

EFECTO DEL TIPO DE POLINIZACIÓN EN LA FORMACIÓN DE FRUTOS Y CAPACIDAD GERMINATIVA DE LAS SEMILLAS DE *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst.

EFFECT OF POLLINATION TYPE ON FRUIT FORMATION AND GERMINATION CAPACITY OF SEEDS OF *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst.

Fecha de recepción: 18/05/2021 // Fecha de aceptación: 20/12/2021

Evelyn Raquel Duarte

Ingeniera Forestal, Doctora en Recursos Forestales, Jefe de Trabajos Prácticos, Facultad de Ciencias Forestales (FCF)-Universidad Nacional de Misiones (UNaM).
evelynduarte1982@gmail.com

Rosana Rubenich

Estudiante de ingeniería Forestal, FCF-UNaM
rubenichrosana@gmail.com

Peggy Noemi Thalmayr

Ingeniero Forestal, Docente FCF-UNaM. Becaria doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
peggythalmayr@gmail.com

Lorena Marcela Ortiz

Estudiante del profesorado en Ciencias Biológicas, FCF-UNaM
ortizlorena684@gmail.com

Sandra Patricia Rocha

Ingeniero Forestal, Master en Ciencias, Docente de la FCF-UNaM.
procha910@gmail.com

Fernando Omar Niella

Ingeniero Forestal, Master en Ciencias, Docente de la FCF-UNaM.
fernandoniella@gmail.com

Guillermo Küppers

Ingeniero Forestal, Docente de la Facultad de la FCF-UNaM.
guillermokuppers@gmail.com

RESUMEN

Cyrtopodium hatschbachii Pabst, es una orquídea terrestre nativa de Brasil y Argentina en peligro de extinción, que no ofrece recompensa a sus polinizadores, por ende, la probabilidad de formación de fruto y su regeneración natural es escasa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la germinación *in vitro*, y aclimatación de plantas en diferentes sustratos, a partir de semillas de frutos provenientes de distintas formas de polinización de *Cyrtopodium hatschbachii*. Se cosecharon frutos y las semillas fueron germinadas *in vitro*, bajo condiciones ambientales de luz y oscuridad. Posteriormente las plantas se aclimataron en tres tipos de sustratos diferentes. Los resultados demostraron que tanto la autopolinización como la polinización cruzada manual son efectivas en la producción de frutos y de semillas viables para la germinación *in vitro* y posterior aclimatación. Las semillas no requieren de oscuridad para inducir su germinación y tanto la corteza de pino como la de laurel y la perlita son sustratos que contribuyen al proceso de aclimatación exitosa de plántulas

SUMMARY

Cyrtopodium hatschbachii Pabst, is an endangered terrestrial orchid native to Brazil and Argentina, which offers no reward to its pollinators, thus the probability of fruit formation and natural regeneration is low. The objective of the present work was to evaluate the *in vitro* germination and acclimatization of plants in different substrates, from seeds of fruits generated by different forms of pollination of *Cyrtopodium hatschbachii*. Fruits were harvested and seeds were germinated *in vitro*, under light and dark environmental conditions. Subsequently, plants were acclimatized in three different types of substrates. The results showed that both self-pollination and hand cross-pollination are effective in producing fruit and viable seeds for *in vitro* germination and subsequent acclimatization. Seeds do not require darkness to induce germination and both pine and laurel bark and perlite are substrates that contribute to the process of successful acclimatization of seedlings from *in vitro* culture. The methodology developed in this study

provenientes del cultivo *in vitro*. La metodología desarrollada en este estudio demuestra la posibilidad de contar con un protocolo efectivo de multiplicación *in vitro* para la producción de plantas destinadas a programas de conservación y/o restauración de *C. hatschbachii*.

Palabras clave: Orchidaceae, propagación, sustrato, polinización manual, autopolinización.

demonstrates the possibility of having an effective *in vitro* multiplication protocol for the production of plants for conservation and/or restoration programs of *C. hatschbachii*.

Key words: Orchidaceae, propagation, substrate, manual fertilization, self-fertilization.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es uno de los grupos de plantas de las de angiospermas más diversas que existen, con unas 28.000 especies, sin embargo, están entre las más vulnerables, por la pérdida de hábitat y los mecanismos de extracción que sufren, con fines de comercialización por la valoración de sus flores (ÁVILA-DÍAZ y SALGADO-GARCIGLIA 2006; CHRISTENHUSZ y BYNG 2016).

