

**EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y
ESCOTOPERIODO EN LA GERMINACIÓN
DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO *in vitro*
DE *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler &
W.E. Higgins (ORCHIDACEAE)**

**EFFECT OF CULTURE MEDIA AND
SKOTOPERIOD ON THE GERMINATION
OF SEEDS AND GROWTH *in vitro* OF
Guarianthe skinneri (Bateman) Dressler &
W.E. Higgins (ORCHIDACEAE)**

Hernández-Ramírez, Fabiola; Leobardo Iracheta-Donjuan, Anne Asbhy Damon, Sylvia Patricia Fernández-Pavía y Karina Guillén-Navarro

EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y ESCOTOPERIODO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO *in vitro* DE *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (ORCHIDACEAE)

EFFECT OF CULTURE MEDIA AND SKOTOPERIOD ON THE GERMINATION OF SEEDS AND GROWTH *in vitro* OF *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (ORCHIDACEAE)



Efecto del medio de cultivo y escotoperiodo en la germinación de semillas y crecimiento *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae)

Effect of culture media and skotoperiod on the germination of seeds and growth *in vitro* OF *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae)

Hernández-Ramírez, Fabiola;
Leobardo Iracheta-Donjuan,
Anne Asbhy Damon,
Sylvia Patricia Fernández-Pavía
y Karina Guillén-Navarro

EFFECTO DEL MEDIO DE
CULTIVO Y
ESCOTOPERIODO EN LA
GERMINACIÓN DE
SEMILLAS Y
CRECIMIENTO *in vitro* DE
Guarianthe skinneri (Bateman)
Dressler & W.E. Higgins
(ORCHIDACEAE)

EFFECT OF CULTURE
MEDIA AND
SKOTOPERIOD ON THE
GERMINATION OF SEEDS
AND GROWTH *in vitro* OF
Guarianthe skinneri (Bateman)
Dressler & W.E. Higgins
(ORCHIDACEAE)

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 56: 151-170. Julio 2023

DOI:

10.18387/polibotanica.56.8

F. Hernández-Ramírez / <https://orcid.org/0009-0008-6568-3515>

El Colegio de la Frontera Sur, 30700, Tapachula, Chiapas, México

Leobardo Iracheta-Donjuan / <https://orcid.org/0000-0003-2908-4183>

Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CERI-INIFAP), 30870, Tuxtla Chico, Chiapas, México

Anne Asbhy Damon / adamon@ecosur.mx

<https://orcid.org/0000-0002-3008-9435>

El Colegio de la Frontera Sur, 30700, Tapachula, Chiapas, México

Sylvia Patricia Fernández-Pavía / <https://orcid.org/0000-0003-0460-5528>

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58880, Tarímbaro, Michoacán, México

Karina Guillén-Navarro / <https://orcid.org/0000-0001-5199-1156>

El Colegio de la Frontera Sur, 30700, Tapachula, Chiapas, México

RESUMEN: *Guarianthe skinneri* está sujeta a protección debido a la disminución de sus poblaciones silvestres, y la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas es una alternativa viable para la conservación y restauración de poblaciones. Este proceso de laboratorio también facilita el estudio detallado de las fases de germinación, ahora, en el caso de las orquídeas, repartido en dos etapas, la pregerminación y la germinación, como contribución al diseño de una estrategia para la restauración de poblaciones de esta orquídea. Con este fin, se evaluó el efecto de cuatro medios de cultivo (Yasuda 10% + 0.112 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP), Yasuda 100% + 1.125 mg L⁻¹ BAP, Dalla Rosa & Laneri modificado, Murashige & Skoog) y dos condiciones de escotoperiodo (12 y 24 h) sobre las diferentes fases de la pregerminación y germinación de semillas. Los medios Yasuda y Dalla Rosa promovieron el desarrollo y terminación de las fases de germinación, mientras que en el medio MS los porcentajes fueron bajos en el desarrollo de las Fases 4 y 5, ocasionados por los altos porcentajes de oxidación en Fases 2 y 3. Las condiciones de escotoperiodo no afectaron el proceso de germinación de las semillas.

Palabras clave: “La Candelaria”, protocormos, pregerminación, oxidación, agua de coco, 6-bencilaminopurina.

ABSTRACT: *Guarianthe skinneri* is subject to protection due to the loss of natural, wild populations, and the *in vitro* symbiotic germination of seeds is a viable alternative for the conservation and restoration of such populations. This laboratory process also facilitates the detailed study of the phases of germination, that, in the case of orchids, we now divide into two stages, pre-germination and germination, as a contribution towards the design of a strategy for the restoration of populations of this orchid. To that end, we evaluated the effect of four culture media, (Yasuda 10% + 0.112 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP), Yasuda

100% + 1.125 mg/L BAP, modified Dalla Rosa & Laneri, Murashige & Skoog) and two skotoperiods (12 and 24 h), observing the phases of pre-germination and germination of the seeds in all treatments. The treatments with the culture media Dalla Rosa and Yasuda promoted the development and completion of the germination phases. The MS medium gave low percentages of development for phases 4 and 5, due to high percentages of oxidation in phases 2 and 3. The two skotoperiods did not affect the germination process.

Key words: “La Candelaria”, protocorms, pre-germination, oxidation, coconut water, 6-benzylaminopurine.

INTRODUCCIÓN

Guarianthe skinneri (Bateman) Dressler & Higgins (antes *Cattleya skinneri* Bateman), llamada “La Candelaria” es una orquídea epífita silvestre, distribuida desde el sureste de México hasta Panamá (Cabrera, 2006). Actualmente se encuentra amenazada por la destrucción de su hábitat natural, y por la alta demanda en temporada de floración debido a la belleza de sus flores, que van de lilas a moradas; plantas completas son arrancadas de sus forófitos en remanentes de bosques, selvas y agroecosistemas de café (Damon, 2013; Solano-Gómez *et al.*, 2016). Para su protección, en México está enlistada en la categoría de amenazada en la NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010, e internacionalmente se encuentra en la categoría II del CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre).

Una de las estrategias de conservación, es el cultivo sostenible, el cual solo se permite con los permisos correspondientes (Damon, 2017). Las orquídeas se pueden reproducir por propagación asexual con la división de plantas, no obstante, este proceso es lento, demanda conocimiento de buenas prácticas de manejo para evitar enfermedades y, al ser plantas clonales, la diversidad genética es baja, lo cual representa una desventaja cuando se trata de rescatar y conservar la máxima variabilidad genética. Por el contrario, con la propagación sexual, a través de semillas, la variabilidad genética es mayor, y contribuye al mantenimiento de las poblaciones, y las plantas desarrolladas tienen mayor probabilidad de estar libres de enfermedades. Las semillas de las orquídeas son muy pequeñas (0.006 a 0.2 mm de longitud, de acuerdo con la especie), no tienen endospermo y carecen de reservas, o solo tienen un mínimo de lípidos para germinar (Arditti & Ghani., 2000; Koene *et al.*, 2020; Yeung, 2017). Para la germinación de las semillas y otras funciones fisiológicas, las plantas de la familia Orchidaceae requieren de la asociación con hongos endófitos formadores de micorrizas o HEFM (López-Chávez *et al.*, 2016; Rasmussen *et al.*, 2015). Las orquídeas se caracterizan por la formación del protocormo, estructura embrionaria con incremento de volumen por división celular y diferenciación del meristemo apical, con expresión génica distinta a la del embrión inicial, que consiste en una masa de células aun no diferenciadas, y diseñadas para establecer la asociación con los HEFM (Fang *et al.*, 2016). A partir de estudios *in situ*, se estima que, aun suponiendo la disponibilidad de los HEFM en el medio natural, solo el 1 % de semillas germinan, lo que implica bajas tasas de reclutamiento de nuevos individuos para el mantenimiento de las poblaciones naturales (Cruz-Higareda *et al.*, 2015; Emeterio-Lara *et al.*, 2018). Por ello, resulta útil enfocar esfuerzos para optimizar el aprovechamiento de las semillas producidas por las poblaciones naturales.

