

Floración, fructificación y producción de semillas en plantas de *Polystachya concreta* (Jacq.) Garay y H.R. Sweet (Orquidaceae)

Flowering, fructification and seed production in plants of *Polystachya concreta* (Jacq.) Garay y H.R. Sweet (Orquidaceae)

Víctor Hugo Lallana^{1*}, Analía Michel¹ y Luz Fabiola García¹

¹ Universidad Nacional de Entre Ríos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cátedra de Fisiología Vegetal. Ruta 11, km 10,5 Oro Verde, Paraná (3100), Entre Ríos, Argentina.

***Autor para correspondencia:**
victor.lallana@fca.uner.edu.ar

Conflicto de interés:
Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Licencia:
Creative Commons CC-BY

Historial:
Recibido: 12/12/17;
Aceptado: 17/05/19

Periodo de Publicación:
Enero-Junio de 2019

RESUMEN

Polystachya concreta (Orchidaceae) es una planta herbácea epífita, hallándose en Salta, Jujuy, Corrientes y Misiones (Argentina). El objetivo del trabajo fue evaluar en *P. concreta* a) la floración y fructificación, b) la producción de semillas (número y masa) y c) su viabilidad. Se partió de dos grupos (I y II) de plantas provenientes de cultivo in vitro con 21 y 26 meses desde germinación respectivamente, aclimatadas y cultivadas en invernáculo en contenedores de plástico con sustrato orgánico y otras montadas en palo con musgo de Sphagnum. Los dos grupos de plantas se evaluaron por separado en cuanto a floración y fructificación, pero las mediciones en semillas (características morfológicas y determinaciones físicas con imágenes digitales) y su viabilidad (Técnica de tetrazolio) se realizaron con muestras aleatorias de todos los frutos cosechados en su conjunto. El porcentaje de floración fue de 84 y 60% (enero-febrero) y el de fructificación de 75 y 44% (mayo-junio), para el grupo I y II, respectivamente. Las plantas, provenientes de semillas, llegaron a primera floración en 42 meses. La masa media de las semillas por fruto fue $0,19 \pm 0,11$ mg y el número medio de semillas por mg fue estimado en 1770 ± 628 . La producción de frutos fue alta y con alto porcentaje de semillas viables (93%).

Palabras clave: *Polystachya concreta*, frutos, dimensión física de semillas, viabilidad

ABSTRACT

Polystachyaconcreta (Orchidaceae) is an epiphytic herbaceous plant, found in Salta, Jujuy, Corrientes and Misiones (Argentina). The objective of the work was to evaluate in *P. concreta* a) the flowering and fruiting, b) seeds production (number and mass) and c) its viability. Two groups of plants (I and II) were taken from in vitro culture with 21 and 26 months from germination respectively, acclimated and cultivated in greenhouse in plastic containers with organic substrate and others mounted on stick with Sphagnum moss. The two groups of plants were evaluated separately in terms of flowering and fruiting, but the measurements in seeds (morphological characteristics and physical determinations with digital images) and their viability (Technique of tetrazolium) were made with random samples of all the fruits harvested as a whole. The percentage of flowering was of 84 and 60% (January-February) and that of fruiting of 75 and 44% (May-June), for group I and II, respectively. The plants, coming from seeds, reached first flowering in 42 months. The average mass of seeds per fruit was 0.19 ± 0.11 mg and the average number of seeds per mg was estimated at 1770 ± 628 . Fruit production was high and with a high percentage of viable seeds (93%).

Key words: *Polystachya concreta*, fruits, physical dimension of seeds, viability

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. El género presenta una amplia distribución tanto en África, Asia como en América tropical (Vásquez y Ibish, 2004). En Argentina se extiende por las provincias

de Misiones, Corrientes, Salta y Jujuy (Johnson, 2001). Es una planta herbácea epífita o raramente litofítica mediana que no supera los 15-20 cm de altura, con pequeños pseudobulbos no siempre perceptibles y densamente distribuidos sobre el rizoma abreviado. Posee una inflorescencia apical erguida, racemosa apiculada de 20 cm de longitud, multiflora, con las flores distribuidas en el tercio apical. La floración ocurre de enero a abril y crece en lugares húmedos y sombríos, generalmente enraizada entre musgos y o líquenes sobre rocas o ramas (Johnson, 2001). Según este autor, una de las características más llamativa de la familia de orquídeas se da en sus aspectos florales que, en la gran mayoría de los casos, coevolucionan con sus polinizadores. Aunque hay algunas orquídeas que se autopolinizan y como ejemplo cita las flores cleistogámicas de *Polystachya concreta* y *Pleurosthallis triperantha*.