Las orquídeas tienen una distribución cosmopolita en el planeta, pero no están presentes en regiones de extremas temperaturas como los polos, cumbres nevadas y desiertos. Cada especie crece bajo condiciones ambientales particulares, generando así una amplia cantidad de especies endémicas en regiones o micrositios con características especiales. En este sentido, las orquídeas han evolucionado desarrollando diferentes mecanismos de polinización, como generar néctar de recompensa en algunos casos, o ser artistas del engaño como en la mayoría de los casos, asemejándose a un alimento, o aparentar a hembras para atraer a insectos machos (TAMAY *et al.* 2016). Los polinizadores cumplen un rol importante en la producción de frutos y semillas (BARRIOS *et al.* 2010), a tal punto que estudios sobre polinizadores pueden indicar el grado de fragmentación del hábitat, y esta fragmentación influye tanto en la producción de polen como en la formación de frutos (PARRA-TABLA *et al.* 2000).

La polinización manual es una técnica empleada para producir híbridos de interés comercial, pero esta técnica también puede ser empleada como estrategia para obtener frutos y plantas utilizando técnicas de cultivo *in vitro* con fines de conservación *ex situ* en bancos de germoplasma, vivero o jardines botánicos, así como para repoblar áreas de crecimiento natural de las especies bajo conservación (ORTEGA-LARROCEA *et al.* 2007; SUÁREZ-GUERRA 2016; SUÁREZ-GUERRA y TÉLLEZ-BELTRÁN 2018).

La polinización manual puede alcanzar una eficiencia de producción de frutos del 100% en los casos de polinización cruzada, mientras que la autopolinización puede ser inferior al 30% (TORRETA *et al.* 2011).

Transcurrida la polinización de la flor de manera efectiva, se produce la formación de los frutos

y consecuentemente de las semillas. No obstante, la principal problemática en la propagación de las orquídeas, está en la germinación simbiótica de las semillas, ya que éstas requieren de la presencia de hongos micorrízicos. En ausencia de estos, una alternativa para germinar las mismas, es el cultivo *in vitro*, donde se puede alcanzar hasta un 90 % de germinación asimbiótica. En este sentido es que resulta importante, realizar estudios de esta índole a fin de proporcionar información que permita la conservación y uso sustentable de las orquídeas y sobre todo de aquellas en peligro de extinción (SEDANO *et al.* 2015). Son varias las especies en peligro de extinción alrededor del mundo, entre las que se encuentra *C. hatschbachii* Pabst, por lo tanto, es importante conocer las estrategias reproductivas de las distintas especies, para lograr un manejo sustentable y conservación de las mismas. En este sentido, estudios sobre la polinización y formación de frutos podrían contribuir con el manejo, cultivo y conservación de las orquídeas y, un mecanismo exitoso para aumentar la disponibilidad de plantas en condiciones de vulnerabilidad y riesgo es el cultivo *in vitro* (WALSH *et al.* 2014; SALAZAR-MERCADO y GÉLVEZ-MANRIQUE 2015; POTT *et al.* 2019; SANTOS y DE AZEVEDO 2021).

El objetivo del presente trabajo, fue estudiar el efecto de la autopolinización y polinización cruzada manual sobre la formación de frutos, producción de semillas, y germinación *in vitro*, con la posterior aclimatación de las plantas de *C. hatschbachii* en invernáculo con los sustratos corteza de pino, corteza de laurel blanco y perlita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En el presente estudio se emplearon plantas de *Cyrtopodium hatschbachii* en estado adulto y en la etapa fenológica de floración. Las plantas durante el periodo de floración y fructificación, fueron mantenidas en un invernáculo con cobertura plástica, riego automático por microaspersores, humedad relativa entre el 70 y 90% y una temperatura media entre 23 y 30° C.

Experimentos de polinización manual

Con el fin de determinar el efecto de la autopolinización y la polinización entre genotipos diferentes en la formación de frutos y capacidad germinativa de las semillas de *Cyrtopodium hatschbachii* se realizaron tres tratamientos: a) autopolinización manual entre polen y estigma de la misma flor (las polinias se depositan en la superficie estigmática de la misma flor); b) autopolinización manual entre polen y estigma de flores distintas ubicadas en un misma inflorescencia (Figura 1A); c) polinización cruzada manual, la polinia de una flor se coloca en la superficie estigmática de la flor de otro individuo de genotipo distinto. Los tratamientos fueron asignados aleatoriamente en las flores de cada inflorescencia y las polinizaciones manuales fueron realizadas el segundo día después de la antesis. La formación del fruto se monitoreó diariamente hasta su cosecha, la que se realizó a los tres meses y previo a la dehiscencia (Figura 1B).



