

Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo de plántulas *in vitro* de *Trichocentrum nudum* (Orchidaceae).

Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Trichocentrum nudum* (Orchidaceae).

¹Daniel Hernández*; ²Luis Ortega, PhD; ¹Javier Beltrán, PhD; ¹Luisa Martínez.

¹Programa de Biología, Departamento de Biología y Química, Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre, Sincelejo-Sucre, Colombia.

²Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

dhernandezrosales@hotmail.com

Resumen

Neurospora crassa es un hongo filamentoso con gran potencial para aplicaciones biotecnológicas debido a su rápido crecimiento y fácil cultivo. En este estudio, se evaluó la capacidad de producción de la enzima invertasa a partir de este microorganismo, mediante fermentación en medio sólido (FMS) y agrolita como soporte inerte. Se evaluaron factores de crecimiento y producción enzimática relevantes como el contenido de sustrato, niveles de humedad, temperaturas de incubación y nivel de inóculo. La producción de invertasa se incrementó al incrementar la concentración de sustrato, alcanzando una actividad máxima de 10.69 ± 0.01 U/mL, empleando 90 g/L de sacarosa. De igual manera, la actividad enzimática se vio favorecida al emplear 65 % de humedad inicial en la FMS (44.56 ± 1.76 U/mL), una temperatura de 35 °C (46 ± 1.63 U/mL) y un nivel de inóculo de 1×10^8 esporas/mL (41.38 ± 1.00 U/mL). Además, se observó que la concentración de proteína varió en función de estas condiciones, con un máximo de 0.08 ± 0.01 mg/mL a 65 % de humedad inicial. Estos resultados muestran que *N. crassa* es un buen modelo de estudio para el diseño de estrategias que permitan la elección de las condiciones de cultivo en FMS, para mejorar la producción de enzimas industrialmente importantes, como es el caso de la invertasa.

Palabras Claves: Biotecnología, cultivos *in vitro*, orquídea, semillas, vitroplantas

Abstract

Trichocentrum nudum, belonging to the 'dancing ladies' group, is an orchid native to America, found in countries such as Colombia, Venezuela, and Panama. The objective of this study was to establish a viable germination protocol and evaluate the formation of *in vitro* seedlings of the *Trichocentrum nudum* orchid. To this end, 20 mature capsules of this species were used, collected in the department of Sucre, and the seeds were subsequently cultivated in three treatments: T1 (100% MS salts), T2 (50% MS salts) and T3 (25% MS salts). With regard to seed germination, the highest germination percentage and the highest number of shoots were observed in T1. For seedling formation, T2 showed the best results, with the formation of elongated stems and the presence of roots. In conclusion, the results of the present study allows to establish a protocol for seed germination and *in vitro* seedling production of this orchid, which would be a strategic component for its propagation and conservation.

Key Words: Biotechnology, *in vitro* culture, orchid, seeds, vitroplants

Introducción

Trichocentrum nudum, también conocida con otros sinónimos, tales como *Cohniella nuda* y *Oncidium nudum*, es una planta epífita perteneciente a la familia Orchidaceae, nativa de América y distribuida en países tales como Venezuela, Colombia (Hernández-Rosales y Ortega-Macareno, 2025) y Panamá, y se encuentra incluida dentro del grupo comúnmente conocido como “orquídeas

damas danzantes”. A diferencia de otras especies del género, *Trichocentrum nudum* presenta inflorescencias que son siempre más cortas que las hojas (esto puede ser relativo) y muy densas pero, lo que realmente diferencia a esta especie es su flor: el diámetro de la flor no es mayor a 3,5 cm, y estas van desde pequeñas con el labelo de unos 7 mm de longitud a más grandes con el labelo de unos 13 mm de longitud (Carnevali et al., 2010) (Figura 1).



Figura 1. Planta completa y flor de la especie *Trichocentrum nudum*. Autoría propia.

Sin embargo, a pesar de la belleza de sus flores, la diversidad de especies y la extensa distribución de las mismas, con el paso del tiempo se han venido reportando diversos factores bióticos, abióticos y antropogénicos que afectan negativamente a las orquídeas (Carranza et al., 2023); entre los factores bióticos que afectan a la distribución, dispersión de semillas y supervivencia de las orquídeas se encuentra la necesidad de entablar relaciones interespecíficas, ya que se ven sujetas a la disponibilidad de microorganismos (Fernández, 2010), perjudicando las principales interacciones de las orquídeas, como la relación con hongos asociados, que desde el momento de la germinación benefician a las orquídeas, debido a que sus semillas carecen de endospermo, por lo cual, necesitan obligatoriamente un microorganismo que les facilite los nutrientes, agua y demás elementos para que se lleve a cabo la

germinación (Meng et al., 2019). Por otra parte, en la etapa de adultez, las orquídeas pueden recibir ayuda de los hongos, facilitándoles la obtención de nutrientes para su crecimiento, procesos fenológicos (tales como floración y formación de frutos) y ayudando en su resguardo contra microorganismos patógenos (Sathiyadash et al., 2020).

