

EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS SEGÚN EL TIEMPO DE INMERSIÓN EN HIPOCLORITO DE SODIO

Evaluation of orchid seed germination according to the time of immersion in sodium hypochlorite.

Evelyn Duarte¹

evelyn.duarte@fcf.unam.edu.ar

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3331-4447>

Leonardo Da Vega²

leo_davega97@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8670-5017>

Marcela Lorena Ortiz³

ortizlorena684@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2508-4867>

Aldana Samudio⁴

aldysamudio@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8022-4618>

Guillermo Küppers⁵

guillermokuppers@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0865-3818>

Pág. 24 - 34

RECIBIDO

[14/01/2022]

ACEPTADO

[12/03/2022]

PUBLICADO

[30/04/2022]



RESUMEN

Diversos factores influyen sobre la germinación in vitro de las semillas de orquídeas, y el tiempo de exposición de las semillas al hipoclorito de sodio es uno de ellos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la germinación in vitro de *Brasiliorchis chrysantha*, *Cattleya Cernua* y *Miltonia flavesceus* a los 40, 80 y 120 días después del cultivo, empleando una desinfección con etanol al 70 % por un minuto y una dosis de 0.2 % de NaClO durante 5 y 10 minutos. Se cosecharon cápsulas maduras previas a la dehiscencia de las especies antes mencionadas, se procedieron a la apertura y se extrajeron una

Palabras clave

Orchideaceae, desinfección, especies nativas, protocormos blancos, Cultivo in vitro

¹Ingeniera Forestal y Doctora en Recursos Naturales. Jefa de Trabajos Prácticos de la cátedra de Biología Vegetal I, II y Fisiología Vegetal. Profesora adjunto de la cátedra de Diversidad Vegetal.

²Estudiante del Profesorado en Ciencias Biológicas.

³Estudiante del Profesorado en Ciencias Biológicas.

⁴Estudiante del Profesorado en Ciencias Biológicas.

⁵Jefe de Trabajos Prácticos de la cátedra Dendrología.

muestra de semillas de 0.0050 g que fueron colocadas en sobres de papel filtro, para la desinfección en cámara de flujo laminar y posterior cultivo en cajas de Petri en un medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración. Para determinar el porcentaje de germinación se tomaron microfotografías con una lupa Motic DM 39C. El mejor porcentaje de germinación fue cuando se desinfectó durante 5 minutos y la mayor mortalidad de semillas a los 10 minutos en todas las especies. *B. chrysantha* y *C. Cernua* fueron las más susceptibles a tiempo de exposición al NaClO y *M. flavescens* la más resistente.

ABSTRACT

Several factors influence in vitro germination of orchid seeds, and the time of exposure of seeds to sodium hypochlorite is one of them. The objective of this work was to evaluate the in vitro germination of *Brasiliorchis chrysantha*, *Cattleya Cernua* and *Miltonia flavescens* at 40, 80 and 120 days after culture, using disinfection with 70 % ethanol for one minute and a dose of 0.2 % NaClO for 5 and 10 minutes. Mature capsules were harvested prior to dehiscence of the aforementioned species, opened and a seed sample of 0.0050 g was extracted and placed in filter paper envelopes for disinfection in a laminar flow chamber and subsequent culture in Petri dishes in Murashige and Skoog medium at half their concentration. To determine the germination percentage, microphotographs were taken with a Motic DM 39C loupe. The best germination percentage was when disinfected for 5 minutes and the highest seed mortality at 10 minutes in all species. *B. chrysantha* and *C. Cernua* were the most susceptible to NaClO exposure time and *M. flavescens* the most resistant.

Keywords

Orchideaceae, disinfection, native species, white protocorms, in vitro culture

INTRODUCCIÓN

En la República Argentina existen reconocidas unas 280 especies de la familia Orchidaceae, y en la provincia de Misiones el número es de 151 (Johnson, 2001; Freuler, 2008; Zanotti *et al.*, 2020). Las orquídeas son vegetales de alto un valor comercial, principalmente como ornamental, pero padecen grandes amenazas y riesgos de extinción debido a la vulnerabilidad, inestabilidad y uso abusivo del recurso, además de sufrir la pérdida de hábitat, contaminación y el efecto del cambio climático, que la arrastran a un futuro incierto por disminución de las poblaciones silvestres (Barman y Devadas, 2013; Capdevila-Argüelles *et al.*, 2013; Cox Tamay 2013; Fay 2016).

Basado en el estado actual de conservación de muchas especies, surge la necesidad de generar metodologías de conservación para las especies de esta familia, no solo por su valor económico, sino también por las funciones ecológicas que poseen, ya que son grandes bioindicadores del impacto antrópico sobre la biodiversidad de ecosistemas forestales (Krömer *et al.*, 2014).