Desde hace varias décadas se ha implementado la germinación asimbiótica (sin la asociación de un HEFM) de semillas de orquídeas en laboratorio (*in vitro*), basándose en el uso de diferentes medios de cultivo adicionados con sacarosa para sustituir los recursos alimenticios provistos por los hongos (Arditti & Ghani, 2000). Se ha reportado el uso de medios como Murashige & Skoog (1962) (Coello *et al.*, 2010) y otros medios de cultivo utilizados para la germinación de semillas de orquídeas como el medio Dalla Rosa & Laneri (1977), Yasuda *et al.* (1985) y Knudson (1946), los cuales han tenido respuestas favorables (Damon *et al.*, 2014; Torres-González *et al.*, 2011) y no han sido reportados para la germinación de semillas de *G. skinneri*. Los medios de cultivo pueden ser adicionados con reguladores de crecimiento, por ejemplo, con 6-bencilaminopurina (BAP), conocida por promover la

diferenciación celular y proliferación de protocormos (David *et al.*, 2008) o la adición de componentes orgánicos como el agua de coco (*Cocos nucifera* L.) que facilita la germinación por el contenido de varias hormonas como auxinas y citoquininas (Utami & Hariyanto, 2020). Una de las respuestas observadas en el cultivo *in vitro* es la oxidación u oscurecimiento de las células vegetales causado por diversos factores, como la composición del medio de cultivo o condiciones ambientales, entre otros. Los periodos de escotoperiodo (Vogel & Macedo, 2011) y la reducción de las concentraciones de los medios de cultivo (Cassells & Curry, 2001) son medidas propuestas para evitar la oxidación en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

Una de las ventajas de la germinación *in vitro* es que se pueden observar detalladamente las fases de germinación y la proporción de individuos en cada una de ellas, y de allí poder precisar tratamientos para optimizar el proceso. Se ha documentado, bajo condiciones de laboratorio, que los embriones pasan por diferentes fases, y de acuerdo al criterio aplicado puede ir desde la fase 0 hasta la 5, 6 o 7. Las fases contemplan desde semillas sin embrión (0), el hinchamiento o imbibición del embrión (1), ruptura de testa (cubierta delgada que protege al embrión) (1-2), incremento de tamaño del embrión (3), diferenciación de protocormos (3-4), desarrollo de ápices foliares y raicillas (5) y el desarrollo de hojas y raíces (6-7) (Damon *et al.*, 2014; Johnson & Kane, 2007; Maldonado *et al.*, 2020; Salazar-Mercado, 2012; Stewart & Kane, 2006; Vasudevan & Van Staden, 2010; Vogel & Macedo, 2011). Además, se ha observado variación en el tiempo de inicio de la germinación de las semillas, conocido como asincronía (Koene *et al.*, 2020). Las fases de desarrollo y el grado de asincronía no han sido reportados aún en la germinación asimbiótica *in vitro* de *G. skinneri*.

Por lo antes mencionado, el objetivo de este estudio fue identificar el efecto de cuatro medios de cultivo, en combinación con dos condiciones de escotoperiodo, sobre las fases de germinación asimbiótica de *G. skinneri*, en condiciones de *in vitro*, para la producción de plántulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y desinfección de la cápsula

En abril del 2020, se colectaron cápsulas de semillas maduras, antes de la dehiscencia (aproximadamente 12 meses de desarrollo) de *G. skinneri* (5 cm de longitud x 1.5 cm de diámetro), disponibles en el Jardín Etnobiológico de las Selvas del Soconusco (JESS), de El Colegio de la Frontera Sur, ubicado en el municipio de Tuzantán, Chiapas (Coordenadas: 15°07'02.3" N, 92°24'48.7" W y altitud de 80 m). Se encontraron dos cápsulas que se trasladaron en una bolsa etiquetada hacia el Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CERI-INIFAP), en Tuxtla Chico, Chiapas. De estas dos capsulas solo una tenía la calidad adecuada y se trabajó con una cápsula.

La cápsula se desinfectó usando la metodología de (Torres-González *et al.*, 2011), con las siguientes modificaciones: la superficie de la cápsula se limpió por un minuto con algodón humedecido con detergente líquido comercial y se enjuagó con abundante agua del grifo. Dentro de la campana de flujo laminar, la cápsula se colocó en una caja de Petri de vidrio esterilizada (de 90 x 15 mm) y se asperjó con alcohol etílico 96 % y se flameó por 30 s.

Siembra de semillas en medios de cultivo y escotoperiodo

Una vez que la cápsula estuvo a temperatura ambiente, se realizó un corte longitudinal (Fig. 1A); con una pinza se extrajeron las semillas y se depositaron en 50 mL de agua destilada esterilizada, después se agitó constantemente para formar una solución homogénea. Con una micropipeta, se tomaron 500 μ L de la solución (aproximadamente 3,171 semillas), cantidad que se depositó en la superficie de cuatro medios de cultivo semisólidos (Fig. 1B). Al finalizar la siembra, las cajas Petri selladas y etiquetadas se incubaron a 26 ± 1 °C, en dos condiciones de escotoperiodo, de 12 h o 24 h. Para la

primera condición de escotoperiodo, la fase luminosa se suministró con lámparas LED de color blanco frío (Smartlight, con $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Los cuatro medios semisólidos utilizados para la siembra de las semillas correspondieron a los siguientes: Medio Y10, con macro y micronutrientes de Yasuda *et al.* (1985) al 10%, adicionado con 0.112 mg L^{-1} 6-bencilaminopurina (BAP; Sigma-Aldrich[®]); medio Y100, constituido por las sales de Yasuda *et al.* (1985) al 100%, con 1.125 mg L^{-1} BAP, ambos medios con 30 g L^{-1} de sacarosa, 5.2 g L^{-1} de Phytigel (Sigma-Aldrich[®]) y pH de 6.3 de acuerdo con Torres *et al.* (2011). Medio DR (Dalla Rosa & Laneri, 1977), adicionado con 150 mL L^{-1} de agua de coco (A de coco[®]), 20 g L^{-1} de sacarosa y 8 g L^{-1} de agar (Bacto Agar BD) y pH 5.5. Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con 30 g L^{-1} de sacarosa, 5.2 g L^{-1} de Phytigel y pH de 5.8. Todos los medios fueron esterilizados a 120 °C y 1.1 kg cm^{-2} de presión por 20 min y después se vertieron 10 mL en cajas Petri esterilizadas de 60 x 15 mm.



Fig. 1. A) Corte longitudinal de cápsula de semillas de *Guarianthe skinneri*, B) Siembra de semillas en medio de cultivo y C) Plántulas de *G. skinneri* en proceso de aclimatación.

Prueba de viabilidad

De la solución utilizada en la siembra, se depositaron $500 \mu\text{L}$ en un criotubo de $2000 \mu\text{L}$, dejando que las semillas se precipitaran. Con una micropipeta se retiró el agua del criotubo, enseguida se agregaron 1.5 mL de una solución de 1 g L^{-1} de tetrazolio (2,3,5-cloruro trifeníl tetrazolio; Sigma-Aldrich[®]); la muestra se preservó en oscuridad por 24 h en $26 \pm 1 \text{ °C}$. Posteriormente la viabilidad se evaluó, para lo cual, se realizó la observación y conteo de las semillas en tetrazolio por campo de visión en un microscopio estereoscopio Zeiss ($1.0 \times \text{FWD}$ 81 mm). Las semillas se consideraron viables cuando se observó el embrión teñido en rojo; semillas con el embrión de color blanco se consideraron no viables, y semillas vanas o vacías eran las que no tenían embrión. El porcentaje de viabilidad se obtuvo al multiplicar el número de semillas viables (embriones teñidos) por 100, dividido entre el total de semillas en la muestra. El conteo se realizó 10 veces en zonas diferentes de cada una de las cuatro placas y se obtuvo un promedio.

Diseño del experimento

Para la evaluación de la germinación de las semillas se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 4×2 (AxB), del cual se obtuvieron ocho tratamientos, resultado de la combinación de cuatro medios de cultivo (Factor A) y dos condiciones de escotoperiodo (Factor B). Para las evaluaciones, se tomaron muestras de cada tratamiento, correspondiente a 1 cm^2 de medio de cultivo con 155 semillas aproximadamente, y con cuatro repeticiones.