En ese orden de ideas, otros factores, como los abióticos, repercuten de manera trascendental en la conservación de las orquídeas, siendo el cambio climático una de las principales amenazas para las plantas (Seaton et al., 2013; Faleiro et al., 2018), afectando significativamente las poblaciones de orquídeas debido a la poca disponibilidad de nutrientes, humedad, estructura del suelo, pH y afectando las relaciones simbióticas, con hongos y polinizadores. El cambio climático disminuye en mayor medida la disponibilidad

de un hábitat adecuado para las orquídeas, propiciando el aumento de las amenazas existentes como la sequía, incendios y propagación de malezas y demás especies invasoras (Werner y Gradstein, 2008; Seaton et al., 2013).

Finalmente, entre los factores antropogénicos se encuentran la alteración, pérdida y degradación del hábitat, la tala de árboles, y la extracción de orquídeas silvestres para su comercio ilegal (Puris et al., 2023). Las poblaciones de orquídeas silvestres se ven afectadas por las presiones del desarrollo humano, como la conversión de tierras para agricultura o ganadería y la recolección ilegal de plantas de sus hábitats como plantas ornamentales para la comercialización en los mercados nacionales e internacionales (Hinsley et al., 2017).

Ante estas problemáticas, el campo de la biotecnología aporta herramientas y métodos de vital importancia para la conservación de especies, donde resalta el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales como una de las más utilizadas. Esta técnica favorece la multiplicación masiva de plantas en un corto período de tiempo y a costos reducidos (Ancasi-Espejo et al., 2023) a partir de protocolos de establecimiento de explantes que promueven procesos como la organogénesis (Campos et al., 2020; Duarte, 2022). La técnica de cultivos *in vitro* ha sido implementada satisfactoriamente en una gran variedad de especies vegetales, incluyendo orquídeas terrestres, epífitas y litófitas, por medio de la germinación asimbiótica de semillas y la formación de las estructuras conocidas como protocormos (Mamani et al., 2022; Hernández et al., 2023).

Aunque se tiene registro de múltiples estudios sobre germinación *in vitro* de semillas de orquídeas, para *Trichocentrum nudum* aún no han sido descritos sus requerimientos nutricionales y fisiológicos básicos, ni la posible respuesta de las semillas a variaciones en la concentración del medio de cultivo comúnmente implementado para orquídeas. Puesto que las semillas de estas plantas no poseen endospermo (tejido de

reserva propio de todas las semillas), factores como la disponibilidad y la concentración de nutrientes del medio pueden alterar significativamente los procesos de imbibición, la reactivación metabólica, procesos de división celular y el desarrollo inicial del protocormo (Apolo, 2021). De esta manera, aún con cambios simples (como modificaciones en las concentraciones del medio de cultivo) se puede generar información relevante sobre la eficiencia del desarrollo del protocormo, el nivel mínimo o máximo de nutrientes requeridos por las semillas para concretar la germinación, la posible inhibición por exceso de sales y la sensibilidad de la planta a las condiciones osmóticas del medio (Wongsa et al., 2025).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de germinación viable y evaluar la formación de plántulas *in vitro* de la orquídea *Trichocentrum nudum*.

Materiales y Métodos

Ubicación geográfica

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja. Esta se ubica en la ciudad de Sincelejo, cuya posición geográfica en Colombia es 9° 18' de latitud norte y 75° 23' de longitud oeste del meridiano de Greenwich.

Obtención y recolección del material vegetal

Se hizo uso de 20 cápsulas maduras de *Trichocentrum nudum* (Figura 2), las cuales fueron recolectadas en el municipio de Sampues, Sucre, y los puntos de recolección se encuentran representados por las coordenadas: 9,19942 de latitud y -75,34284 de longitud oeste del meridiano de Greenwich. Para la recolección del material vegetal, se desplazó hacia el lugar de ubicación de las mismas, se hizo uso de papel periódico y bolsas ziploc y se transportaron las cápsulas hacia la Universidad de Sucre, en donde se les realizó el respectivo tratamiento de desinfección.



Figura 2. Cápsulas maduras de *Trichocentrum nudum*. Autoría propia.

Desinfección del material vegetal

Las cápsulas se desinfectaron mediante el lavado por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 3 minutos con dos gotas de Tween 20 (Sigma®), posteriormente se realizó dos enjuagues con agua destilada esteril para eliminar el exceso de detergente.