Figura 1. Polinización y fructificación de *Cyrtopodium hatschbachii*. A, Flores en el proceso de polinización; B, frutos previos a la cosecha. Escalas: A: 2,0 cm; B: 1,5 cm.

Figure 1. Pollinization and fruiting of *Cyrtopodium hatschbachii*. A, Flowers in the process of pollination; B, pre-harvest fruits. Scales: A: 2.0 cm; B: 1.5 cm.

Efecto del tipo de polinización en la germinación *in vitro*, condiciones de cultivo y crecimiento

Una vez obtenidos los frutos de color verde, estos fueron desinfectados a través de un lavado con agua y detergente neutro por 5 min, luego en cámara de flujo laminar se procedió a lavar con hipoclorito de sodio (lavandina) (35 g.L⁻¹ de cloro) al 100% durante 10 min, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril en vaso de precipitado, posteriormente los frutos se sumergieron en etanol al 96% en un vaso de precipitado, se flamearon en un mechero y por último los frutos fueron enfriados en agua destilada estéril en un vaso de precipitado. A continuación en cámara de flujo laminar se procedió a la apertura de cada fruto con un bisturí para extraer sus semillas, las que se

cultivaron en cajas de Petri que contenían 15 ml del medio de cultivo sales minerales de MURASHIGE y SKOOG (1962), reducidas a la mitad de su concentración original (MS al 50%), enriquecido con: sacarosa 20 g.L⁻¹, carbón 2,0 g.L⁻¹ y agar 6,0 g.L⁻¹ como agente gelificante con un pH 5,8 y esterilizado por calor húmedo mediante autoclave a 1,46 kg.cm⁻² durante 20 min. Las semillas en las cajas de Petri fueron incubadas en cámara de cría con temperatura controlada de 27±2 °C, bajo condiciones de luz (116 μmol.m⁻².s⁻¹, PAR, fotoperíodo 16 horas) u oscuridad (en una caja que mantenía esta condición de manera plena). Al cabo de 60 días de cultivo se procedió a realizar la cuantificación de protocormos desarrollados.

Efecto del sustrato durante la aclimatación

Después la germinación las plantas permanecieron bajo condiciones *in vitro*, durante 12 meses y se realizaron tres sucesivos subcultivos hasta que alcanzaron un tamaño de 8 a 10 cm de altura. Posteriormente las plantas fueron extraídas del frasco y sometidas al proceso de aclimatación, para ello, primero se lavaron con abundante agua corriente de canilla para eliminar todo el medio de cultivo adherido a las raíces, luego fueron secadas con papel absorbente y se plantaron en recipientes plásticos de 11 cm de diámetro por 7 cm de altura que contenían los sustratos propuestos: corteza de pino, corteza de laurel blanco [*Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart.] y perlita. Los recipientes con las plantas se mantuvieron durante 60 días en invernáculo, con una temperatura ambiente promedio de 25 a 30 °C con riego manual con pulverizador cada vez que se consideró necesario, finalizado ese periodo se midió la sobrevivencia de las plantas en cada sustrato.

Diseño y análisis estadístico

El diseño utilizado en los diferentes ensayos fue completamente aleatorizado, por cada tipo de polinización se emplearon 4 flores seleccionadas al azar dentro de la inflorescencia y los frutos fueron cosechados tres meses después de la polinización manual. En el ensayo de germinación *in vitro* se emplearon 3 cajas de Petri por cada tratamiento (a, b, c) y para la cuantificación de la cantidad de protocormos desarrollados en cada tipo de polinización se procedió a realizar una zonificación de 12 cuadrículas de 4 cm² en cada una de las cajas de Petri. A continuación, se seleccionaron al azar 5 cuadrículas por caja conformando un total de 15 cuadrículas por tratamiento, sobre las cuales se contabilizaron los protocormos y se calculó la cantidad de protocormos por cm². Para determinar la sobrevivencia de las plantas en los diferentes sustratos se plantaron 5 plantas por bandeja plástica de 11 cm de diámetro y 7 cm de altura y por tratamiento se emplearon 5 bandejas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La efectividad de formación de frutos fue del 100% en los distintos tipos de polinización ensayadas en este estudio, asimismo no se observaron diferencias en el tamaño de los frutos, ya que presentaron una longitud de entre 3,0 y 3,5 cm y un ancho de 1,0 a 1,4 cm en los distintos tipos de polinización. Tampoco se observó una diferenciación en la forma, coloración o presencia de dehiscencia prematura en los frutos. La metodología empleada en este estudio para obtener fruto en *C. hatschbachii* ha sido altamente efectiva y recomendable para propagar la especie. Si bien la efectividad de esta técnica ya había sido comprobada por otros por otros autores en *Cyrtopodium holstii* L.C. Menezes, donde obtuvieron tasas de formación de frutos del 60% con autopolinización manual y 87% con polinización manual cruzada (SANTOS y AZEVEDO 2021). En este estudio en *C. hatschbachii*, la proporción de formación de frutos y semillas viables provenientes de las distintas polinizaciones evaluadas mostraron valores superiores.