Variables

La evaluación de la pregerminación (Fases 2 y 3) y germinación (Fases 4 y 5) se realizó de acuerdo con las fases descritas por Damon *et al.*, (2014), modificado de esta forma: Fase 1 = semilla con embrión. Para la etapa de pregerminación, se incluye la Fase 2 = hinchamiento o imbibición de embrión y Fase 3 = ruptura de testa y formación de protocormo. La etapa de germinación comprende la Fase 4 = protocormo con ápice (diferenciación) y la Fase 5 = protocormo con emergencia de rizoides o primordio foliar (Fig. 2). Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de cada fase al multiplicar el número de embriones y protocormos en la fase correspondiente por 100, y el resultado obtenido dividido entre el total de semillas.

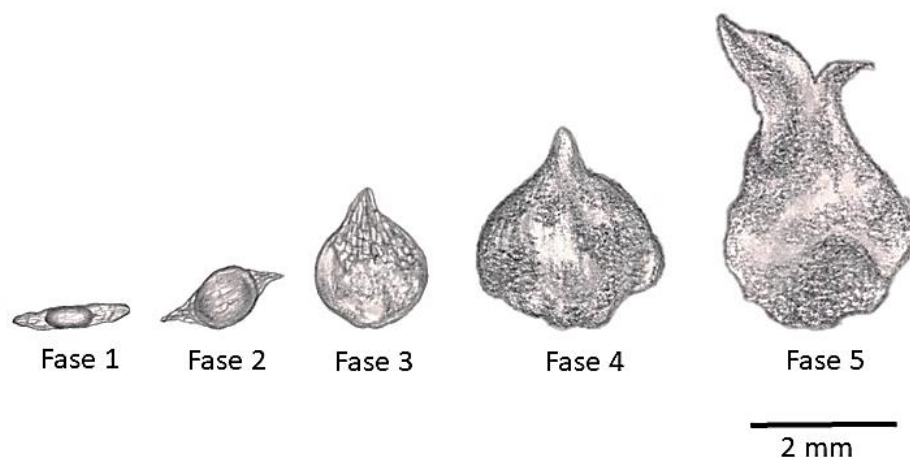


Fig 2. Fases de germinación de semillas de *Guarianthe skinneri*. Fase 1 = semilla con embrión, Pregerminación: Fase 2 = hinchamiento o imbibición de embrión, Fase 3 = ruptura de testa y formación de protocormo, Germinación: Fase 4 = protocormo con ápice (diferenciación) y Fase 5 = protocormo con emergencia de rizoides o primordio foliar.

Se capturaron imágenes de los embriones y protocormos usando un microscopio estereoscópico y una escala, y posteriormente se realizaron las mediciones de longitud y ancho en milímetros con el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ®.

Para evaluar el porcentaje de oxidación se consideraron dos variantes: para el caso de las muestras expuestas a escotoperiodo de 12 h, se consideró explante oxidado al cambio de coloración en los embriones y/o protocormos verdes (clorofílicos) a café en la totalidad del tejido, sin respuesta morfogénica, y para el caso del escotoperiodo de 24 h, correspondió al cambio de coloración de blanco (aclorofílicos) a café, sin respuesta morfogénica. El porcentaje de oxidación se obtuvo al multiplicar el número de embriones y /o protocormos oxidados en cada área de muestreo por 100, y el resultado dividido entre el total de semillas por área de muestreo.

Las evaluaciones se realizaron cada siete días por 14 semanas.

Obtención de plantas aclimatadas

Se realizó la aclimatación de plántulas, de acuerdo con la metodología de Ortiz *et al.*, (2013). Una vez que las plántulas alcanzaron 1.5 a 2 cm de altura, con cinco a seis hojas expandidas y al menos una raíz desarrollada (Fig.1C), fueron trasplantadas en recipientes de unicel (19.5 cm de largo x 17.18 cm de ancho y 7 cm de altura) que contenían una mezcla de fibra de coco, agrolita y turba de *Sphagnum* (proporción 1:1:1) previamente esterilizado a 120 °C y 1.1 kg cm⁻² por 40 min (humedecido con 100 mL de agua destilada). Para recrear una cámara de humedad, los recipientes se colocaron en el interior

de charolas de germinación sobre una base de fibra de coco humedecida con 350 mL de agua. Para evitar la deshidratación durante la aclimatación temprana, se cubrieron con un domo (vinil transparente, 54 cm de largo x 28 cm de ancho y 11 cm de altura). Finalizado el trasplante, en la base de las plántulas se aplicaron 10 mL de MS al 25 % de concentración de sales.

Las charolas de germinación se trasladaron a un invernadero con malla sombra de color negro al 70 % de luz, cubierto con plástico blanco para evitar la precipitación pluvial. Las condiciones ambientales fueron registradas con un medidor ambiental (Enviro-meter®), a mediodía, una vez a la semana por 12 semanas. Se realizaron riegos con agua destilada sobre la base del sustrato de fibra de coco para alcanzar una humedad relativa (HR) del 90 %. En la semana dos después del trasplante, en los domos se realizaron ocho perforaciones (1 cm de diámetro), en la semana tres, los domos fueron levantadas parcialmente a una altura de 12 cm, y una semana después los domos fueron retirados. Durante las siguientes dos semanas se aplicaron riegos de agua por aspersion, hasta llevar a capacidad de campo.

Análisis de datos

Los análisis estadísticos fueron realizados en R versión 4.1.2. Los datos de las fases de desarrollo y la oxidación se compararon en un análisis de varianza (ANOVA); cuando hubo diferencias significativas se realizó la comparación de medias con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Se aplicó una prueba de correlación de Spearman para poder comparar el efecto de los diferentes medios de cultivo y los patrones temporales observados en relación con los promedios de la longitud y el ancho de los embriones y protocormos.

RESULTADOS

Viabilidad y pregerminación de semillas de *Guarianthe skinneri*

La prueba de tetrazolio mostró que, en promedio, el porcentaje de semillas viables fue del 80.3%, el 6.8% de las semillas fueron no viables y el 12.9% fueron semillas vanas (Fig. 3).

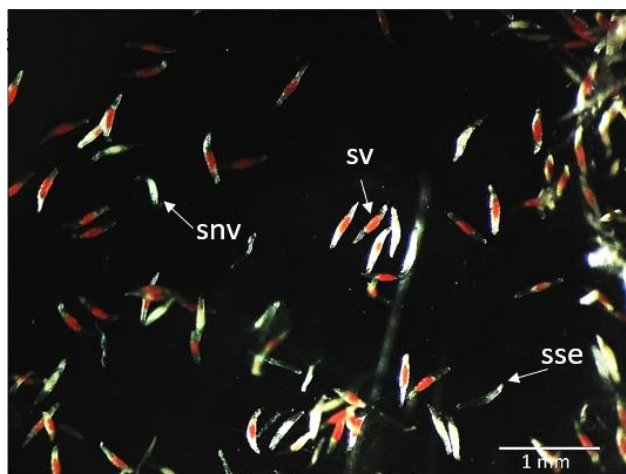


Fig 3. Semillas maduras de *Guarianthe skinneri* sometidas a la prueba de viabilidad con tetrazolio. sv= semilla viable, snv= semilla no viable, sse= semilla sin embrión o vana. Barra: 1 mm.

En los ocho tratamientos, la pregerminación se observó a partir de la tercera semana después de la siembra (sds), con el inicio de la Fase 2 (imbibición) de los embriones de *G. skinneri*. No obstante, el mayor porcentaje de respuesta para esta fase se obtuvo a partir de las seis semanas. Los tratamientos

con el mayor porcentaje de imbibición en esta fase fueron el Y10/24h, DR/12h y DR/24h con más del 80 % (Cuadro 1). Conforme los embriones de la Fase 2 continuaron su desarrollo, los porcentajes de imbibición disminuyeron gradualmente en las siguientes semanas. El inicio de la Fase 3 (ruptura de testa) se observó a las 5 sds, pero a partir de las 9 sds los porcentajes más altos (>50 %) se registraron en los tratamientos Y100/12h y Y10/12h, mientras que los tratamientos Y10/24h y DR/24h, expresaron el máximo porcentaje (>60 %) hasta las 12 sds y los porcentajes más bajos se obtuvieron en MS/12h y MS/24h (Cuadro 1).