Medios de cultivo

Se realizó un total de 3 tratamientos (T1, T2 y T3), donde cada tratamiento estuvo conformado por 20 réplicas, para un total de 60 medios de cultivo. Los tratamientos estuvieron compuestos por sales MS (1962) al 100% para T1, para T2 sales MS (1962) al 50% y para T3 sales MS (1962) al 25%, y para todos los tratamientos sacarosa al 3%, 0,05 gr de Myo-inositol, 500 μ l de tiamina HCl, Gelrite al 0,2%, y se ajustó el pH a $5,7 \pm 5,8$. Luego se disolvió el Gelrite durante 10 minutos en una plancha de calentamiento y se distribuyó

en frascos de vidrio a razón de 20 ml por frasco. Finalmente, se esterilizó en autoclave durante 20 min a 15 psi y 121° C. Los medios de los diferentes tratamientos se sembraron en condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar horizontal.

Siembra del material vegetal, germinación de las semillas y condiciones del medio

Se cortaron las cápsulas longitudinalmente con la ayuda de un bisturí previamente desinfectado dentro de la cámara de flujo laminar, se extrajo un cúmulo de semillas y se sembró en los diferentes medios de cultivo distribuyéndolas en cinco grupos dentro del frasco con la ayuda de una asa de aro (Figura 3). Posteriormente, se colocaron en un cuarto de incubación a una temperatura de $28 \pm 5^{\circ}$ C, humedad relativa de 65 % y un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.



Figura 3. Siembra de las semillas de *Trichocentrum nudum*.

Evaluación del material vegetal

Se evaluó el desarrollo germinativo de las semillas en cada uno de los medios a las 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días, 30 días, 40 días, 45 días, 50 días, 60 días, 70 días y 90 días. Al mismo tiempo, se evaluarán parámetros cuantitativos y cualitativos, tales como el mejor tratamiento para la germinación, número de semillas germinadas, longitud del vástago, número de raíces, número de brotes y presencia o ausencia de contaminación.

Diseño y análisis estadístico

Esta investigación se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA). A los datos que se obtuvieron se les aplicaron las pruebas de normalidad (ShapiroWilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), tras lo cual, aquellas variables distribuidas de forma normal y homogénea fueron sometidas a un análisis de

varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiples de medias Tukey (α : 0.05), mientras que en caso contrario se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se procesaron en programas tales como Excel, R Project y R Studio para Windows 11 (de Mendiburu, 2012).

Resultados y discusión

Este trabajo encontró que, al transcurrir aproximadamente 50 días después de la siembra de las semillas, fue posible observar inicios de germinación en los medios de cultivo, observándose así la estructura conocida como protocormo globular y los primeros brotes en diferentes réplicas de los distintos tratamientos implementados (Vargas et al., 2023) (Figura 4).

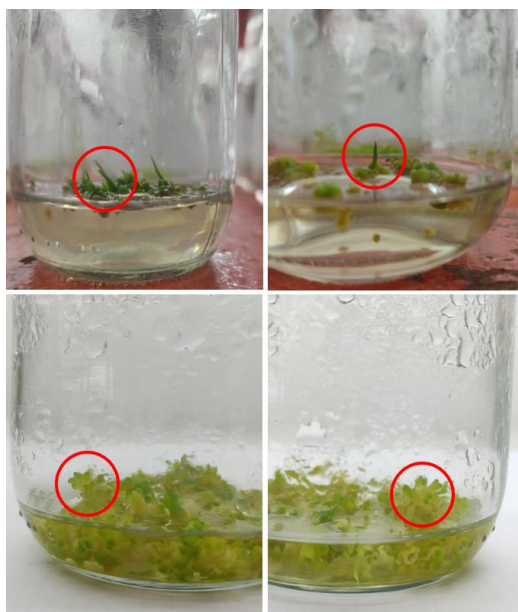


Figura 4. Semillas germinadas *in vitro* y formación de brotes de la orquídea *Trichocentrum nudum*.

Los resultados obtenidos se relacionan con los de Vogel y Macedo (2010), los cuales evaluaron el efecto del ácido indol-3-acético (IAA), el tiazurón (TDZ) y la calidad de luz en la germinación de semillas de *Cyrtopodium glutiniferum*, reportando inicios de germinación a los 50 días después de la siembra de las semillas. De igual manera, Wida et al. (2017) afirman que, en *Dendrobium lasianthera*, la germinación asimbiótica se dio a las seis semanas (42 días), tiempo en el que el embrión mostró crecimiento constante, la testa se rompió y el

embrión emergió. Así mismo, Moreno y Menchaca (2007) evaluaron el efecto de compuestos orgánicos adicionados al medio MS en la germinación de *Stanhopea tigrina* y registraron que, alrededor de los 60 días, se observó la formación de protocormos de 0.5 cm con rizoides y primordios foliares. Sin embargo, se reportan diferencias al hacer la comparación de estos resultados con otras especies del mismo género. Ramos et al. (2020), en un estudio de propagación clonal de *Trichocentrum stramineum*, registraron germinación a los 20 días después de la

siembra de las semillas en medio KC-E, mientras que Flores et al. (2008) registraron para la misma especie el desarrollo de protocormos a los 13 días en medios MS suplementados con peptona, sacarosa, agua de coco y extractos de frutas. De la misma manera, Álvarez (2012) observó en *Trichocentrum pachyphyllum* germinación transcurridos 15 días en medio Peter, y con el medio KM, en el cual la germinación no se dio sino hasta los 60 días.

