

## **EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DESINFECCIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS PARA LA SIEMBRA “IN VITRO”**

Dalzotto<sup>1</sup>, Carlos Alberto; Billard<sup>2</sup>, Cristina Ester; Lallana<sup>2</sup>, Víctor Hugo

<sup>1</sup>Becario de Iniciación en la Investigación y <sup>2</sup>Docentes coordinadores. Universidad Nacional de Entre Ríos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cátedra de Fisiología Vegetal. Oro Verde, Ruta 11, Km 10,5. Entre Ríos. Argentina. e-mail<sup>1</sup>: carlosdalzotto@yahoo.com.ar

Palabras claves: orquídeas epifitas, técnica desinfección, germinación “in vitro”, viabilidad

En la provincia de Entre Ríos (Argentina), *O. bifolium* Sims. está citada como especie epífita nativa cuya distribución es amplia en toda la zona litoral y centro norte del país. El objetivo de este trabajo fue comparar dos métodos de desinfección de semillas de *Oncidium bifolium*, evaluados a través de la germinación “in vitro”. Los frutos fueron cosechados en enero de 2011. Las semillas se conservaron en heladera, durante 60 días, en cápsulas plásticas con tapa hasta el momento de la siembra. Antes de la siembra se evaluó la viabilidad mediante la prueba de tetrazolio. Para la siembra asimbiótica se usó el medio de cultivo semisólido Murashige y Skoog a la mitad de concentración, el cual se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 kg cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos y distribuido en cajas de petri de vidrio de 5 cm de diámetro. La desinfección de semillas se realizó con hipoclorito de sodio al 0,5% con el agregado de Tween 20. Siembra de los tratamientos (T): T1, las semillas con solución desinfectante se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada; T2 no se enjuagaron y se sembraron con la solución desinfectante. Para la siembra de ambos tratamientos se trabajó con micropipeta automática regulable en una dosis de 0,1 ml de solución (aproximadamente 250 semillas) que fueron esparcidas sobre el medio de cultivo estéril en cajas de petri, tapadas y llevadas a cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1 °C y un fotoperíodo de 16 horas, con luz grow lux. De cada tratamiento se hicieron 10 repeticiones (caja de petri) y se evaluó el porcentaje de germinación en cada repetición en 3 submuestras de 1 cm<sup>2</sup> a los 14, 29, 49, y 67 días después de la siembra (dds). Los datos se analizaron estadísticamente efectuándose un análisis de varianza y la diferencia entre medias empleando la prueba de Duncan para un nivel de significación del 95 % ( $p \leq 0,05$ ). La viabilidad fue de 94,33%. La germinación asimbiótica, ocurrió a los 14 días. A los 29 días se registró el máximo de germinación con 86,8% y 84,4% para el T1 (con enjuague) y T2 (sin enjuague), respectivamente, no encontrándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamientos. Dichos porcentajes de germinación en comparación con la viabilidad fueron menores, siendo la diferencia de 7,5% para el T1 y 9,9% para el T2. A los 49 dds, se comenzó a visualizar en el T2, la presencia de protocormos blanquecinos y a los 67 dds el porcentaje de protocormos blancos fue del 14%, disminuyendo de esta manera el porcentaje de semillas germinadas a un 73,2%; encontrándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con el T1 desde el momento en que se registraron los protocormos blancos. A partir de estos resultados podemos concluir que se recomienda realizar el enjuague con agua destilada esterilizada durante la etapa de desinfección de las semillas de *O. bifolium* para garantizar un mayor porcentaje de supervivencia de los protocormos.

## Introducción

En la provincia de Entre Ríos (Argentina), *O. bifolium* Sims. está citada como especie epífita nativa cuya distribución es amplia en toda la zona litoral y centro norte del país (Cellini et al., 2009).

Las semillas de orquídeas se caracterizan por ser muy pequeñas, carecen de endosperma y el embrión es inmaduro. Una de las cuestiones claves en la siembra asimbiótica, es la desinfección adecuada de las diminutas semillas para evitar la contaminación una vez sembradas en los medios de cultivo. El objetivo de este trabajo fue comparar dos métodos de desinfección de semillas de *Oncidium bifolium*, evaluados a través de la germinación “in vitro”.

## Materiales y métodos

Un fruto de *Oncidium bifolium*, cosechado el 07/01/11 y al comenzar su dehiscencia se procedió a recoger las semillas en cápsulas plásticas con tapa y conservarlas en heladera (4° C) hasta el momento de su siembra. Las semillas se sometieron a la prueba de viabilidad por tetrazolio, siguiendo la metodología propuesta por Lallana y García (2010).

El medio del cultivo que se empleó para la germinación asimbiótica, fueron las sales de Murashige & Skoog (1962), a la mitad de su concentración, suplementado con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 5 g.L<sup>-1</sup> de Agar Agar Britania; pH 5,6 – 5,8; el cual se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 kg cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos y distribuido en cajas de petri de vidrio de 5 cm de diámetro.

Para la siembra “in vitro”, se procedió a la desinfección de las semillas, utilizando el método de desinfección por agitación (Mweetwa et al., 2008) modificado y el de matraz y pipeta (Pierik, 1990) modificado. Se sacaron dos alícuotas de semillas, con una espátula metálica; y se las colocaron en tubos de vidrio con solución desinfectante (hipoclorito de sodio, al 0,5% de producto comercial con el agregado de Tween 20). Luego se las colocó en un agitador orbital a 225 rpm durante 7 minutos y luego se dejaron reposar por 8 minutos.