Las especies del género *Cyrtopodium* se caracterizan por no ofrecer recompensa a sus polinizadores y los atraen por engaño, por lo tanto, en la naturaleza el éxito reproductivo es bajo, pero en el caso de *C. hatschbachii* para contrarrestar este episodio, posee la facultad de ser autocompatible y puede alcanzar la autopolinización por medio de las lluvias, pero aún así la producción de frutos no supera al 1,4% (MACIEL *et al.* 2019). En este sentido, es necesario contar con metodologías que permitan obtener frutos y semillas viables que garanticen la reproducción en invernaderos para una producción sustentable de plantas que puedan utilizarse tanto para la comercialización, como para programas de restauración y/o conservación *in situ* de la especie.

El fenómeno de autocompatibilidad fue observado en varias especies de orquídeas (QUIROGA *et al.* 2010; TORRETA *et al.* 2011) y ha permitido su conservación en el tiempo, debido a que la autocompatibilidad es un factor favorecido por la selección artificial en la domesticación, porque las plantas pueden producir frutos en ausencia de polinizadores (CASAS *et al.* 2015). Sin embargo, es una estrategia poco deseada en términos evolutivos, porque la variabilidad genética es baja a nula y un pequeño error en el azar evolutivo podría eliminar la población de la especie en su totalidad, en cambio con la polinización cruzada se asegura la variabilidad genética y por tanto se pueden generar individuos resistentes a determinadas plagas o enfermedades (PÉREZ-MARTÍNEZ y PACHECO-SALAMANCA 2005).

En cuanto a la germinación, no fue factible poder identificar las semillas que germinaron de las que no lo hicieron, por el grado de maduración y agrupamiento que presentaron estas en el momento del cultivo. Por lo que es necesario que los frutos

permanezcan mayor tiempo en la planta para alcanzar la madurez y poder individualizar las semillas, pero las semillas maduras presentan más dificultad para germinar bajo condiciones *in vitro* que las inmaduras (SURENCISKI *et al.* 2012). En este estudio la germinación de semillas inmaduras se ha logrado en *C. hatschbachii*, pero el proceso fisiológico fue registrado a través de la formación de protocormo. Contrariamente, en otras especies como *Cattleya labiata* Lindl. y *Epidendrum oxysepalum* Hágsater & E. Santiago, las semillas inmaduras no germinan en ninguno de los medios de cultivo ampliamente utilizados en la germinación de semillas de orquídeas (RODRÍGUEZ *et al.* 2003; PÉREZ-MARTÍNEZ y CASTAÑEDA-GARZÓN 2016).

La cantidad de protocormos desarrollados en los distintos tratamientos de polinización presentaron diferencias significativas ($p = 0,0055$), siendo las semillas provenientes de autopolinización de una misma flor y sometidas a condiciones lumínicas (Figura 2A), el tratamiento que presentó la mayor cantidad de protocormos (semillas que germinaron por cm^2). Altas tasas de germinación en semillas provenientes de frutos por autopolinización también fueron observadas en *Masdevallia ignea* Rchb. f. (PÉREZ-MARTÍNEZ y PACHECO-SALAMANCA 2005).