En ese orden de ideas, el análisis de varianza para el número de semillas germinadas demuestra que hay diferencias significativas entre dicha variable y los tratamientos (p -valor=0.02307, $p < 0.05$) (Figura 5).

NSG VS. TRATAMIENTOS

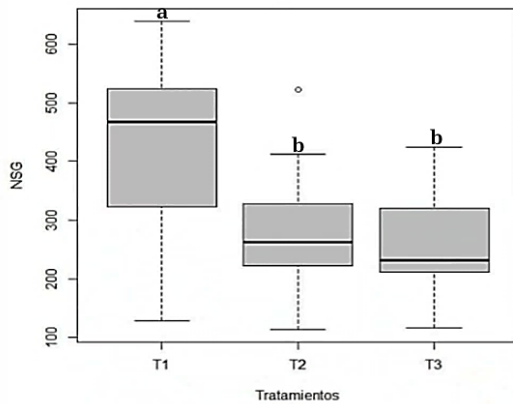


Figura 5. Número de semillas germinadas con respecto a los tratamientos.

El análisis de varianza para el número de raíces demuestra que hay diferencias significativas entre esta variable y los tratamientos (p -valor=0.01084, $p < 0.05$) (Figura 6).

NR VS. TRATAMIENTOS

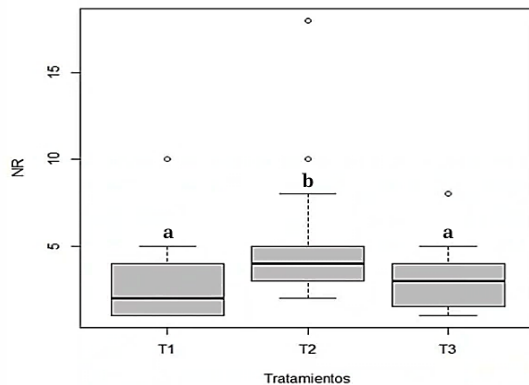


Figura 6. Número de raíces con respecto a los tratamientos.

El análisis de varianza para el número de brotes demuestra que hay diferencias significativas entre la variable en cuestión y los tratamientos (p -valor=0.02215, $p < 0.05$) (Figura 7).

NB VS. TRATAMIENTOS

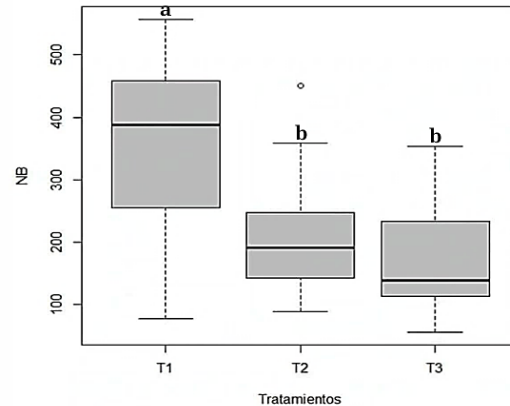


Figura 7. Número de brotes con respecto a los tratamientos.

El análisis de varianza para la longitud del vástago demuestra que no hay diferencias significativas entre dicha variable y los tratamientos (p -valor=0.286, $p > 0.05$) (Figura 8).

LV VS. TRATAMIENTOS

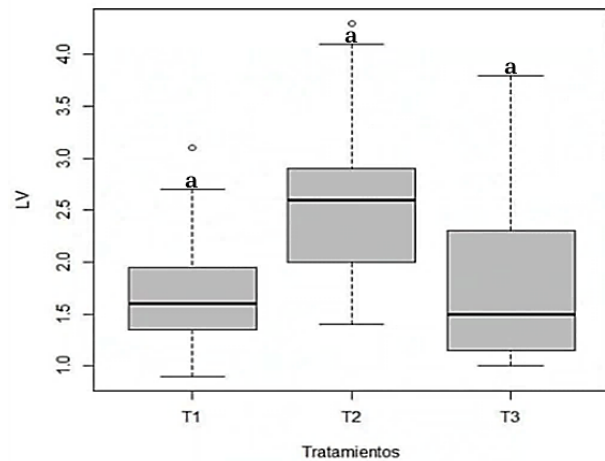


Figura 8. Longitud del vástago con respecto a los tratamientos.

Por otro lado, después de aproximadamente 120 días después de la siembra de las semillas, es posible evidenciar diferencias significativas principalmente en cuanto al crecimiento y elongación de las vitroplantas y la formación de raíces (Figura 9).