Los tratamientos (T) fueron: T1, las semillas se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada, pasando entre enjuagues, 3 minutos; T2 no se enjuagaron y se sembraron con la solución desinfectante.

Para la siembra de ambos tratamientos se trabajó con micropipeta automática regulable en una dosis de 0,1 ml de solución (aproximadamente 250 semillas) que fueron esparcidas sobre el medio de cultivo estéril en cajas de petri, tapadas y llevadas a cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1 °C y un fotoperíodo de 16 horas, con luz grow lux.

De cada tratamiento se hicieron 10 repeticiones (caja de petri) y se evaluó el porcentaje de germinación en cada repetición en 3 submuestras de 1 cm<sup>2</sup> a los 14, 29, 49, y 67 días después de la siembra (dds). Los datos se analizaron estadísticamente efectuándose un análisis de varianza y la diferencia entre medias empleando la prueba de Duncan para un nivel de significación del 95 % ( $p \leq 0,05$ ).

## Resultados y discusión

La viabilidad fue de 94,33 %. La germinación de *O. bifolium* ocurrió a los 14 días (Figura 1). A los 29 días se registró el máximo de germinación siendo de 86,8% y 84,4% para el T1 y T2, respectivamente, no encontrándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamientos. Dichos porcentajes de germinación en comparación con la viabilidad fueron menores, siendo la diferencia de 7,5% para el T1 y 9,9% para el T2 (Figura 1). Esta disminución de la germinación pudo ser causada por la dosis de hipoclorito de sodio empleada y/o el tiempo de desinfección de las semillas; además en el T2 al no realizar el enjuague de las semillas, el efecto residual de la solución desinfectante pudo haber dañado a los embriones.

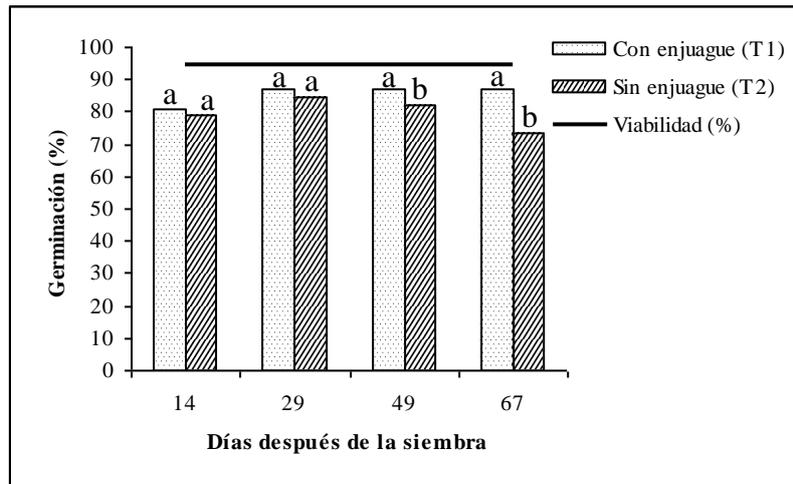


Figura 1. Viabilidad (%) (Línea horizontal superior) y porcentaje de germinación de *O. bifolium* a los 14, 29, 49 y 67 dds en los tratamientos T1 y T2. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

A los 49 dds, se comenzó a visualizar en el T2, la presencia de protocormos blanquecinos y a los 67 dds el porcentaje de éstos fue del 14%, disminuyendo de esta manera el porcentaje de semillas germinadas a un 73,2%. Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con el T1 desde el momento en que se registraron los protocormos blancos (Figura 1). A los 67 dds se observó crecimiento rápido del embrión y desarrollo de la yema apical.

Alvarez - Pardo *et al.*, (2006) encontraron que el tiempo y la dosis de desinfección afecta a la germinación de las semillas de *O. pumilum* Lindl; en donde disminuyó en un 29% con respecto a la viabilidad de la semillas cuando estas fueron sometidas a una dosis de 0,4% de cloro activo durante 15 minutos, mientras que para la misma dosis durante 5 minutos esta no afectó a la germinación.

### Conclusiones

Se recomienda realizar enjuagues con agua destilada esterilizada durante la etapa de desinfección de las semillas de *O. bifolium* para garantizar un mayor porcentaje de supervivencia de los protocormos.

### Bibliografía

- ALVAREZ – PARDO, V.; FERREIRA, A.; NUNES, V. (2006). Seed didinfestation methods “in vitro” cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira* 24: 217-220.
- CELLINI, J.M. ; SALOMON, L. ; GARCIA, R. ; CELLINI, L. y SANCHEZ, M. (2009). Límite sur del área de distribución de *Oncidium bifolium* Sims. *Boletín Sociedad Argentina de Botánica*. Vol. 44. suplemento p. 83. XXXII Jornadas Argentinas de Botánica. Huerta Grande, Córdoba.
- MWEETWA, A.M.; WELBAUM, G.E.; TAY, D. (2008). Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on “in vitro” germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Scientia Horticulturae* 117:257-262.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- LALLANA, V.H.; GARCIA, F.L. (2010). Puesta a punto de la prueba de tetrazolio en semillas de orquídeas. 75° Reunión de Comunicaciones Científicas de la Asoc. Cienc. Nat. Del Litoral. Santa Fe, 23 de junio de 2010. Resúmenes, Pág. 8.
- PIERIK, R. L. M. (1990). Cultivo “in vitro” de las plantas superiores. Mundi Prensa, p. 301. Madrid.