El inicio de la Fase 4 (protocormos con ápice) se observó a las 8 sds y los porcentajes más altos fueron observados hasta las 14 sds en Y10/12h (44 %), mientras que los tratamientos MS/12h y MS/24h tuvieron los porcentajes más bajos, con menos del 8 %. Por su parte, el inicio de la Fase 5 (protocormos con primordios foliares y rizoides) ocurrió a partir de las 10 sds en Y10/24h y Y10/12h (7 a 10%); los tratamientos con menor porcentaje de desarrollo de embriones fueron MS/12h y MS/24h, con nulo o 1% (Cuadro 1).

El promedio general de la máxima expresión de desarrollo, en cada una de las fases, fue disminuyendo, por lo que en la Fase 2 se consigna el promedio más alto, el cual disminuyó gradualmente en las siguientes fases (Cuadro 1). Esto demuestra que no todos los embriones que alcanzan una etapa específica pasan al mismo tiempo a la etapa que precede.

Las cinco fases de desarrollo de embriones y protocormos fueron observadas a partir de las 10 sds en Y10/12h y a las 13 sds en el resto de los tratamientos. Por lo que, a las 14 sds se pudieron observar todas las fases de desarrollo en todos los tratamientos (Fig. 4), esto evidencia la asincronía en el proceso de pregerminación y germinación de semillas de *G. skinneri*. No obstante, aun cuando la máxima expresión de cada una de las fases de desarrollo se presenta en diferentes periodos de tiempo, a los 14 sds se observó que, en la mayoría de los tratamientos, la Fase 3 se presenta en mayor porcentaje, a excepción de los tratamientos Y10/12h con mayor proporción de la Fase 4 y ambos medios MS, con mayor porcentaje de la Fase 2 (Fig. 4). Lo anterior indica que el tratamiento Y10/12h induce con mayor celeridad el desarrollo de los embriones hacia fases más complejas. Mientras que ambos tratamientos con sales de MS propician una menor diferenciación en los embriones, lo que retrasa la expresión de fases de desarrollo más complejas.

Cuadro 1. Tiempo y porcentaje de respuesta máxima y mínima en cada fase de desarrollo de semillas de *Guarjanthe skinneri* cultivadas *in vitro* en diferentes condiciones de medio de cultivo y escotoperiodo, evaluados durante 14 semanas después de la siembra.

Tratamiento	Fase de desarrollo												
	Pregerminación									Germinación			
	Fase 1		Fase 2			Fase 3			Fase 4			Fase 5	
	Semilla		Imbibición			Ruptura de testa			Protocormo ápice			PPF [†] y rizoides	
Duración sds ^{††}	Mínima respuesta sds (%)	Inicio sds	Máxima respuesta sds (%)	Mínima respuesta sds (%)	Inicio (sds)	Máxima respuesta sds (%)	Mínima respuesta sds (%)	Inicio (sds)	Máxima respuesta sds (%)	Respuesta sds (%) ^{†††}	Inicio (sds)	Respuesta sds (%) ^{†††}	
Y10-12 h	2	7 (7)	3	7 (64)	10 (13)	5	10 (55)	12 (13)	8	12 (46)	14 (44)	10	14 (7)
Y10-24 h	2	8 (3)	3	6 (86)	12 (12)	5	12 (65)	14 (49)	8	14 (16)	14 (16)	10	14 (10)
Y100-12 h	2	8 (11)	3	7 (65)	12 (17)	5	9 (56)	14 (46)	8	14 (12)	14 (12)	10	14 (0)
Y100-24 h	2	6 (15)	3	6 (66)	14 (9)	5	14 (32)	14 (32)	8	14 (29)	14 (29)	10	14 (4)
DR-12 h	2	5 (8)	3	6 (84)	12 (14)	5	12 (47)	13 (43)	8	13 (28)	14 (28)	10	14 (1)
DR-24 h	2	7 (7)	3	6 (81)	13 (5)	5	12 (62)	13 (47)	8	14 (28)	14 (28)	10	14 (3)
MS-12 h	2	7 (32)	3	9 (45)	11 (37)	5	12 (10)	10 (8)	8	10 (08)	14 (08)	10	14 (1)
MS-24 h	2	7 (30)	3	6 (61)	11 (63)	5	12 (11)	10 (10)	8	10 (01)	14 (01)	10	14 (0)
Promedio		(14)		(69)	(21)		(42)	(31)		(21)	(21)		(3)

† PPF=Protocormos con primordios foliares. ††sds=semanas después de la siembra. ††† No categorizada como mínima al ser la respuesta registrada en la semana 14.

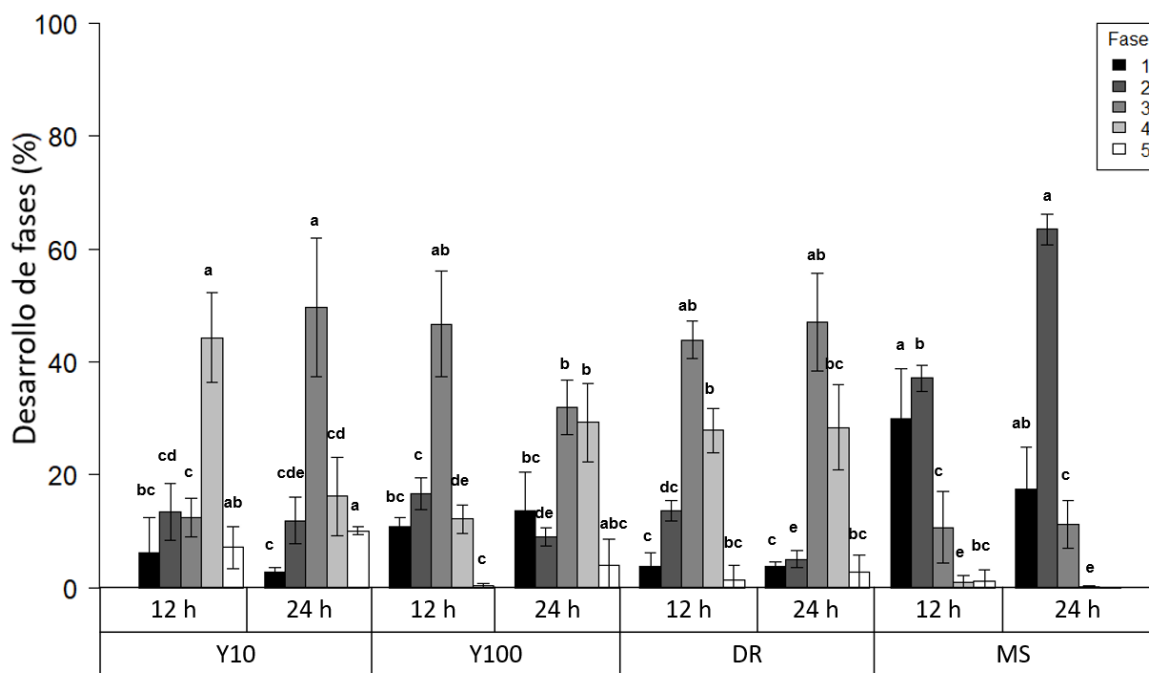


Fig. 4. Efecto de los tratamientos en el desarrollo de las fases de germinación de semillas de *Guarjanthe skinneri*. Porcentaje promedio a las 14 semanas después de la siembra (sds). Los tratamientos con letras iguales no son estadísticamente diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Barra indica desviación estándar.

Oxidación de embriones en las fases de desarrollo

La oxidación de los embriones se observó a partir de las 7 sds, dos semanas después de la máxima expresión de desarrollo de la Fase 2 (imbibición). A las 14 sds, el acumulado de los porcentajes de oxidación sobresalen en las Fases 2 y 3 (Fig. 5). De acuerdo con el análisis estadístico, hubo un efecto significativo del medio ($p \leq 0.05$), donde los medios MS y Y100 presentaron los porcentajes de oxidación más altos en la Fase 2, lo que implicó que la cantidad de semillas que pasaron a la Fase 3 disminuyó al no continuar con la sucesión de embriones, ya que fueron afectados por la oxidación.