Si bien una de las estrategias de conservación de plantas más apropiadas es la *in situ*, la conservación *ex situ* puede resultar una alternativa interesante como complemento de la primera o en casos en que no sea factible la conservación en el sitio de origen (Ortega-Larrocea *et al.*, 2009), en este sentido la propagación *in vitro* puede constituir una herramienta efectiva, porque permite la germinación de las semillas de orquídeas en peligro de extinción en ausencia de hongos micorrizicos (Ruiz *et al.*, 2008).

Para comercializar especies de orquídeas silvestres es necesario establecer protocolos de propagación masiva *in vitro* en laboratorios, ya que, si se logra un mayor uso y aceptación de las

orquídeas obtenidas por metodologías sustentables, podría mitigarse la presión sobre las poblaciones silvestres de las orquídeas nativas (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2017). A su vez la germinación *in vitro*, es una metodología interesante, porque a partir de estas plantas se pueden realizar una gran variedad de estudios en condiciones asépticas, como así también se pueden generar sistemas de propagación asexual que pueden utilizarse para generar bancos de germoplasmas *in vitro* (Ortega-Larrocea *et al.*, 2009).

Pero la germinación *in vitro* de orquídeas requiere de métodos de desinfección de semillas, que permitan obtener cultivos libres de contaminación. Sin embargo, con el pequeño tamaño que poseen resulta difícil su manipulación por lo que se suelen utilizar sobres de papel o jeringas, pero también se debe tener en cuenta la dosis y el tiempo de exposición de las semillas al hipoclorito de sodio, porque se pueden producir altos porcentajes de mortalidad de estas (Dalzotto y Lallana, 2013; Santos-Pérez *et al.*, 2019).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad germinativa *in vitro* de semillas de *Brasiliorchis chrysantha*, *Cattleya Cernua* y *Miltonia. Flavescens* desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0.2 % durante 5 y 10 minutos después de 40, 80 y 120 días de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon plantas adultas en edad reproductiva de *Brasiliorchis chrysantha* (Barb. Rodr.) R.B. Singer, S. Koehler & Carnevali., *Cattleya Cernua* (Lindl.) C. Berg. y *Miltonia flavescens* Lindl. mantenidas en invernáculo y bajo riego por aspersión una vez al día. Durante la época de floración se procedieron a fecundar 4 flores por planta y los frutos obtenidos se cosecharon entre los 2 y 4 meses después de la fecundación pero previo a la dehiscencia.

Desinfección y cultivo *in vitro* de semillas

Una muestra de 0.0050 g de semillas de varios frutos de *B. chrysantha*, *C. Cernua* y *M. flavescens* se colocaron en sobres de papel filtro y se desinfectaron con etanol al 70% por un minuto, posteriormente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.2% con 2 gotas de Tween 20 por 5 y 10 minutos y fueron enjuagadas 5 veces con agua destilada estéril para eliminar el desinfectante. Inmediatamente después de la desinfección, las semillas se cultivaron en cajas de Petri con 15 mL del medio basal Murashige y Skoog (1962) reducidas en un 50% en su concentración original, adicionado con sacarosa 20 g.L⁻¹, carbón activado 2.0 g.L⁻¹ y el gelificante agar 6.0 g.L⁻¹. El pH del medio de cultivo fue regulado a 5.8 con soluciones de KOH o HCl antes de la adición del agar y el carbón activado. Las cajas de Petri con las semillas se mantuvieron durante 120 días en una cámara climatizada con un fotoperiodo de 16 horas luz (116 µmol.m⁻².s⁻¹, PAR) y 8 de oscuridad con una temperatura 27±2 °C.

Obtención de datos

Durante el ensayo se tomaron micro-fotografías con una lupa Motic DM 39C del cultivo a los 40 y 80 días para analizar la germinación de las semillas provenientes de los distintos tratamientos de exposición de éstas al NaClO. Para el conteo de las semillas germinadas se consideró a la etapa fenológica, en la que se forma una estructura de color verde conocida como protocormo (Aguilar-Morales *et al.*, 2016).

En cada microfotografía se contabilizaron la cantidad de protocormos verdes y la totalidad de las semillas presentes en la fotografía. Los datos obtenidos de las microfotografías se utilizaron para el cálculo del porcentaje de germinación, empleando la fórmula:

$$PG (\%) = (SG/TS) * 100 (1)$$

Donde SG es el total de protocormos verdes y TS es el total de semillas cultivadas.
El porcentaje de semillas muertas, con la fórmula:

$$SM (\%) = (PB/TS) * 100 (2)$$

Donde PB es el total de protocormos blancos.

El incremento de la germinación entre los 40 y 80 días de cultivo, cuando se desinfectó durante 5 y 10 minutos, con las fórmulas:

$$IG (\%) = PG_{80} - PG_{40} (3)$$

Donde PG80 es el porcentaje de germinación a los 80 días y PG40 porcentaje de germinación a los 40 días.