Por otro lado, las semillas de autopolinización incubadas en oscuridad mostraron valores inferiores, pero con diferencias significativas con el tratamiento en ambiente de luz, aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de autopolinización, ya sea de una flor o de flores de una inflorescencia (Tabla 1, Figura 2B). Contrariamente los tratamientos con menor desarrollo de protocormo se observaron en la polinización cruzada incubadas tanto en ambiente lumínico como en oscuridad (Tabla 1; Figura 2C, D), pero el tratamiento menos eficiente fue cuando los cultivos de semillas de polinización cruzada se incubaron en condiciones de oscuridad (Tabla 1; Figura 2D). No obstante, investigaciones sobre el efecto de la calidad de la luz sobre la germinación de semillas de orquídeas, la luz blanca fue la menos efectiva para inducir germinación y el ambiente oscuro el más óptimo para promover este proceso fisiológico en *Masdevallia auropurpurea* Rchb. f. & Warsz. (MANRIQUE 2007). Las semillas de orquídeas al igual que de otras especies de angiosperma pueden germinar bajo condiciones de un fotoperiodo o en oscuridad total, en algunos casos necesitan oscuridad total hasta que germine, otras especies con solo una leve inducción en oscuridad durante unos días es suficiente y otras especies requieren luz para que ocurra la germinación, pero dependen de la calidad de esta (DE LA CUADRA 1993; RODRÍGUEZ *et al.* 2007; VOGEL y MACEDO 2011; BALTIERRA y ALONSO 2012; CASTAÑOS *et al.* 2017).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este y otros estudios se ha demostrado que el tipo de polinización del cual provienen las semillas puede afectar la germinación de estas y por ende la obtención de plantas (PÉREZ-MARTÍNEZ y PACHECO-SALAMANCA 2005).

Tabla 1. Efecto de la polinización y el ambiente lumínico sobre la formación de protocormos en semillas de *Cyrtopodium hatschbachii*.
Table 1. Effect of pollination and light environment on protocorms formation in seeds of *Cyrtopodium hatschbachii*.

Polinización	Ambiente lumínico	Protocormo/cm ²
*A	Con Luz	8,35±2,05 a
A	Sin Luz	5,20±3,79 ab
B	Con Luz	7,30±3,80 ab
B	Sin Luz	6,90±3,14 ab
C	Con Luz	4,45±1,94 ab
C	Sin Luz	2,40±1,31 b

Valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa. *A, autopolinización dentro de una misma flor; B, autopolinización entre flores de una misma inflorescencia; C, polinización cruzada entre plantas de genotipos distintos.

Cabe destacar que en los tratamientos que se incubaron bajo un ambiente con luz presentaron protocormos de mayor tamaño y de coloración verde (Figura 2A y C), mientras que los protocormos desarrollados en ambientes sin luz, fueron muy pequeños y de coloración blanca (Figura 2B y D), observándose como un ambiente más efectivo para la germinación la condiciones ambientales con luz, contradiciendo lo expuesto por la bibliografía que el ambiente oscuro favorece la germinación de semillas de orquídeas terrestres, debido a que simula las condiciones naturales de germinación de estas especies (RODRÍGUEZ *et al.* 2001), por lo que, no en todas las especies de orquídeas terrestres las condiciones de oscuridad favorecen a la germinación como lo es el caso de *C. hatschbachii*.

Después que los protocormos se convirtieron en plantas, estas fueron sometidas al proceso de aclimatación *ex vitro* y transcurrido 60 días, los mejores porcentajes de supervivencia fueron observados en las plantas provenientes de semillas de polinización cruzada y autopolinización entre flores distintas de una misma inflorescencia, en todos los sustratos (Tabla 2).

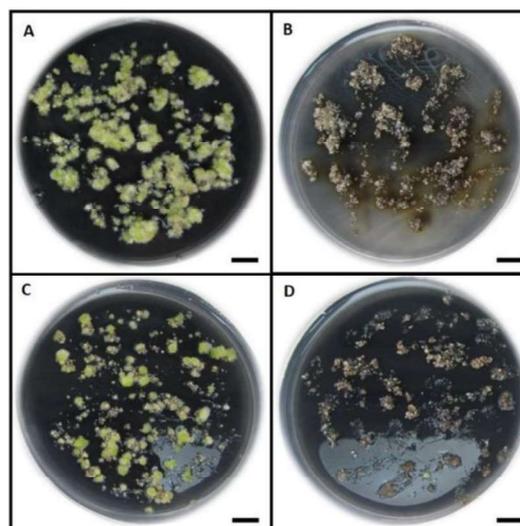


Figura 2. Germinación y formación de protocormos en semillas de *Cyrtopodium hatschbachii*. A, B, provenientes de polinización de una misma flor; C, D, polinización cruzada. A, C, en ambiente con luz; B, D, en ambiente sin luz (oscuridad). Escala: 1 cm.

Figure 2. Germination and formation of protocorms in seeds of *Cyrtopodium hatschbachii*. A, B, from pollination of the same flower; C, D, cross-pollination. A, C, in light environment; B, D, in dark environment. Scale: 1 cm.