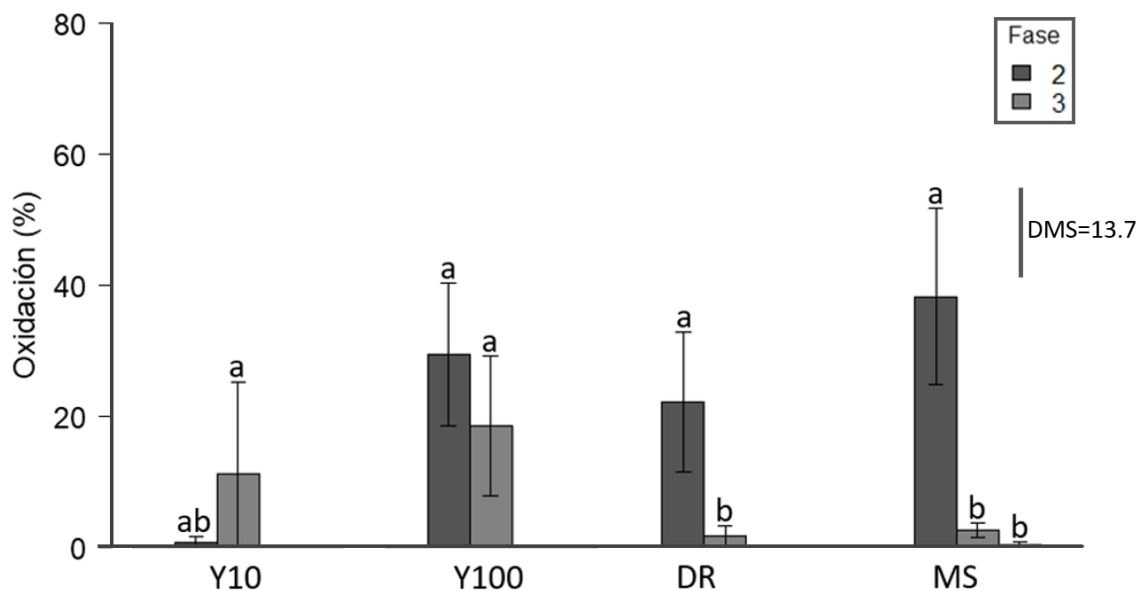


Fig. 5. Efecto de los medios de cultivo en la oxidación de los embriones en las fases 2 y 3 de pregerminación de *Guarjanthe skinneri*. Porcentaje promedio a las 14 sds. Los medios con letras iguales no son estadísticamente diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El factor escotoperiodo no indujo diferencias significativas para la variable oxidación de los embriones, en las diferentes fases de desarrollo evaluadas, por lo que la oxidación se presentó tanto en los embriones sin luz como en los que permanecieron en oscuridad (Fig.6).

Efecto del escotoperiodo sobre las fases de desarrollo

Se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones de escotoperiodo en la Fase 3 de desarrollo de los embriones (Tukey $P \leq 0.05$); en dicho caso, la condición de 24 h de escotoperiodo propició mayor porcentaje de desarrollo de embriones (35%) que la condición de 12 h (28%). Sin embargo, en el resto de las fases no se presentaron diferencias significativas entre ambas condiciones de luz.

Los embriones expuestos a escotoperiodo de 12 h (Y10/12h, Y100/12h, DR/12h y MS/12h) adquirieron un cambio en su coloración de blanco a verde hialino (transparente), a partir de la tercera semana. El tratamiento Y10/12h generó un color verde tenue en los embriones, en comparación con Y100/12h y DR/12h donde se observó promovieron un color verde más intenso. Los embriones de los tratamientos con escotoperiodo de 24 h (Y10/24h, Y100/24h, DR/24h y MS/24h) mantuvieron un color blanquecino que no fue impedimento para continuar el proceso de germinación, aunque en la Fase 5 se observó etiolación de los primordios foliares (Fig. 6).

Efecto del medio de cultivo y escotoperiodo en el tamaño del embrión o protocormo

De acuerdo con el promedio general de la longitud y ancho de los embriones, en cada una de las fases, estas medidas fueron aumentando; por lo que en la Fase 1, los embriones elípticos presentaron una longitud de 0.24 mm (± 0.02) y ancho de 0.1 mm (± 0.02), y a partir del contacto con el medio de cultivo los embriones incrementaron el tamaño (Cuadro 2). La correlación indicó que la Fase 2 y longitud del embrión estuvieron ligeramente correlacionadas. La Fase 2, se caracterizó por el incremento del ancho de los embriones hasta expandir la testa en forma de red sin romperla, con una forma ligeramente esférica; en este caso los tratamientos Y100/12h y Y100/24h promovieron los

embriones con mayor tamaño entre las 6 y 9 sds con un el máximo entre 0.25 a 0.30 mm x 0.18 a 25 mm, de longitud y ancho respectivamente. A medida que el embrión continuó aumentando de tamaño, ocasionó la ruptura de la testa (Fase 3) y en este momento el embrión fue llamado protocormo; para esta fase entre las 9 y 14 sds, Y10/12h promovió el mayor tamaño con medidas que oscilaban entre 0.26 a 0.56 x 0.21 a 0.52 mm de longitud y ancho, respectivamente (Fig.6). Entre las 10 y 14 sds, en uno de los polos longitudinales inició la formación del meristemo (Fase 4), donde el Y10/12h indujo el mayor tamaño de protocormos en esta fase, con medidas entre 0.46 a 0.79 mm x 0.45 a 1.03 mm. Conforme continua el crecimiento del protocormo (Fase 5), se desarrolla el primordio foliar, en esta fase las medidas observadas hasta la 14 sds oscilaron entre 2.2 a 2.84 mm x 0.7 a 1.35 mm de longitud y ancho, respectivamente.

Cuadro 2. Valores promedio de tamaño (longitud y ancho en milímetros) de los embriones o protocormos de *Guarianthe skinneri* en cada fase de desarrollo, observados durante la semana de mayor respuesta, por 14 semanas de evaluación.

Tratamiento	Fase de desarrollo									
	Pregerminación						Germinación			
	Fase 1		Fase 2		Fase 3		Fase 4		Fase 5	
	Semilla	Tamaño longitud x ancho (± DE)	Imbibición	Tamaño longitud x ancho (± DE)	Ruptura de testa	Tamaño longitud x ancho (± DE)	Protocormo ápice	Tamaño longitud x ancho (± DE)	PPF [†] y rizoides	Tamaño longitud x ancho (± DE)
sds ^{††}		Máxima respuesta sds		Máxima respuesta sds		Máxima respuesta sds		Respuesta sds		
Y10-12 h	0	0.24 (± 0.02) x 0.1 (± 0.02)	7	0.26 (± 0.02) x 0.19 (± 0.02)	10	0.56 (± 0.03) x 0.52 (± 0.03)	12	0.79 (± 0.21) x 1.03 (± 0.18)	ND	2.84 (± 0.6) x 1.35 (± 0.33)
Y10-24 h	0	0.24 (± 0.02) x 0.1 (± 0.02)	8	0.25 (± 0.02) x 0.19 (± 0.02)	12	0.27 (± 0.05) x 0.21 (± 0.02)	14	0.58 (± 0.01) x 0.90 (± 0.40)	ND	2.76 (± 1.1) x 1.17 (± 0.16)
Y100-12 h	0	0.24 (± 0.02) x 0.1 (± 0.02)	7	0.30 (± 0.04) x 0.21 (± 0.01)	9	0.32 (± 0.02) x 0.29 (± 0.01)	14	0.46 (± 0.1) x 0.45 (± 0.05)	ND	2.3 (± 0.5) x 0.9 (± 0.22)
Y100-24 h	0	0.24 (± 0.02) x 0.1 (± 0.02)	6	0.29 (± 0.01) x 0.22 (± 0.01)	14	0.35 (± 0.03) x 0.29 (± 0.04)	14	0.46 (± 0.05) x 0.48 (± 0.05)	ND	2.6 (± 0.3) x 0.9 (± 0.47)
DR-12 h	0	0.24 (± 0.02) x 0.1 (± 0.02)	6	0.28 (± 0.04) x 0.25 (± 0.03)	12	0.41 (± 0.03) x 0.39 (± 0.02)	13	0.54 (± 0.05) x 0.59 (± 0.08)	ND	2.5 (± 0.5) x 0.9 (± 0.1)
DR-24 h	0	0.24 (± 0.02) x 0.1 (± 0.02)	6	0.26 (± 0.03) x 0.18 (± 0.03)	12	0.45 (± 0.04) x 0.43 (± 0.03)	14	0.65 (± 0.07) x 0.67 (± 0.20)	ND	2.4 (± 0.4) x 0.85 (± 0.2)
MS-12 h	0	0.24 (± 0.02) x 0.1 (± 0.02)	9	0.29 (± 0.03) x 0.19 (± 0.02)	11	0.31 (± 0.03) x 0.30 (± 0.03)	10	0.54 (± 0.1) x 0.47 (± 0.03)	ND	2.2 (± 0.4) x 0.7 (± 0.2)
MS-24 h	0	0.24 (± 0.02) x 0.1 (± 0.02)	6	0.28 (± 0.01) x 0.19 (± 0.02)	11	0.36 (± 0.01) x 0.32 (± 0.03)	10	0.56 (± 0.1) x 0.49 (± 0.03)	ND	ND

†PPF=Protocormos con primordios foliares. ††sds=Semanas después de la siembra. ND= No determinado.