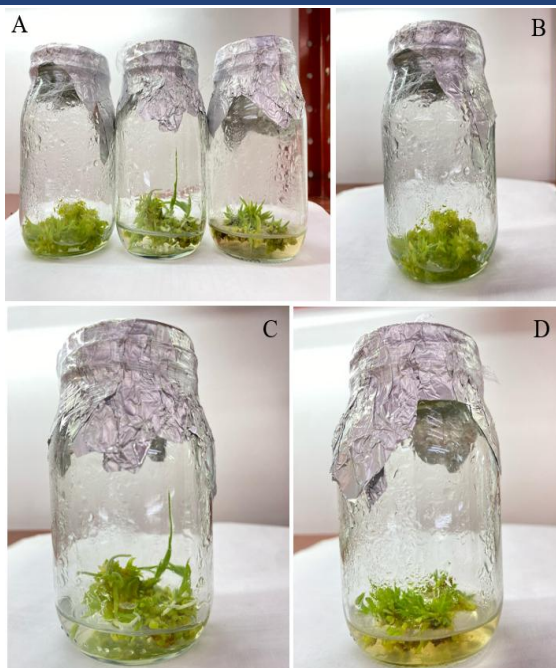


Figura 9. A. Vitroplantas después de 120 días post-siembra. B. Vitroplantas en T1. C. Vitroplantas en T2. D. Vitroplantas en T3.

Los resultados obtenidos para *Trichocentrum nudum* permiten detallar que, hasta el último de los controles, el porcentaje de germinación fue del 92% en T1, 52% en T2 y en T3, el porcentaje de germinación fue del 48%. Estos hallazgos confirman que la germinación de semillas, la formación de brotes, el desarrollo radicular y la elongación del vástago se da más eficientemente en los tratamientos T1 (sales MS al 100%) y T2 (sales MS al 50%), mientras que en T3 (sales MS al 25%) se pudo observar deficiencias claras en todos los parámetros. Estas observaciones se comparan con lo registrado por Romero et al. (2007), los cuales afirman que tanto el 100% como el 50% de sales minerales propicia un mayor desarrollo de plántulas en orquídeas, hallazgos que se asemejan considerablemente con los del presente trabajo. Del mismo modo, Rangel et al. (2018), en su trabajo con *Anthurium schlechtendalii* (anturio), registraron que ambas concentraciones de sales (50% y 100%) promueven la germinación, aunque el mayor crecimiento se alcanzó con el 100% de sales MS suplementadas con sacarosa. Sin embargo, para la especie de *T. nudum*, los resultados afirman que tanto la concentración completa como la reducida a la mitad son favorables, dependiendo de parámetro evaluado, ya que para el número de brotes, el

T1 (100%) mostró los mejores resultados, mientras que para el número de raíces, los resultados más eficientes fueron obtenidos con T2 (50%). En este estudio, el T3 (25%) fue el tratamiento que mostró menor efectividad para lograr la germinación de las semillas; este comportamiento observado puede ocurrir debido a la baja disponibilidad de macro y micronutrientes en los medios de cultivo, componentes fundamentales en el proceso de división celular, metabolismo energético y síntesis/transporte de hormonas, tal como lo reportan Cadavid y Salazar (2008) para la especie *Cattleya quadricolor*, en donde el tratamiento 3 con sales MS $\frac{1}{4}$ (25%) arrojó un porcentaje de germinación de semillas bajo en comparación con los tratamientos 1 (100%) y 2 (50%), donde estos fueron de 88% y 64%, respectivamente. Según lo anterior, Martínez et al. (2015) afirman que la disminución de la concentración de sales puede afectar el potencial osmótico, dificultando la absorción de nutrientes y reduciendo la eficiencia de la actividad metabólica de las plántulas.

Es importante considerar que, en otras especies, como la pitahaya, se ha evidenciado un efecto opuesto y resultados contradictorios a los obtenidos en *T. nudum*: Loja y Villalba (2024) registraron imbibición total de la germinación en el medio MS al 100%, lo que viene dado por el bajo potencial hídrico proveniente de la alta concentración de sales, condición que asemeja ambientes con déficit hídrico (Tombion et al., 2023; Lamz y Gonzáles, 2013). Sin embargo, en *T. nudum* este aspecto no se observó, lo que quiere decir que existen diferencias interespecíficas en la tolerancia a la salinidad del medio de cultivo. En ese orden de ideas, estudios en *Trichocentrum stramineum* evidencian variaciones en la respuesta: Ramos et al., (2020) observaron que el medio KC-E permitió una germinación significativamente superior frente al medio MS, lo que se explica por el efecto inhibitorio de la alta concentración de sales en este último (Flores et al., 2008).