En cambio, en las plantas de autopolinización de una misma flor el nivel de supervivencia fue inferior al 50% en los sustratos de cortezas, mientras que en el sustrato de perlita la sobrevivencia de estas plantas fue del 88% (Tabla 2), observándose diferencias significativas ($p = 0,011$) entre tratamientos de las plantas de autopolinización de una misma flor (A) y las otras polinizaciones (B y C) ensayadas, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con el sustrato perlita (Tabla 2). La diversidad genética es fundamental para la conservación de especies, por lo tanto, la polinización cruzada no solo contribuye con la variabilidad genética sino también con la supervivencia de las orquídeas a largo plazo (KAHILAINEN *et al.* 2014; CUARTAS-DOMINGUEZ *et al.* 2017).

Tabla 2. Supervivencia de plantas de *Cyrtopodium hatschbachii* después del periodo de aclimatación en los distintos sustratos en relación con los tipos de polinización.

Table 2. Survival of *Cyrtopodium hatschbachii* plants after the acclimatization period on the different substrates in relation to pollination types.

Sustrato	Polinización		
	*A	B	C
Corteza de pino	48±17,88 b	96±8,94 a	72±26,82 a
Corteza de laurel	40±31,62 b	76±16,73 a	92±10,95 a
Perlita	88±17,88 a	76±21,91 a	92±17,88 a

Valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa. *A, autopolinización dentro de una misma flor; B, autopolinización entre flores de una misma inflorescencia; C, polinización cruzada entre plantas de genotipos distintos.

La corteza de pino es uno de los sustratos más empleados en los viveros para aclimatar plantas *in vitro* de orquídeas, pero no siempre ha resultado ser el sustrato más adecuado, como lo fue en el caso de *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W.E. Higgins y *Encyclia phoenicea* (Hook.) Schltr., donde la corteza de pino no ha sido apropiada para su aclimatación (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ y HERNÁNDEZ DEL VALLE 2006). Como alternativa se recomienda

utilizar mezclas de sustratos, ya que se ha demostrado que una mezcla de corteza de pino con otros sustratos fue más eficiente en la aclimatación de plantas de cultivo *in vitro* en *Miltonia flavescens* Lindl. y *Laelia tenebrosa* (Rolfe) Rolfe (MULLER *et al.* 2007; ANTONIETTI *et al.* 2014). Otra opción que contribuye a la aclimatación de orquídeas de cultivo *in vitro* es la preaclimatación en laboratorio y posterior trasplante y aclimatación de las plantas en macetas con corteza de pino, metodología que proporcionó el 100% de supervivencia de *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f., después de 30 días (BILLARD *et al.* 2013). Por otro lado, el empleo de fibra de *Brahea dulcis* (Kunth) Mart. (Arecaceae), ha demostrado ser efectivo en la aclimatación del 46,9% de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. (FRANCISCO NAVA *et al.* 2011) y una mezcla de sustratos con corteza de encino, tezontle y carbón en una proporción de 1: 1: 1 permitieron una supervivencia del 85% en *Prosthechea citrina* (CAZAREZ-FAVELA *et al.* 2016). En este estudio tanto la corteza de pino como la de laurel y la perlita fueron favorables en la aclimatación de las plantas provenientes de las distintas polinizaciones (Figura 3).



Figura 3. Plantas provenientes de semillas originadas por polinización cruzada manual de *Cyrtopodium hatschbachii* en los distintos sustratos. A, corteza de pino; B, corteza de laurel; C, perlita. Escala: 2 cm

Figure 3. Plants from seed originated from manual crossing pollination of *Cyrtopodium hatschbachii* in different substrates. A, pinus bark; B, laurel bark; C, perlite. Scale: 2 cm.

CONCLUSIÓN

La polinización manual cruzada, como la autopolinización de una misma flor y flores distintas de una misma planta de *C. hatschbachii*, admitieron la formación de frutos con semillas viables.

Fue exitosa la germinación asimbiótica *in vitro* en el medio de cultivo MS a la mitad de su concentración original en presencia de luz y oscuridad, pero los mejores resultados de germinación se manifestaron bajo condiciones de luz.

En cuanto a la aclimatación las cortezas de pino y laurel fueron menos eficientes para las plantas provenientes de autopolinización de una misma flor, mientras que la perlita permitió altos porcentajes de sobrevivencias en las plantas provenientes de los diferentes tipos de polinización.