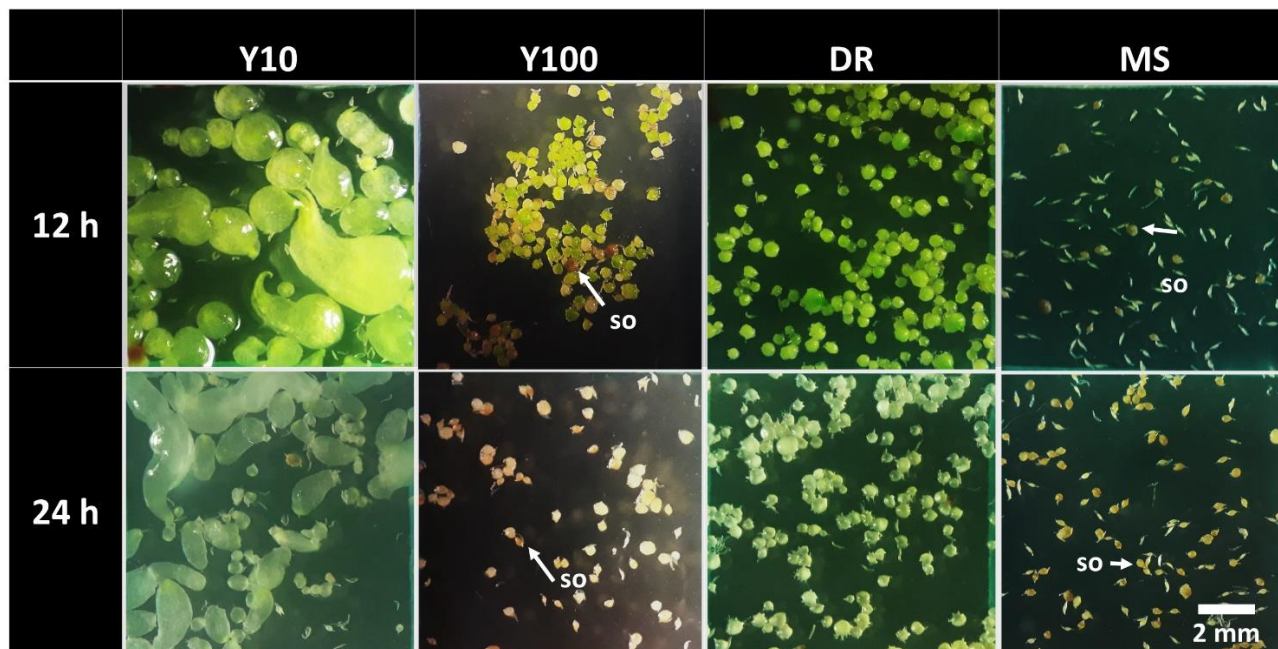


Fig. 6. Fases de desarrollo de *Guarianthe skinneri* observadas a las 14 sds en respuesta a los medios de cultivo en combinación con el escotoperiodo. SO = semillas oxidadas. Micrografías con 4X de aumento. Cada micrografía corresponde al área de evaluación de 1 cm².

Aclimatación de plántulas

El porcentaje de sobrevivencia en la aclimatación de plántulas de *G. skinneri* en promedio fue 80% a los 85 días a partir del trasplante. A los 60 días después del trasplante se obtuvo 20% de mortandad, causado por la herbivoría ocasionada por moluscos y larvas de un insecto no identificado.

Las plántulas generaron un promedio de dos hojas y cuatro raíces durante el periodo de aclimatización. Se observó engrosamiento en las hojas nuevas, y las raíces incrementaron su longitud de 2 a 3 cm.

DISCUSIÓN

Este estudio proporciona información de las fases de germinación asimbiótica *in vitro*, en las etapas de pregerminación y germinación de semillas de *Guarianthe skinneri*, en función de su respuesta a cuatro medios de cultivo, Yasuda al 10% y 100%, Dalla Rosa y MS, y dos condiciones de escotoperiodo (12 y 24 h).

El 80.3% de viabilidad de las semillas fue confirmado por los tratamientos con los mayores porcentajes de hinchamiento e imbibición de la Fase 2, Y10/24h, DR/12h y DR/24h (86, 84 y 81%, respectivamente). Por lo que se consideró que este proceso pregerminativo es una excelente aproximación de la viabilidad observada con el tetrazolio, toda vez que durante la imbibición los embriones absorben agua, lo que provoca que las células se expandan e inicien las primeras señalizaciones de los procesos de respiración celular y metabolismo energético (Valadares *et al.*, 2014). No obstante, factores como el medio de cultivo, escotoperiodo y diversidad genética de las semillas podrían contribuir a la variabilidad en la germinación posterior y en algunos casos a un aumento o disminución de esta. Al respecto Hosomi *et al.* (2011) y Salazar & Osorio, (2022), consignan que en *Cattleya* spp., es posible observar niveles de germinación inferiores al porcentaje de viabilidad indicado por tetrazolio, por causas

desconocidas, por lo que la aplicación de pretratamientos o la inclusión de aditamentos orgánicos en los medios de cultivo, podrían mejorar las tasas de germinación de las semillas.

Germinación de las semillas de *G. skinneri*

En este estudio, los medios de cultivo en orden del más al menos completo en el contenido de nutrientes fue MS, después Yasuda al 100 %, Dalla Rosa y Yasuda 10%. Se logró comprobar que los medios Yasuda, a ambas concentraciones (10 y 100%) adicionados con BAP, promovieron las fases de desarrollo durante la pregerminación y germinación, respectivamente. De acuerdo con diversos estudios, el BAP, presente en ambos medios de cultivo (a 10 y 100% de la formulación original), interviene en la división celular, y su efecto puede estar asociado con el estado de diferenciación celular durante el proceso de germinación. Así mismo, Quiroz *et al.* (2017) reportaron un avance en la germinación de semillas de la orquídea terrestre *Chloreaea crispa* Lindl. con la formación de protocormos, con una concentración de 0.1 mg L⁻¹ de BAP y en condiciones de oscuridad. En el medio Yasuda al 10%, se obtuvieron todas las fases en menos tiempo, a las 10 sds, comparado con los otros medios, a pesar de que contaba con una concentración mínima de sales. Aunque no hay antecedentes de estos medios usados en *G. skinneri*, datos similares han sido presentados en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andres (Orchidaceae), donde Torres-González *et al.* (2011) obtuvieron el mayor porcentaje de germinación a las 13 sds en el mismo medio Yasuda 10 %. Existen evidencias que comprueban que los medios en concentraciones menores de la fórmula original promueven el arranque de germinación de semillas de orquídeas (Chen *et al.*, 2015), tal y como se comprueba en el presente estudio. Esto coincide con el hecho de que, en condiciones naturales en las copas de los árboles, las epifitas disponen de pocos recursos nutrimentales para la germinación y desarrollo (Damon *et al.*, 2014), y estos serían suministrados indirectamente mediante los HEFM.