Otros estudios con orquídeas soportan esta aseveración. Andrade et al. (2015) observaron que semillas cultivadas en MS al 25% mostraron síntomas de deficiencia nutricional, lo que coincide también con lo reportado en *T. nudum* bajo T3. Morard y Henry (1998) y Navarro et al (2000) también resaltan que tanto la disminución como el exceso del potencial osmótico del medio afectan la absorción de agua y nutrientes,

condicionando el crecimiento. Por el contrario, en T1 (100%) se obtuvo el mayor número de brotes, lo cual se asemeja con lo reportado por Téllez et al. (2024) en *Rhyncholelia glauca* y por Mora et al. (2023) en *Prostechea vitellina*, donde el medio MS completo produjo un mayor número de brotes por explante. Estas semejanzas resaltan que, en determinadas especies de orquídeas, la composición completa de nutrientes del MS resulta adecuada para la estimulación de la organogénesis.

Por otro lado, la elongación del vástago en *T. nudum* fue más eficiente en T2 (50%), lo que se relaciona con lo descrito por Flores et al. (2017) y Frausto et al. (2019), quienes observaron que la reducción de sales al 50% promueve la elongación de brotes y mejora la viabilidad de explantes en orquídeas, como *Phalaenopsis*. Este hallazgo sugiere que, aunque el medio MS completo aporta nutrientes suficientes, la reducción a la mitad de su concentración puede disminuir los efectos osmóticos negativos, provocando así un crecimiento más equilibrado. Además, se debe considerar que las orquídeas, al estar adaptadas a ambientes con bajos niveles de nutrientes, presentan un bajo requerimiento mineral (Frausto et al., 2019), por lo que la elección de la concentración adecuada es fundamental para optimizar la germinación y el crecimiento *in vitro*.

Finalmente, se hace la aclaración de que, en este estudio, la contaminación no representó un inconveniente, ya que en ninguno de los medios de cultivo evaluados se presentó indicios de proliferación de hongos o bacterias durante el tiempo de evaluación estipulado, permitiendo que los ensayos se realizaran de manera satisfactoria y que los parámetros analizados reflejaran con mayor precisión la respuesta a los tratamientos implementados. En síntesis, la presente investigación confirma que la respuesta de *T. nudum* a las concentraciones de sales MS depende del parámetro a evaluar. Por un lado, mientras que el medio completo (T1) favorece la brotación, el medio al 50% (T2) promueve una elongación más eficiente del vástago, y el medio reducido al 25% (T3) resulta limitante e inadecuado para la germinación y crecimiento de las vitroplántulas. Estos resultados hacen énfasis en la importancia de ajustar la concentración de sales al requerimiento fisiológico propio de cada especie, evitando tanto la deficiencia como el exceso de

nutrientes. Se sugiere explorar combinaciones dinámicas de otros medios, en pro de observar la respuesta de esta orquídea ante tales condiciones. Asimismo, se recomienda complementar el medio MS con fuentes adicionales de carbono y reguladores de crecimiento, a fin de potenciar la formación de plántulas vigorosas.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que la germinación y el desarrollo *in vitro* de *T. nudum* dependen directamente de la concentración de sales del medio MS, siendo las concentraciones completas (100%) y reducidas al 50% las más favorables según el parámetro evaluado. El medio MS al 100% estimuló principalmente la formación de brotes, mientras que al 50% permitió una elongación más equilibrada del vástago, en tanto que la reducción al 25% resultó ineficiente para todas las fases del desarrollo. Estos hallazgos resaltan la posibilidad de establecer un protocolo para el establecimiento *in vitro* de esta especie y su posterior proceso de micropropagación.

Referencias

- Álvarez, C. (2012). Estudio del efecto hormonal y de compuestos orgánicos en el cultivo *in vitro* de la orquídea *Trichocentrum pachyphyllum* (hook.) R. Jiménez & Carnevali. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza. México. 88 pp.
- Ancasi-Espejo, R., Alcázar-Vivado, J. & Muñoz-Guzmán, I. (2023). Concentraciones de ácido indolbutírico para la formación de raíces en condiciones *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* bonpl., Lecythidaceae). UNESUM - Ciencias. Revista Científica Multidisciplinaria, 7(1), 17–22. <https://doi.org/10.47230/unescum-ciencias.v7.n1.2023.660>
- Andrade, M., Vargas, J., Villegas, O., López, V., Guillen, D. & Alia, I. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Cattleya* (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro*. Interciencia 40: 549-553.
- Apolo, K. (2021). Evaluación de procedimientos en la conservación y germinación *in vitro* de semillas de la orquídea *Epidendrum nocturnum* (Jacq).

Artículos

Guayaquil, Ecuador: Universidad Agraria del Ecuador, p 30-31.

Cadavid, I.; Salazar, S. (2008). Micropropagación de *Cattleya quadricolor*. Medellín, Colombia: Universidad EAFIT, p30-32.