La obtención de plantas de orquídeas a través del cultivo in vitro de semillas es una valiosa herramienta cuando se trata de propagar especies (Flachsland, Terada, Rey y Mroginski, 1996) o híbridos. Este método es utilizado en forma rutinaria en el Jardín Botánico de Kew, para producir especímenes de especies difíciles de conseguir por otros métodos. De esta manera se obtiene material reproducido artificialmente que son incorporados a las colecciones y también se evitan continuas extracciones de plantas silvestres (Fay y Clemente, 1977; Thompson, 1980).

Desde 2010 se viene ejecutando un proyecto de investigación en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de Oro Verde, Entre Ríos (PID-UNER 2144, 2009) 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, confeccionando los respectivos protocolos de micropropagación y aclimatación. Los resultados del proyecto fueron transferidos a aficionados, viveristas y público en general, a través de charlas técnicas y cursos de capacitación, lo cual contribuye a la toma de conciencia en preservación de especies nativas y a la compra de plantas producidas por esta técnica. En tal sentido en 6 años se ha logrado la micropropagación y aclimatación de 12 especies nativas y dos híbridos (Lallana y García, 2016) con sobrevivencia de plantas en invernáculo de 70 al 100%, evaluada en periodos de 3 a 10 meses según las especies (Lallana y Wagner, 2017).

En un trabajo previo (Billard, Barsanti y Lallana, 2014) lograron la germinación axénica de *P. concreta* con un 98% de germinación a los 48 días y el establecimiento de plantas a los 9 meses de cultivo in vitro. Empleando sustratos comerciales de naturaleza orgánica alcanzaron más del 90% de supervivencia de las plantas en invernáculo, evaluada a los 90 días de aclimatación.

Es conocido que las plantas de orquídeas crecen lentamente y que la floración de plantas jóvenes puede tardar varios años (Thompson, 1980). Indudablemente se busca la floración de la especie en el menor tiempo posible, con fines a su comercialización. Existe muy poca información de los ciclos de vida de las especies desde germinación a primera floración si bien hay autores que estiman este periodo entre 3 y 5 años o más (Thompson, 1980; Rodríguez, González, Alvarado y Telles, 2007).

En Argentina existe muy poca información sobre el cultivo, ciclo de vida y producción de semillas de las especies nativas de orquídeas (Lallana y Di Persia, 2018). Chemisquy, Prevosti & Morrone (2009) plantean que hay poca información y descripción de las semillas de orquídeas terrestres argentinas. Tal como lo plantea Augustine, Yogendra & Sharma (2001), los estudios sobre morfología de semillas tan pequeñas como las orquídeas resultan de utilidad para resolver problemas de taxonomía, filogenia, fitogeografía y biología de las semillas.

Los objetivos de este trabajo son: a) evaluar la floración y fructificación de plantas de *P. concreta*, b) la producción de semillas (número por fruto y masa) y c) su calidad a través la prueba de viabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se sembraron semillas (junio 2012) en medio axénico de Murashigue y Skoog (1962) al 50% y las plantas fueron cultivadas in vitro y repicadas cada 60-90 días en el mismo medio en el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNER, durante 21 meses (grupo I) y 26 meses (grupo II). Posteriormente, en marzo (grupo I) y agosto (grupo II) de 2014, fueron aclimatadas 30 días en condiciones de laboratorio en bandejas multiceldas con sustrato TerraFértil® (compuesto por compost orgánico, turba de Sphagnum, acícula de pino,

resaca de río y perlita), baja intensidad de luz y riegos diarios con aspersión y luego llevadas a invernáculo con techo de policarbonato transparente y paredes de tejido romboidal cubierta de mediasombra (Billard et al., 2014). A partir de las plantas aclimatadas en bandejas multiceldas se seleccionaron al azar 18 plantas (grupo I) y 37 plantas (grupo II) para trasplante en 20 contenedores de Telgopor de 200 cc y de plástico de

300 cc de capacidad (Figura 1a) con sustrato entrefino (partículas menor a 2 cm) de cáscara de pino compostada y musgo de *Sphagnum*, y otras cinco plantas fueron montadas en palos (15 cm por 3 cm de diámetro) en forma directa, cubriendo las raíces con musgo de *Sphagnum* y atadas en forma firme con hilo encerado, manteniéndose suspensas en la pared del invernáculo a 1,30 m de altura (Figura 1b), con riego por aspersión cada 48 horas.