El protocolo desarrollado en este estudio es una estrategia más que puede contribuir con la conservación de *Cyrtopodium hatschbachii*, como de muchas otras especies de orquídeas.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Misiones por financiar este estudio a través del proyecto, "Estudios de polinización y germinación de semillas de orquídeas nativas de la Selva Misionera en peligro de extinción" 16/F1177-TI.

BIBLIOGRAFÍA

ANTONIETTI, D., Buttini, S., da Costa Zonetti, P., Guimarães, A. T. B., & Stefanello, S. 2014. Plant growth of *Laelia tenebrosa* Rolfe treated with gibberellic acid and grown on different substrates. *Idesia*, 32(3), 7-11.

ÁVILA-DÍAZ, I., & Salgado-Garciglia, R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas. Facultad de Biología, UMSNH*, 8, 138-149.

BALTIERRA, X. C., & Alonso, C. 2012. Mejoramiento genético de orquídeas chilenas. Protocolo de micropropagación de *Gavilea glandulifera* (Poepp.) MN Correa. *Revista del Jardín Botánico de Chagual*. 10, 40-47

BARRIOS, Y., Ramirez, N., Ramírez, E., Sánchez, E., & Del Castillo, R. 2010. Importancia de los polinizadores en la reproducción de seis especies de subpáramo del pico Naiquatá (parque nacional el Ávila-Venezuela). *Acta Botánica Venezuelica*, 33(2), 213-231.

BILLARD, C. E., Dalzotto, C. A., & Lallana, V. H. 2013. Germinación de *Bletilla striata* (Thunb.) Rehb. f. en medio líquido y evolución de plantas en medio semisólido. *Investigación Agraria*, 15(1), 7-14.

CASAS, A., Camou, A., Otero-Arnaiz, A., Rangel-Landa, S., Cruse-Sanders, J., Solís, L., Torres, I. Delgado, A. Moreno-Calles, A. I. Mariana Vallejo, Guillén, S. Blancas, J. Parra, F. Farfán-Heredia, B. Aguirre-Dugua, X. & Arellanes, Y. 2015. Manejo tradicional de biodiversidad y ecosistemas en Mesoamérica: el Valle de Tehuacán. *Investigación ambiental Ciencia y política pública*, 6(2), 23-44.

CASTAÑOS, O. F., Zometa, J. F. C., de Godoy, M. E. M., Pastrana, M. R. G., Arnao, M. T. G., Valencia, M. G., & Rivera, N. A. 2017. Germinación *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 21(2), 69-85.

CAZAREZ-FAVELA, T. L., de Jesús Graciano-Luna, J., Solís-González, S., Díaz-Ramírez, B., Nájera-Luna, J. A., & Montoya-Ayón, J. B. 2016. Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) WE Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (67), 19-25.

CHRISTENHUSZ, M. J., & Byng, J. W. 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201-217.

CUARTAS-DOMINGUEZ, M., Rojas-Céspedes, A., Jara-Arancio, P., & Arroyo, M. T. 2017. Sistema reproductivo de *Trichopetalum plumosum* (Ruiz & Pav.) JF Macbr. (Asparagaceae), geófito endémico de Chile. *Gayana. Botánica*, 74(1), 73-81.

DE LA CUADRA, C. 1993. Germinación, latencia y dormición de las semillas. *Madrid: Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario. España*.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, Y., & Hernández Del Valle, G. 2006. Aclimatación de plantas *in vitro* de *Encyclia phoenicia* (Ldl.) Neum. (Orchidaceae) en diferentes sustratos. *Biología Vegetal*, 6(4), 225-240.