Campos, J., Arteaga, M., Campo, S., Chico, J. & Cerna, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de "caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141- 156. <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v27n1/2413-3299-arnal-27-01-141.pdf>

Carnevali, G., Cetzál, W., Balam, R. & Romero, G. (2010). A synopsis of *Cohniella* (Orchidaceae, Oncidiinae). *Brittonia*, 62 (2), 2010, pp. 153-177. https://www.researchgate.net/publication/226354887_A_synopsis_of_Cohniella_Orchidaceae_Oncidiinae

Carranza, C., Morales, A., Cruz, D., Torres, D. & Maldonado, J. (2023). Orquídeas: amenazas de su existencia, formas de conservación y protección. Jandiekua – Revista Mexicana de Educación Ambiental, p 46. ISSN 2683-1651. https://www.researchgate.net/publication/381316659_Orquideas_amenazas_de_su_existencia_formas_de_conservacion_y_proteccion

De Mendiburu, F. (2012). Manual rápido de uso de la librería agricolae. Universidad Nacional Agraria La Molina. 60 p.

Duarte, E. (2022). Regeneración de yemas adventicias en segmentos de hojas y entrenudos de *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl. *Colombia forestal*, 25(1), 67-76. <https://doi.org/10.14483/2256201X.17767>

Faleiro FV, Nemésio A, Loyola R. (2018). Climate change likely to reduce orchid bee abundance even in climatic suitable sites. *Global Change Biology* 24: 2272-2283. https://www.researchgate.net/publication/323529128_Climate_change_likely_to_reduce_orchid_bee_abundance_even_in_climatic_suitable_sites

Fernández, K. (2010). Micorrización *in vitro* e *in vivo* de plántulas de papa (*Solanum*

tuberosum var. Alfa). *Cultivos tropicales*, 31, 2-21.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000200004

Flores, G., Legaria, J., Gil, I., & Colinas, M. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(3), 347-353.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000300017&lng=es&tlng=es.

Flores, L., Robledo, A. & Jimarez, M. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.8 Núm.6 14 de agosto - 26 de septiembre, 2017 p. 1315-1328.

https://www.researchgate.net/publication/330307281_Culture_medium_and_agar_substitutes_for_in_vitro_growth_of_orchids

Frausto, K., Ojeda, M., Alvarado, O., García, E., Rodríguez, H. & Rodríguez, G. (2019). Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* volumen 10 número 6 14 de agosto - 27 de septiembre, 2019.

https://www.researchgate.net/publication/336053759_Induccion_de_brotes_a_partir_de_varas_florales_de_la_orquidea_Phalaenopsis_spp_Blume_in_vitro

Hernández-Rosales, D. & Ortega-Macareno, L. (2025). Muestreo y recolección de *Cyrtopodium schargellii* y *Trichocentrum nudum*, dos orquídeas epífitas presentes en el municipio de Sampués. Universidad de Sucre. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15472/rix1ig> accessed via GBIF.org on 2025-08-25.

<https://gbif.org/occurrence/5219767302>

Hernández, F., Iracheta, L., Damon, A., Fernández, S. & Guillén, K. (2023). 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). *Polibotánica*, (56), 151-170. Epub 18 de septiembre de 2023.

Artículos

<https://doi.org/10.18387/polibotanica.56.8>

Hinsley, A., Nuno, A., Ridout, M., John, F. & Roberts, D. (2017). Estimating the extent of CITES noncompliance among traders and end-consumers; lessons from the global orchid trade. *Conservation Letters*, 10, 602-609.

https://www.researchgate.net/publication/309585962_Estimating_the_Extent_of_CITES_Noncompliance_among_Traders_and_End-Consumers_Lessons_from_the_Global_Orchid_Trade

https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442023000100041

Lamz, A. & González, M. (2013). La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31-42.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362013000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Loja, R. & Villalba, R. (2024). Establecimiento de un protocolo de propagación in vitro de pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) para la obtención de plantas completas. Tesis para obtener el título de Ingeniero Biotecnólogo. Universidad Politécnica Salesiana, sede Quito, Carrera de Biotecnología.

Mamani, B., Muriel, A., Maquera, A. & Nova, M. (2022). Germinación *in vitro* de *Epidendrum secundum* con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco. *Acta Nova*, 10(3), 345-359. Epub 31 de marzo de 2022. Recuperado en 13 de noviembre de 2024, de

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-07892022000100345

Martínez, Y., Andrade, M., Colinas, M., Villegas, Ó., Castillo, A., Alía, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista fitotecnia mexicana*, 38 (4), 369-374.

Meng, Y. Y., Zhang, W. L., Selosse, M. A., Gao, J. Y. (2019). Are fungi from adult orchid roots the best symbionts at germination? A case study. *Mycorrhiza*, 29, 541-547.

https://www.researchgate.net/publication/334500491_Are_fungi_from_adult_orchid_roots_the_best_symbionts_at_germination_A_case_study

Mora-Cruz, Y., López-Peralta, M., Hernández-Meneses, E. & Cruz-Huerta, N. (2023). *In vitro* regeneration of *Prosthechea vitellina* (Lindley) W. E. Higgins plants by direct organogenesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 46:33-40, <https://doi.org/10.35196/rfm.2023.1.33>

Morard P. and M. Henry (1998) Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *Journal of Plant Nutrition* 21:565-1576.