Figura 1. a. Trasplante de *P. concreta* en contenedores –dos a tres plantas por contenedor- y, b. en palos – plantas individuales- con musgo de *Sphagnum*.

Se efectuó una evaluación del porcentaje de floración en ambos grupos (03/05/16) tomando en cuenta el número total de plantas –con brotes de dos hojas o más por maceta- y brotes con espiga floral. En agosto de 2016 se evaluó el número de frutos final por espiga y se cosecharon al azar 10 espigas fructificadas (Figura 2). Se midió, en tres submuestras de 20 frutos al azar, el largo y ancho con calibre digital.



Figura 2. Detalle de las espigas cosechadas con desarrollo de las cápsulas (agosto 2016).

Se analizó al conjunto de plantas como una única muestra poblacional empleando estadística descriptiva para los parámetros medidos. Los dos grupos de plantas se evaluaron por separado en cuanto a floración y fructificación, pero las

mediciones en semillas (número y masa) y viabilidad se analizó en conjunto tomando muestras al azar del número de frutos cosechados.

Sobre 10 cápsulas (frutos) se determinó la masa en g del fruto y de las semillas contenidas en cada uno. A partir de un “pool” de semillas cosechadas de varios frutos se tomaron 5 alícuotas de 1 mg para realizar el conteo del número de semillas por mg de acuerdo con la metodología descrita por Lallana (2015). A partir de los recuentos del número de semillas, 1 mg de muestra dispersadas al azar sobre una cuadrícula de 100 cuadros de 0,5 x 0,5 cm, realizado sobre imágenes digitales de las semillas, se construyeron gráficos tridimensionales de la distribución de las semillas en la cuadrícula de recuento.

Las dimensiones físicas de las semillas se efectuaron sobre imágenes obtenidas con microscopio digital modelo USB-Digital Microscope 20X – 800X con escala de referencia (cuadrícula de 1 x 1 mm) utilizando el software ImageJ (Ferreira & Rasband, 2011) y de acuerdo al protocolo N° 41 (De La Cruz, Schimpf y Lallana, 2012).

Para el cálculo de las dimensiones se utilizaron las ecuaciones propuestas por Arditti (1979), para el volumen de las semillas se utilizó

$2[(A/2)^2 \cdot (l/2) \cdot (1,047)]$, donde A= ancho; l= longitud; $1,047 = \pi/3$ la cual considera las semillas de orquídeas como fusiformes (ahusadas). Para el cálculo del volumen del embrión se los consideró como esferoides alargados, determinando su volumen con la fórmula $4/3 \pi ab^2$, donde a = 0,5 longitud y b = 0,5 ancho. Semillas con relación Largo/Ancho (L/A) menores a 6,0 se clasifican como truncadas y las mayores a 6,0 como elongadas, de acuerdo a Verma, Sharma, Thakur, Kaur & Prakash (2014). El porcentaje de aire de la semilla se obtuvo restando el volumen de la semilla al volumen del embrión y dividiendo este valor por el volumen de la semilla por 100 (Arditti, 1979). Sobre las imágenes digitales se efectuó un ajuste de contraste y se determinó el color RGB del pool de semillas en seis puntos al azar, utilizando el software ImageJ (Ferreira & Rasband, 2011).

Se determinó la viabilidad de las semillas de un "pool" de semillas (2 mg) de 5 frutos al azar por la técnica de tetrazolio (García y Lallana, 2014). Las semillas se imbibieron en agua destilada por 24 h y luego en solución de tetrazolio (0,5 %) a 33°C en oscuridad otras 24 horas. Posteriormente se

observaron y contaron bajo lupa el número de semillas viables, no viables y vanas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A principios de enero de 2016, las plantas comenzaron a emitir la inflorescencia. A mediados de febrero estaban en plena floración y algunos pocos frutos en formación. En marzo se observó varios frutos en formación (Figura 3a). En junio las espigas presentaban solo frutos en llenado y sin ninguna flor (Figura 3b). El porcentaje de floración fue de 84% y 60% para el grupo I y II, respectivamente y las plantas montadas en palo no florecieron, a pesar de presentar un buen desarrollo de raíces y de hojas.

