Spring 3(2). Consultado 06 de feb. 2012. Disponible en <http://www.botgard.ucla.edu/bg-home.htm>

Kitsaki, CK; Zygouraki, S; Ziobora, M; Kintzios, S. 2004. “In vitro” germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). Plant Cell Rep 23:284-290.

Lauzer, D; Renaut, S; St-Arnaud, M; Barabe, D. 2007. “In vitro” asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. Ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). Journal of the Torrey Botanical Society 134 (3):344-348.

Mc Kendrick, S. 2000. Manual para la germinación “in vitro” de orquídeas (en línea). Consultado 03 sep. 2009. Disponible en [www.ceiba.org/documents/CFTC_propman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTC_propman(SP).pdf).

Muñoz, M; Jiménez, V. 2008. Capsule development, “in vitro” germinación and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. Lankesteriana 8(2):23-31.

Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15:473-497.

- Mweetwa, AM; Welbaum, GE; Tay, D. 2008. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on "in vitro" germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Scientia Horticulturae* 117:257-262.
- Pierik, RLM. 1990. Cultivo "in vitro" de las plantas superiores. Mundi Prensa, Madrid, p.301.
- Reinikka, MA. 1995. A history of the Orchid. Portland OR, Timber Press.
- Rodríguez, L; Valles, JR; González, R; Alvarado, K; Telles, E; Díaz, A; Sánchez, E. 2001. Germinación asimbiótica "in vitro" de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. *Bioteología Vegetal* 1(2):115-116.
- Rodríguez, L; González, R; Díaz, A; Fajardo, E; Sánchez, E; Hernández, J; Castañeira, MA; De La Cruz, G; González, J. 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas (en línea). Consultado 01 sep. 2011. Disponible en www.dama.gov.co.