El medio DR adicionado con agua de coco, promovió de igual forma las cinco fases de germinación de *G. skinneri*, incluso a las 14 sds promovió en mayor medida la Fase 4. De acuerdo con lo reportado por (Damon *et al.*, 2014), *G. aurantiaca*, especie cercana a *G. skinneri* obtuvo el 92.12% de germinación a los 160 días en este mismo medio. Dado que este medio contiene agua de coco, ha sido documentado que uno de sus componentes es la citoquinina importante para la germinación de semillas (Ma *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015). Las citoquininas exógenas pueden ayudar en la movilización de lípidos dentro de los embriones de orquídeas (Kauth *et al.*, 2008), y por ende promover la germinación de semillas mediante la eficiente utilización de los lípidos que usualmente son escasos en el medio natural.

La baja tasa de germinación de las semillas de *G. skinneri* en el medio MS 100%, estuvo asociada a la alta concentración de sales inorgánicas del medio. Resultados similares han sido reportados para esta misma especie por García *et al.* (1993) quienes obtuvieron el 3.5% de germinación a los 75 días después de la siembra y con un desarrollo lento. Así mismo, Andrade-Rodríguez *et al.* (2015) obtuvieron 31% de germinación de semillas del híbrido *Brassolaeliacattleya* (Orchidaceae) en MS al 100%, quienes argumentaron un efecto osmótico negativo (-0.3349 Mpa) por su alta cantidad de sales, lo cual impidió la absorción eficiente de los macro y micronutrientes del medio. Es por ello, que se sugiere realizar pruebas previas de susceptibilidad al medio de cultivo, en la fase de imbibición y desarrollo de protocormo, para evitar el desperdicio de semillas y posibles afectaciones en las fases posteriores. El medio MS en este estudio no fue favorable para la etapa de germinación; sin embargo, ha resultado ser idóneo para varias especies, demostrado en diversos estudios donde han probado diferentes concentraciones o han añadido otros componentes (Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Mercado & Contreras, 2017; Salazar & Osorio, 2022; Utami & Hariyanto, 2019).

Existen paradigmas ampliamente aceptados con respecto a la relación entre la germinación de semillas de orquídeas y el escotoperiodo, uno de ellos es que las orquídeas epifitas requieren luz y las especies terrestres oscuridad para germinar (Kauth *et al.*, 2008). Los requerimientos de escotoperiodo pueden ser particulares para inducir o inhibir las fases de la germinación de

orquídeas epífitas (Castillo-Pérez *et al.*, 2021; Lopéz *et al.*, 1994) y terrestres (Chen *et al.*, 2015). De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio, la condición de escotoperiodo no afectó el proceso de desarrollo de las fases de germinación. Las semillas que contaron con 12 h de escotoperiodo formaban embriones y luego protocormos clorofílicos, debido a incidencia de la luminosidad recibido a las células de los embriones desde la Fase 2. Las semillas expuestas a 24 h de escotoperiodo fueron aclorofílicas; sin embargo, esto no fue impedimento para continuar el desarrollo, ya que la fuente de nutrimentos provenía del medio de cultivo. Fue notable, que Zeng *et al.* (2012), consignan que la luz continua se asoció con el cambio de coloración de blanquecino a marrón (oxidación) y la muerte prematura de los protocormos de *Paphiopedilum wardii* Summerhayes (Orchidaceae) por ello propusieron que las etapas iniciales permanezcan bajo oscuridad durante las primeras seis semanas y posteriormente sean llevadas a la luz. En el presente estudio, los resultados indican algo diferente, que la oxidación de los embriones estuvo relacionada con el medio de cultivo en las fases 2 y 3 y no con el escotoperiodo.

Valdría la pena reflexionar que, en condiciones naturales, las semillas de orquídeas epífitas aterrizan en diferentes superficies, con o sin disponibilidad de luz. Al ser tan pequeñas es posible que entren en pequeñas grietas en las cortezas de los árboles y podrían ser cubiertas por materia orgánica que impida la recepción de la luz, pero a su vez podría contribuir a evitar la desecación y lograr una estabilidad térmica adecuada durante las etapas iniciales de germinación (Rasmussen *et al.*, 2015). Así podríamos dejar atrás el paradigma del requerimiento de luz de epífitas e impulsar la evaluación del efecto de la oscuridad, en conjunto con otras condiciones ambientales. En estos casos, los protocormos que continuaron con el desarrollo de primordios foliares desarrollados en oscuridad, posiblemente contaban con el almacenamiento de energía obtenida del medio de cultivo; no obstante, requieren de las horas con luz para poder aprovechar la clorofila para fotosintetizar y así optimizar el crecimiento y desarrollo en las siguientes etapas.

La pregerminación y germinación de las semillas de *G. skinneri* fueron asincrónicas y las respuestas iniciales ocurrieron con diferentes frecuencias en cada fase y más rápidas en Y10/12h, mientras que en DR/12h, DR/24h y Y100/12h los cambios fueron tardíos entre fases. Aún no se ha profundizado en las condiciones que genera la asincronía en la germinación de semillas de orquídeas. Koene *et al.* (2020) reportaron la germinación asincrónica de *Acianthera prolifera* (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase (Orchidaceae), y sugirieron probar con otras formulaciones del medio de cultivo utilizado y realizar subcultivos en las etapas tempranas para evitar el agotamiento de los componentes del medio antes de completar la germinación de todas las semillas. La germinación asincrónica se ha presentado en otras orquídeas, documentado en *Acianthera ochreatea* (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase, *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl. y *L. speciosa* (Kunth) Schltr. (Aguilar-Morales & López-Escamilla, 2013; Hernández-Muñoz *et al.*, 2017). El fenómeno de asincronía, en conjunto con la posibilidad de germinar tanto en condiciones de luz u oscuridad, seguramente ofrece mayor flexibilidad de respuesta a las condiciones naturales cambiantes, pero requiere de estudios genéticos, fisiológicos y bioquímicos para poder entender y aprovechar estos atributos.

Aclimatación

En este estudio se logró el 80% de sobrevivencia de plántulas hasta los 85 días después del trasplante, y sin evidencias de enfermedades. Esto es una cifra importante, e indica haber evitado la causa principal de mortandad ocasionado por enfermedades fúngicas y bacterianas durante la aclimatación temprana (Teixeira da Silva *et al.*, 2017). Sin embargo, la herbivoría fue un evento externo que propició la disminución de la vitroplantulas en este estudio, y en condiciones naturales, las plantas se enfrentan a este suceso como parte de las inevitables interacciones ecológicas. Fue posible observar que algunas plantas ya defoliadas por herbivoría luego generaron un brote, lo que indica que el meristemo no fue dañado. Sería importante evaluar la capacidad de vitroplantulas aclimatadas de superar tasas leves de herbivoría una vez que se lleven a establecerse en los sitios de conservación.

CONCLUSIONES

La germinación asimbiótica *in vitro* se realizó con éxito para *Guarianthe skinneri* y se logró determinar el tiempo de desarrollo en las diferentes fases de pregerminación y germinación, información útil para conocer el tiempo y la producción de una fase de acuerdo con el objetivo de interés. Además, se comprobó que el factor de asincronía es parte del proceso de germinación de semillas de *G. skinneri* y se determinó que los medios Yasuda 10% + 0.112 mg/L BAP promovió la celeridad de las fases. Para *G. skinneri*, las condiciones de escotoperiodo no afectaron el proceso de germinación. Con la información generada es posible diseñar el proceso completo de propagación por semillas completo hasta contar con plántulas listas y aptas para su establecimiento en el medio natural, y así, optimizar el aprovechamiento de las semillas para contribuir en la conservación de la diversidad genética de *G. skinneri*.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), American Orchid Society (AOS), el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CERI-INIFAP), y por la beca de doctorado del CONACYT no. 736042 otorgada a FHR. Se agradece el apoyo de Diana Claudia Molina Ozuna por la ilustración de la Figura 2.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Morales, M., & López-Escamilla, A. (2013). Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*. *Estudios Científicos en el Estado de Hidalgo y Zonas Aledañas. Vol. II. G. Pulido F. y S. Monks (eds.). Zea Books, University of Nebraska. Lincoln, Nebraska, USA., 1(1)*, 18-24.
<http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1004&context=hidalgo>
- Andrade-Rodríguez, M., Vargas-Araujo, J., Villegas-Torres, O., López-Martínez, V., Guillen-Sánchez I., Alia-Tejacal, D., & Andrade-Rodríguez, M. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Cattleya (Brassolaeliocattleya) in vitro*. *Interciencia, 40(8)*, 549-553.
- Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist, 145*, 367-421.
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C., & Salgado-Garciglia, R. (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 99(3)*, 335-343. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>
- Cassells, A. C., & Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Dans *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64, 145-157.
- Castillo-Pérez, L. J., Martínez-Soto, D., Fortanelli-Martínez, J., & Carranza-Álvarez, C. (2021). Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 146(2)*, 249-257. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02064-9>
- Chen, Y., Goodale, U. M., Fan, X.-L., & Gao, J.-Y. (2015). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation, 3*, 367-378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.01.002>