Con la información inicial de germinación y cultivo in vitro (Billard et al., 2014) más la observación de los estados fenológicos de la población en estudio se construyó una infografía de los estados de desarrollo hasta floración-fructificación (Figura 4). En ambos grupos se alcanzó el momento de floración a los 42 meses de inicio de la siembra in vitro desde semilla.



Figura 3. a. Estado avanzado de floración-principio de fructificación (marzo 2016) y, b. plena fructificación (junio 2016).

Tiempo en meses																		
1	2	3	4	5	25	26	27	28	41	42	43	44	45
Germinación			Cultivo <i>in vitro</i>						Acimatación vegetativo			crecimiento			Floración		Fructificación	

Figura 4. Historia de vida de plantas de *Polystachya concreta* obtenida a partir de semillas.

Tabla 1. Valores promedios de los parámetros evaluados en el proceso de floración-fructificación y evaluación de las semillas de *P. concreta*.

Parámetros evaluados	Grupo I	Grupo II
Porcentaje de floración (marzo/16)	84	60
Porcentaje de fructificación (agosto/16)	75	44
Total de frutos cosechados	229	75
Número de frutos / espiga	9,37 ±5,83	8,8 ±4,98
Longitud del fruto (mm) (n=60)	8,33 ±0,98	
Ancho del fruto (mm) (n= 60)	2,53 ±0,3	
Masa media de los frutos (g) (n= 10)	0,00111 ±0,00023	
Número de semillas por mg (n=5)	1770 ± 628	
Masa media de semillas/fruto (n=10) mg	0,19 ±0,11	
Número de semillas por fruto (n= 10)	336±194	
Masa de una semilla en µg	0,564	
Longitud de la semillas mm (n=10)	0,2895 ± 0,025	
Ancho de la semilla mm (n= 10)	0,0811 ± 0,0075	
Relación largo/ancho de semilla	3,57	
Viabilidad (tetrazolio) (n= 3)	93 %	

Los frutos presentan una forma oblonga con transición a la forma fusiforme (Figura 2). La cantidad media de frutos por espiga fue de $8,31 \pm 5,37$ y $9,67 \pm 5,97$, con un total de 216 y 116 frutos para el grupo I y II respectivamente en la primera observación. Al finalizar el ensayo los valores fueron: $9,37 \pm 5,83$ y $8,8 \pm 4,98$ con un total de 229 y 75 frutos para los grupos I y II respectivamente (Tabla 1). Las dimensiones de largo y ancho de los frutos fueron de $8,33 \pm 0,98$ y $2,53 \pm 0,3$ mm, respectivamente. La masa media de los frutos fue de $0,0011 \pm 0,0023$ g (Tabla 1).

La masa media de semillas por fruto fue de 0,19 mg y el número medio de semillas por mg (n=5) fue estimado en 1770 (Tabla 1) y su distribución en la cuadrícula de recuento (Figura 5) se observó en la mayoría de las muestras, una concentración de semillas en la parte media de la cuadrícula. El método empleado permitió un conteo detallado en cada cuadro de la cuadrícula.

Las semillas son pequeñas, de acuerdo a la clasificación por tamaños de Barthlott, Grobe-Veldmann & Korotkova (2014), de color blanquecino amarillento a pardo claro (RGB: 167; 158; 103) u ocre y de forma ovalada o globosa levemente truncada en un extremo, con una relación largo/ancho de 3,57. Embrión visible, de color pardo más oscuro; se ubica en la parte media de la

semilla, ocupando más de mitad del volumen de la semilla (Figura 6). El volumen de aire de la semilla fue estimado en 33%, lo cual implica que el embrión ocupa el 67% del tamaño de la semilla.

El color general de las semillas proviene, principalmente, de las células de la testa, que tienen una coloración propia. El embrión también contribuye, sobre todo en semillas pequeñas en las que ocupa mayor volumen respecto al tamaño total de la semilla y en aquellas que las células son transparentes (Ayuso, 2017). En el caso de *Polystachya concreta* el color es ocre (Figura 6) coincidente con el color del género (Ayuso, 2017). Por otra parte, la semilla presenta poco volumen de aire (33%) lo cual limitaría su flotabilidad en aire y el proceso de dispersión sería próximo a la planta madre. Al respecto Arditti & Ghani (2000) postulan que cuanto mayor es el volumen de aire de las semillas éstas presentan mayor flotabilidad lo cual les brinda más facilidad para su dispersión anemócora.