Moreno, D. & Menchaca, R. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, vol. 9, núm. 2, 2007, pp. 27-32. Recursos Genéticos Forestales, México.

https://www.researchgate.net/publication/268577540_Efecto_de_los_complejos_organicos_en_Stanhopea_tigrina

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

<https://doi.org/10.1111/j.13993054.1962.tb08052.x>

Navarro, J., Botella, M., Cerdá, A. & Martínez, V. (2000). Effects of salinity x calcium interaction on cation balance in melon plants grown under two regimes of orthophosphate. *Journal of Plant Nutrition*. 23:991-1006.

Puris, J., Rios, K. & Villena, T. (2023). En peligro por su belleza: Pérdida de Orquídeas. *Yotantsipanko*, 3(1), 63-79.

<https://doi.org/10.54288/yotantsipanko.v3i2.36>

Ramos, S., Rangel, L., Pedraza, M., Chávez, V., Martínez, J., Sánchez, N., & Martínez, A. (2020). Clonal propagation of *Trichocentrum stramineum* (Orchidaceae), a threatened species endemic to Mexico. *Botanical Sciences*, 98(2), 355-365. Epub 03 de septiembre de 2020.

<https://doi.org/10.17129/botsci.2468>.

Artículos

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-42982020000200355

Rangel, S., Hernández, E., CanulKú, J., Barrios, E., López, M. & Tapia, L. (2018). *In vitro* germination, seed viability and organogenesis of *Anthurium schlechtendalii* Kunth subsp. *schlechtendalii*. *Revista Bio Ciencias* 5(nesp2), e475.
<https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e475>
<https://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/475/pdf>

Recuperado de:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22923/38225>

Romero, R., Luna, B., Barba, A. (2007). Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. *Lankesteriana* 7:353-356.

Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Karthikeyan, V. & Rajendran, K. (2020). Orchid mycorrhizal fungi: structure, function, and diversity. In: *Orchid biology: recent trends & challenges*. Springer (Singapore). p.239-280.
https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_13

Seaton, P., Kendon, J., Pritchard, H., Puspitaningtyas, D. & Marks, T. (2013). Orchid conservation: The next ten years. *Lankesteriana*. 13 (1-2): 93-101. 2013.
<10.15517/lank.v0i0.11545>.
https://www.researchgate.net/publication/269563235_Orchid_conservation_The_next_ten_years

Téllez, J., López, M., Hernández, E. & Cruz, N. (2024). Organogénesis directa de brotes a partir de plántulas de *Rhyncholelia glauca* (Lindley) Schlechter germinadas *in vitro*. *Revista fitotecnía mexicana*, 47(3), 293-300. Epub 04 de marzo de 2025.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2024.3.293>.

Tombion, L., Coviella, M., Pannunzio, M., Soto, M. & Bologna, P. (2023). Germinación *in vitro* de *Calibrachoa thymifolia* y *Calibrachoa missionica* nativas de la Argentina. *Revista Tecnología En Marcha*.

<https://doi.org/10.18845/tm.v36i3.6142>

Vargas, B., Corredor, J., Pescador, R., Montoya, F., Dal-Vesco, L. & Mamoru, R. (2023). Morpho-anatomy of *in vitro* germination and cryopreservation of the orchid *Cattleya crispa* (Orchidaceae) Morfoanatomía de la germinación *in vitro* y criopreservación de la orquídea *Cattleya crispa* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 71(1), e52338.
<https://dx.doi.org/10.15517/rev.biol.trop.v71i1.52338>

Vogel, I. & Macedo, A. (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: 147-155.
https://www.researchgate.net/publication/227314204_Influence_of_IAA_TDZ_and_light_quality_on_asymbiotic_germination_protocorm_formation_and_plantlet_development_of_Cyrtopodium_glutiniferum_Raddi_a_medicinal_orchid

Werner, F. & Gradstein, S. (2008). Seedling establishment of vascular epiphytes on isolated and enclosed forest trees in an Andean landscape, Ecuador. *Biodivers. Conserv.* 17, 3195-3207.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10531-008-9421-5>

Wida, E., Hariyanto, S. & Wulan, Y. (2017). *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Volume 7, Issue 5, May 2017, Pages 406-410.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.011>.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S222116911630346X>

Wongsa, T., Piapukiew, J., Kuenkaew, K., Somsanook, C., Sapatee, O., Linjikao, J., Kunakhonnuruk, B. & Kongbangkerd, A. (2025). Asymbiotic Seed Germination and *In Vitro* Propagation of the Thai Rare Orchid Species; *Eulophia bicallosa* (D.Don) P.F.Hunt & Summerh. *Plants* 2025. 14 (14), 2212.
<https://doi.org/10.3390/plants14142212>