- Coello, C., Miceli, C., Orantes, C., Dendooven, L., & Gutiérrez, A. (2010). Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins. *Gayana Bot*, 67(1), 19-26.
- Cruz-Higareda, J. B., Luna-Rosales, B. S., & Barba-Álvarez, A. (2015). A novel seed baiting technique for the epiphytic orchid *Rhynchostele cervantesii*, a means to acquire mycorrhizal fungi from protocorms. *Lankesteriana*, 15(1), 67-76. <https://doi.org/10.15517/lank.v15i1.18525>
- Damon, A. (2013). Conservation status and strategies for the preservation of orchids in the Soconusco Region of southeast Mexico. *Lankesteriana*, 13(1-2), 27-31. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11530>
- Damon, A. (2017). Estrategia para el rescate, conservación y aprovechamiento sustentable de las orquídeas (Orchidaceae) en el sureste de México. *Agroproductividad*, 10(6), 25-30.
- Damon, A., Aguilar-Guerrero, E., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2014). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 195-203.
- David, D., Gansua J. A., & Abdullah, J. O. (2008). Effect of NAA and BAP on protocorm proliferation of Borneo Scented Orchid. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 16(3), 221-224. <https://www.researchgate.net/publication/259920952>
- Emeterio-Lara, A., García-Franco, J. G., Hernández-Apolinar, M., Mora-Herrera, M. E., Toledo-Hernández, V. H., Valencia-Díaz, S., & Flores-Palacios, A. (2018). Endogamy costs and reproductive biology of *Laelia autumnalis*, an endemic orchid of Mexico. *Plant Ecology*, 219(12), 1423-1434. <https://doi.org/10.1007/s11258-018-0891-6>
- Fang, S. C., Chen, J. C., & Wei, M. J. (2016). Protocorms and protocorm-like bodies are molecularly distinct from zygotic embryonic tissues in *Phalaenopsis aphrodite*. *Plant Physiology*, 171(4), 2682-2700. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00841>
- García, J. A., Valerín, A. T., & Salazar, R. (1993). Utilización de tres medios orgánicos para la germinación *in vitro* de semillas de guaria morada, *Cattleya skinneri* (Bateman). *Uniciencia*, 79-83.
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M., López, P., De la Cruz-Torres, E., Martínez-Palacios, A., Fernández-Pavía, S., & Chávez-Bárceñas, A. (2017). Estimulación de la germinación y desarrollo *in vitro* de *Laelia autumnalis* con rayos gamma. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 40(3), 217-283.
- Hosomi, S. T., Santos, R. B., Custodio, C. C., Seaton, P. T., Marks, T. R., & Machado-Neto, N. B. (2011). Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*, 39(1), 178-189. <https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.1.15>
- Johnson, T. R., & Kane, M. E. (2007). Asymbiotic germination of ornamental *Vanda*: *In vitro* germination and development of three hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(3), 251-261. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9291-7>
- Kauth, P., Dutra, D., Johnson, T., Stewart, S., Kane, M., & Vendrame, W. (2008). Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. *Floriculture, Ornamental and plant biotechnology*, 375-391. <https://www.researchgate.net/publication/257385365>
- Koene, F. M., Amano, É., Smidt, EdC., & Ribas, L. L. F. (2020). Asymbiotic germination and morphological studies of seeds of Atlantic Rainforest micro-orchids (Pleurothallidinae). *PLoS ONE*, 15(12), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243297>
- López, V. A., Mejía, M. J., & Sosa-Moss, C. (1994). Cultivo de tejidos de orquídeas: *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* y *Stanhopea*. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 1, 58-62.
- López-Chávez, M. Y., Guillén-Navarro, K., Bertolini, V., Encarnación, S., Hernández-Ortiz, M., Sánchez-Moreno, I., & Damon, A. (2016). Proteomic and morphometric study of the *in vitro* interaction between *Oncidium sphacelatum* Lindl. (Orchidaceae) and *Thanatephorus* sp. RG26 (Ceratosidiaceae). *Mycorrhiza*, 26(5), 353-365. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0676-x>

- Ma, Z., Ge, L., Lee, A. S. Y., Yong, J. W. H., Tan, S. N., & Ong, E. S. (2008). Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 610(2), 274-281.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.045>
- Maldonado, G. P., Yarzabal, L. A., Cevallos-Cevallos, J. M., Chica, E. J., & Peña, D. F. (2020). Root endophytic fungi promote *in vitro* seed germination in *Pleurothallis coriacardia* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 20(1), 107-122.
<https://doi.org/10.15517/LANK.V20I1.41472>
- Mercado, S. A. S., & Contreras, N. A. V. (2017). Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb.f. (Orchidaceae). *Acta Agronomica*, 66(4), 544-548. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n4.63597>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures. *Plant Physiology*, 15(4), 31.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.231753>
- Ortiz, C. S., González, C. G., López, G. P., & Donjuan, L. I. (2013). Efecto de sustratos, soluciones nutritivas y tamaño de vitroplanta en aclimatación de *Candelaria* (*Guarianthe skinneri*). *Memorias de Congreso Nacional y Primer Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A.C.*
- Quiroz, K., Saavedra, J., Vogel, H., Verdugo, G., Caligari, P. D. S., & García-González, R. (2017). *In vitro* asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). *Applications in Plant Sciences*, 5(8), 1600142. <https://doi.org/10.3732/apps.1600142>
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391-402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>
- Salazar, S. A., & Osorio, Y. M. (2022). Implementation of organic components to the culture medium to improve the *in vitro* propagation of *Cattleya warscewiczii* and *Cattleya gaskelliana*. *South African Journal of Botany*, 148, 352-359.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.002>
- Salazar-Mercado, S. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 61(1), 69-78.
- Solano-Gómez, R., Damon, A., Cruz-Lustre, G., Jiménez-Bautista, L., Avendaño-Vázquez, S., Bertolini, V., Rivera-García, R., & Cruz-García, G. (2016). Diversity and distribution of the orchids of the Tacaná-Boquerón region, Chiapas, Mexico. *Botanical Sciences*, 94(3), 625-656. <https://doi.org/10.17129/botsci.589>
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 147-158.
<https://doi.org/10.1007/s11240-006-9098-y>
- Teixeira da Silva, J. A., Hossain, M. M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Zeng, S. (2017). Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 110-124. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>
- Torres-González, M. J., Aguirre-Medina, J. F., & Iracheta-Donjuan, L. (2011). Germinación de semilla y obtención de plántulas de *Vanilla planifolia* Andrews en condiciones *in vitro*. *AGROProductividad*, 4(2), 3-8.
- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2019). *In vitro* seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm. *Scientifica*.
<https://doi.org/10.1155/2019/8105138>
- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2020). Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. *International Journal of Agronomy*. <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>

Recibido:
26/octubre/2022

Aceptado:
1/junio/2023

- Valadares, R. B. S., Perotto, S., Santos, E. C., & Lambais, M. R. (2014). Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination. *Mycorrhiza*, 24(5), 349-360. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0547-2>
- Vasudevan, R., & Van Staden, J. (2010). *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 496-504. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.010>
- 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*, 104(2), 147-155. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9810-9>
- Yasuda, T., Fujii, Y., & Yamaguchi, T. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*, 26(3), 595-597. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076946>
- Yeung, E. C. (2017). A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*, 58(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4>
- Zeng, S., Wu, K., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N., & Duan, J. (2012). Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*, 138, 198-209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.026>
- Zhang, Y. Y., Wu, K. L., Zhang, J. X., Deng, R. F., Duan, J., Teixeira Da Silva, J. A., Huang, W. C., & Zeng, S. J. (2015). Embryo development in association with asymbiotic seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16356>