La viabilidad de las semillas a 6 días de cosechadas fue de 93,55% lo cual pone de manifiesto la calidad de la misma. Se observó un 3,22% de semillas vanas sobre un total de 801 semillas contadas en las cuadrículas de recuento (Tabla 2). De las semillas, al cabo de 24 horas de imbibición en agua, un 90% se depositaron en el fondo del vial.

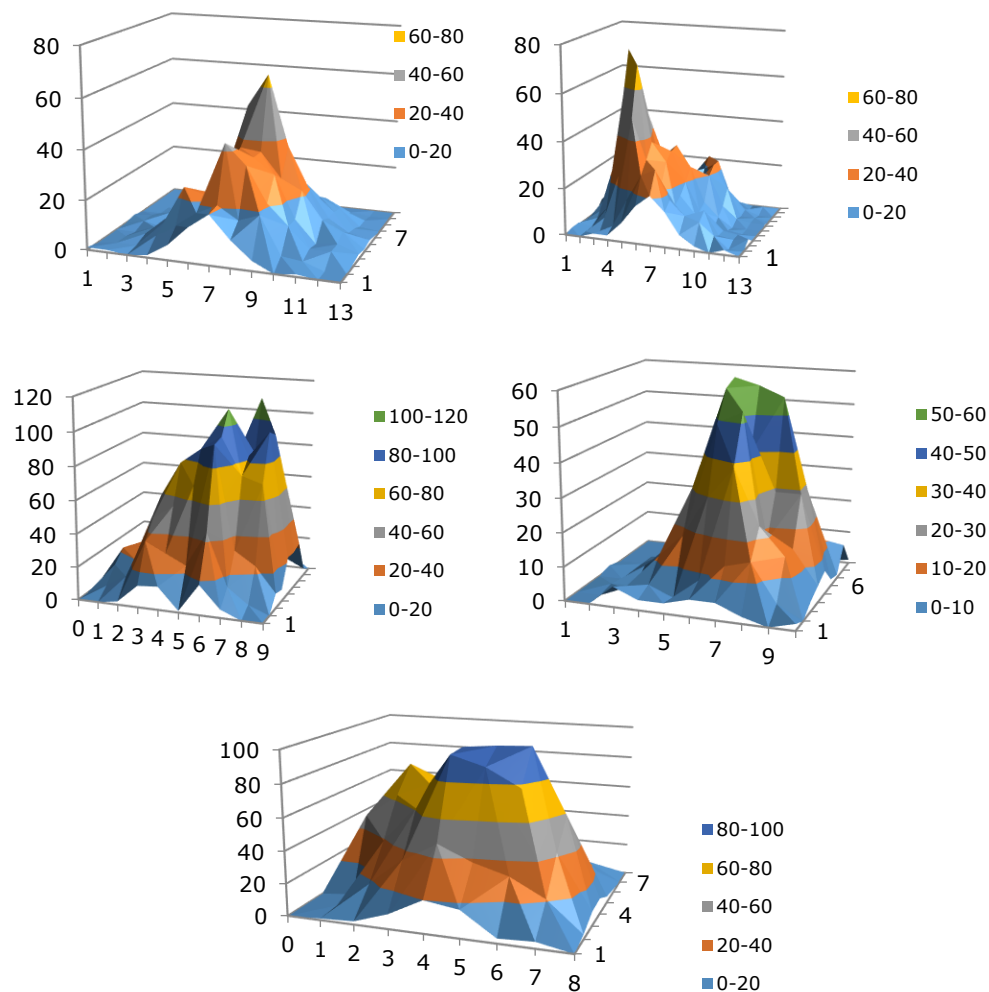


Figura 5. Representación tridimensional de la distribución del número de semillas en las cuadrículas de conteo, para las 5 muestras de semillas (N= 1043, 1737, 1180, 2746 y 2147 semillas, respectivamente).