- FRANCISCO-NAVA, J. J., Jiménez-Aparicio, A. R., Jesús-Sánchez, D., Arenas-Ocampo, M. L., Ventura-Zapata, E., & Evangelista-Lozano, S. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*. *Polibotánica*, (32), 107-117.
- KAHILAINEN, A., Puurtinen, M., & Kotiaho, J. S. 2014. Conservation implications of species–genetic diversity correlations. *Global Ecology and Conservation*, 2, 315-323.
- MACIEL, A. A., Cardoso, J. C., & Oliveira, P. E. 2019. On the low reproductive success of two *Cyrtopodium* species (Orchidaceae: Cyrtopodiinae): The relative roles of biotic and abiotic pollination. *Plant Species Biology*, 35(1), 49-58.
- MANRIQUE, J. P. 2007. Efecto del medio básico, carbón activado, ácido giberélico y calidad de luz en la germinación *in vitro* de *Masdevallia auropurpurea* Reich. *Revista científica*, (9), 117-141.
- MULLER, T.S.; Dewes, D.; Karsten, J.; Schuelter, A.R.; Stefanello, S. 2007. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens*. *Revista Brasileira de Biociências*, 5:252-254.
- MURASHIGE, T. & Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Copenhagen. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- ORTEGA-LARROCEA, M. P., Martínez, A., & Chávez, V. M. 2007. Conservación y propagación de orquídeas. *Conservación y Propagación de Orquídeas*, 483-495. http://www.repsa.unam.mx/documentos/Ortega-Larrocea_et_al_2009_conservacion_y_propagacion.pdf
- PARRA-TABLA, V., Vargas, M., Feinsinger, P., Arrazola, M., Esteban, J., & Leirana Alcocer, J. 2000. Efecto de la fragmentación de hábitats en la ecología de poblaciones de dos especies de orquídeas del estado de Yucatán. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/3179/22993_1189_PRIMERCONGRESODE.pdf?sequence=1
- PÉREZ-MARTÍNEZ, B. A., & Castañeda-Garzón, S. L. 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotechnología Vegetal*, 16(3), 143-151.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, B. A., & Pacheco-Salamanca, R. A. 2005. Germinación *in vitro* de la orquídea *Masdevallia ignea* Rchb. fa partir del cultivo de semillas provenientes de diferentes tipos de polinización. *Pérez-Arbelaesia*, (16), 45-55.
- POTT, A., Pott, V. J., Catian, G., & Scremin-Dias, E. 2019. Floristic elements as basis for conservation of wetlands and public policies in Brazil: the case of veredas of the Prata River. *Oecologia Australis*, 23(4), 744-763.
- QUIROGA, D., Martínez, M., & Larrea Alcázar, D. M. 2010. Sistemas de polinización de cinco especies de orquídeas creciendo bajo condiciones de invernadero. *Ecología en Bolivia*, 45(2), 131-137.
- RODRÍGUEZ, L.; Valles, JR; González, R.; Alvarado, K; Telles, E; Diaz, A; Sánchez, E. 2001. Germinación asimbiótica “*in vitro*” de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. *Biotechnología Vegetal*, 1(2), 115-116.
- RODRÍGUEZ, L., González, R., Alvarado, K., & Telles, E. 2007. Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres. *Biotechnología vegetal*, 7(3).
- RODRÍGUEZ, L., González, R., Díaz, A., Fajardo, E., Sánchez, E., Hernández, J., Castañeira, M. de la Cruz, G & González, J. 2003. Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiata*. *Biotechnología Vegetal*, 3(2), 119-121.
- SALAZAR-MERCADO, S. A., & Gélvez-Manrique, J. D. 2015. Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas utilizando la prueba de Tetrazolio e Índigo Carmin. *Revista de Ciencias*, 19(2), 59-69.
- SANTOS, T. S., & de Azevedo, C. O. 2021. Luz, câmera, ação: documentário sobre a biologia reprodutiva de *Cyrtopodium holstii* (Orchidaceae). *Botânica Pública*, 2, 44-48.
- SEDANO, C. G., Manzo, G. A., Roldán, H. R., & Castellanos, J. A. 2015. Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 451-456.
- SUÁREZ-GUERRA, L. 2016. Informe de nuevo cultivar. *Dendrobium* ‘Tropical Classic’. nuevo híbrido de orquídea para Cuba. *Cultivos Tropicales*, 36(5 Esp), 132.
- SUÁREZ-GUERRA, L., & Téllez-Beltrán, G. 2018. *Dendrobium* ‘Ovas Stripe’. Nuevo híbrido de orquídea para Cuba. *Cultivos Tropicales*, 39(1), 119-119.

SURENCISKI, M. R., Flachslund, E. A., Terada, G., Mroginski, L. A., & Rey, H. Y. 2012. Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. *Biocell*, 36(1), 31-36.

TAMAY, L. D. C., Cruz, J. Y. S. R., & García, E. A. P. 2016. Diversidad y uso de las orquídeas. *Bioagrocencias*, 9(1); 1-7.

TORRETTA, J. P., Gomiz, N. E., Aliscioni, S. S., & Bello, M. E. 2011. Biología reproductiva de *Gomesa bifolia* (Orchidaceae, Cymbidieae, Oncidiinae). *Darwiniana, nueva serie*, 49(1), 16-24.

VOGEL, I. N., & Macedo, A. F. 2011. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(2), 147-155.

WALSH, R. P., Arnold, P. M., & Michaels, H. J. 2014. Effects of pollination limitation and seed predation on female reproductive success of a deceptive orchid. *AoB plants*, 6.