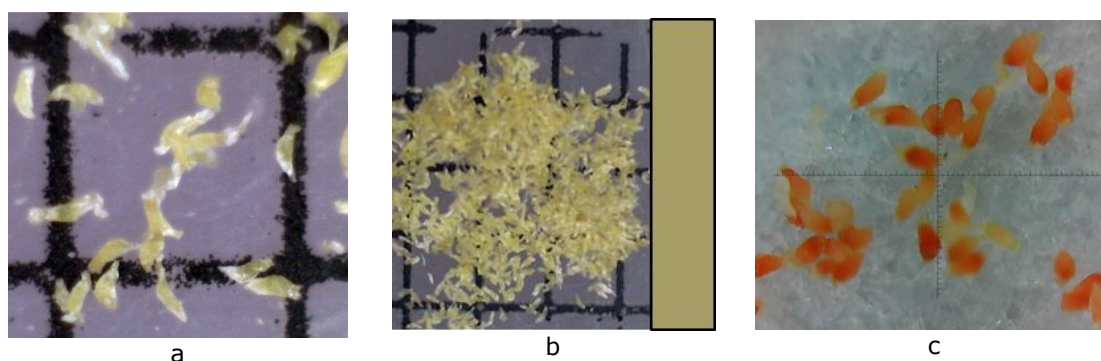


Figura 6. a. Microfotografías de semillas de *P. concreta* en su estado natural, b. "pool" de semillas y patrón de color RGB a la derecha de la imagen central y, c. después de la tinción con tetrazolio (prueba de viabilidad) donde se observa el embrión intensamente coloreado. La cuadrícula representa 1 mm x 1 mm.

Tabla 2. Resultados del ensayo de viabilidad y porcentaje de semillas vanas en *P. concreta*. R: repeticiones de los recuentos, n: número de semillas puras (viables + no viables).

Semillas	R1	R2	R3
n	188	330	212
% Viables	94,01 ± 4,01	93,46 ± 3,17	93,19 ± 2,05
% vanas	3,11 ± 2,42	3,83 ± 1,93	2,72 ± 2,88

Lallana y García (2016), evaluaron la viabilidad de varias especies de orquídeas almacenadas en frío con distintos tiempos de almacenamiento comparando la situación inicial y final de los valores de viabilidad. En el caso de *P. concreta*, la viabilidad se mantuvo por un periodo de casi tres años disminuyendo levemente de 97 a 94%. Los resultados de este trabajo también muestran valores altos de viabilidad para semillas recién cosechadas (Tabla 1), lo cual estaría indicando que la especie no tuvo problemas en la formación de semillas con embrión viable, presentando un bajo porcentaje de semillas vanas (Tabla 2). En otras especies de orquídeas es común observar altos porcentajes de semillas vanas (Lallana y García, 2016), por ejemplo, 63, 33, 13, 33% para *Bletilla striata*, *Clhorea membranacea*, *Bipinula pennicillata* y *Epidenrum ibagensis*, respectivamente.

Las semillas de orquídeas crecen lentamente y requieren años para que la planta florezca, en general de 3 a 5 años (Thompson, 1980; Rodríguez et al., 2007), en el caso de *P. concreta* se alcanzó la primera floración en un periodo de 42 meses, demostrando ser relativamente precoz. Los dos grupos de plantas aclimatadas con diferencias de cinco meses de salida del cultivo in vitro, respondieron en forma distinta a la floración y fructificación. El grupo I permaneció cinco meses más de tiempo en el invernáculo que el grupo II, lo cual permitió un mayor crecimiento y adaptación a las condiciones ambientales, logrando un porcentaje mayor de floración y fructificación (Tabla 1).

CONCLUSIONES

Los porcentajes de floración y formación de frutos fueron más altos en las plantas que crecieron en contenedor, respecto a las trasplantadas en palo. Las plantas de *P. concreta* provenientes de semillas cultivadas in vitro y aclimatadas, llegaron a su primera floración en un tiempo de 42 meses.

El porcentaje de fructificación fue alto en relación a la floración, con pérdidas de 10 y 26% según los grupos de plantas considerados.

Teniendo en cuenta el pequeño tamaño de los frutos, la producción de semillas por fruto fue alta (150 a 500) con alto porcentaje de viabilidad.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el marco del PID-UNER 2172 (2014-2017) "Banco de germoplasma de orquídeas nativas de la región litoral", financiado por la Universidad Nacional de Entre Ríos. A los revisores anónimos que ayudaron a mejorar la comprensión del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Augustine, J., Yogendra, K. & Sharma, J. (2001). *Orchids of India II: Biodiversity and status of Bulbophyllum Thou.* Tri Nagar, New Delhi: Daya publishing house.
- Ayuso, J.B. (2017). Los frutos y las semillas de las orquídeas. Capítulo 6 (en línea). En *Orquídeas silvestres del sistema ibérico*. p. 524-598. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/320508516_Los_frutos_y_las_semillas_de_las_orquideas?_sg=_WJ7LHX-
- Arditti, J. (1979). Aspects of the physiology of orchids. *Adv. Bot. Res.*, 7, 241-665.
- Arditti J. & Ghani, A.K. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.*, 145, 367- 421.
- Barthlott, W., Grobe-Veldmann, B. & Korotkova, N. (2014). *Orchid seed diversity: s scanning electron microscopy survey*. Berlin-Dahlem: Botanic Garden and Botanic Museum. 245 p.

- Billard, C, Barsanti, V. y Lallana, V.H. (2014). Cultivo «in vitro» y aclimatación de plantas de *Polystachya concreta* (Orchidaceae). *Revista FABICIB*, 18,95-106.
- Chemisquy, M.A., Prevosti, F.J. & Morrone, O. (2009). Seed morphology in the tribe Chloraeae (Orchidaceae): combining traditional and geometric morphometrics. *Bot J Linn Soc.*, 160, 171-183.
- De La Cruz, V., Schimpf, K. y Lallana, V.H. (2012). *Protocolo N° 41: Medición digital de la longitud y ancho de semillas de orquídeas*. 5 p. Disponible en: <http://www.orquier.fca.uner.edu.ar/protocolos>
- Fay, M. y Clemente, M. (1997). Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en propagación y conservación de especies amenazadas. *Monograf. Jard. Bot.*, 5, 43-50.
- Ferreira, T. & Rasband, W. (2011). *ImagenJ userguide*. IJ 1.45 m. 152p. Recuperado de: <http://imagenj.nih.gov/ij/docs/userguide.pdt>.
- Flachsland, E., Terada, G., Rey, H. y Mroginski, L. (1996). Medios de cultivo para la germinación in vitro de 41 especies de orquídeas. *FACENA*, 12, 93-100.
- García, L.F y 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.
- Johnson, E. (2001). *Las orquídeas del Parque Nacional Iguazú*. Buenos Aires, Argentina: L.O.L.A., 296 p.
- Lallana, V.H. (2015). Nuevo método para el conteo de semillas de orquídeas. *XII Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral*. 2-3 noviembre de 2015. Paraná, pp 119.
- Lallana, V.H. y García, L.F. (2016). Viabilidad de semillas de orquídeas almacenadas en frío. En Néstor Di Leo, H.L. y Seghesso, A. 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*. Rosario: Foja Cero, pp. 143-144.
- Lallana, V.H. y Wagner, J.B. (2017). Aclimatación y sobrevivencia de plantas de orquídeas provenientes de cultivo "in vitro". In: Seghesso, A., Labria, H., Di Leo, N (comp.) 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*. Zavalla, Rosario: Fundación Ciencias Agrarias, pp. 119-120
- Lallana, V.H. y Di Persia, J.F. (2018). Caracterización morfométrica de semillas de cuatro especies de orquídeas terrestres nativas de Argentina. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 29(57), 272-284. <https://doi.org/10.33255/2957/423>
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- PID-UNER 2144. (2009). *Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos «in vitro»*. Proyecto de Investigación y Desarrollo-UNER. Aprobado por Res. C.S. n° 109/10 (19/08/10). Director: Dr. Víctor H. Lallana. 31 p.
- Rodríguez, L., González, R., Alvarado, K. y Telles, E. (2007). Germinación asimbiótica in vitro de semillas de orquídeas silvestres. *Bioteconología Vegetal*, 7(3), 139-142.
- Thompson, P.A. (1980). *Orchids from seed: Royal Botanical Gardens*. London, 29 p.
- Vásquez, R y Ibish, P.L. (ed). (2004). *Orquídeas de Bolivia: diversidad y estado de conservación*. Bolivia: FAN, 649 p.
- Verma, J., Sharma, K., Thakur, K., Kaur, J. & Prakash, S. (2014). Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids. *Turk J Bot*, 38, 234-251.