El incremento de mortalidad (IM) de semillas entre 5 y 10 minutos de desinfección a los 40 y 80 días, con la fórmula:

$$IM (\%) = SM_{10} - SM_5 (4)$$

Donde SM₁₀ es cantidad de protocormos blancos cuando el tiempo de desinfección con NaClO fue de 10 minutos y SM5 cuando el tiempo de exposición fue de 5 minutos.

Diseño y análisis estadístico

El diseño estadístico que se empleó fue el completamente aleatorizado con distribución factorial de 3 (especies) por 2 (tiempos de exposición en hipoclorito de cloro) por 2 (días después del cultivo), para lo cual se utilizaron 3 cajas de Petri por cada tratamiento (Tabla 1). Para la cuantificación de la capacidad germinativa se utilizó una muestra de 5 microfotografías por tratamiento, que fueron seleccionadas al azar después de ser tomadas sobre cada una de las cajas de Petri. Los datos de las variables fueron analizados con el test de normalidad Shapiro-Wilk modificado y de homocedasticidad por medio de la prueba de Levene, a continuación, se realizó un análisis de variancia (ANDEVA) y las medias se compararon con el test de Duncan a un nivel de confianza de 0.05 empleando el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Tabla 1. Distribución de los tratamientos de acuerdo con la combinación de los factores a evaluar.

Especie	Tiempo de exposición	Días de cultivo	Tratamiento
<i>Brasiliorchis chrysantha</i>	5 minutos	40	1
<i>Brasiliorchis chrysantha</i>	5 minutos	80	2
<i>Brasiliorchis chrysantha</i>	10 minutos	40	3
<i>Brasiliorchis chrysantha</i>	10 minutos	80	4
<i>Cattleya Cernua</i>	5 minutos	40	5
<i>Cattleya Cernua</i>	5 minutos	80	6
<i>Cattleya Cernua</i>	10 minutos	40	7
<i>Cattleya Cernua</i>	10 minutos	80	8
<i>Miltonia flavescens</i>	5 minutos	40	9
<i>Miltonia flavescens</i>	5 minutos	80	10
<i>Miltonia flavescens</i>	10 minutos	40	11
<i>Miltonia flavescens</i>	10 minutos	80	12

Fuente: Elaboración propia

DESARROLLO

La germinación *in vitro* de semillas de orquídeas se ve afectada por las condiciones de cultivo, la maduración de las semillas y la desinfección empleada (Rodríguez et al., 2003; Salazar-Mercado et al., 2013). La concentración y tiempo de exposición del NaClO durante la desinfección son factores que influyen notablemente en la viabilidad y consecuentemente en el porcentaje de germinación (Salazar-Mercado et al., 2013). En este estudio el análisis estadístico manifestó diferencias estadísticas de las variables entre los tratamientos analizados, observándose los mayores PG, cuando la exposición fue de 5 minutos y el mayor SM a los 10 minutos en todas especies, pero no se observaron diferencias estadísticas entre los 40 y 80 días de cultivo. Por otro lado *B. chrysantha* presentó el mejor PG superando el 60% cuando la desinfección con NaClO fue durante 5 minutos, *C. cernua* en cambio presentó el menor PG con valores inferiores al 40% y una proporción de semillas muertas (SM) de más del 60 % (Tabla 2), siendo la especie más afectada por el proceso de desinfección. El efecto negativo del NaClO sobre la germinación de semillas de orquídeas fue demostrado también en *Isochilus linnearis* y *Oeocladodes maculata*, donde las semillas presentaron una notable disminución en el PG y vigor a medida que transcurrió el tiempo (Dalzotto y Lallana, 2013).

M. Flavescens en cambio no manifestó diferencias significativas entre los tiempos de exposición y diferentes periodos de evaluación, manifestando un PG y un SM de aproximadamente del 50 % (Tabla 2), observándose como la especie que tiene semillas de mayor resistencia a la exposición del NaClO, al

igual que *Oncidium viperinum* (Dalzoto y Lallana, 2013).

En otras especies como *Prosthechea vespa* Vell. y *Sobralia klotzscheana* Rchb. f. el uso de NaClO al 0.39 % durante 5 minutos en semillas de cápsulas maduras, alcanzaron porcentajes de germinación del 84.4 y 80.1% respectivamente (Salazar-Mercado y Cancino, 2012), contrario a lo obtenido en este estudio. Por otro lado, cuando las semillas *Phragmipedium kovachii* fueron desinfectadas empleando una dosis de 0.5 % durante 15 minutos la germinación fue del 50 % (Ruíz-Sánchez, 2021), asemejándose a los resultados obtenidos en *B. chrisantha* y *M. Flavescens*.

Tabla 2. Efectos de los tratamientos sobre la capacidad germinativa (PG %) y proporción de semillas muertas (SM %).

Tratamiento	n	PG (%)	SM (%)
1	243	61.17 ± 6.07 ab	38.83 ± 6.07 fg
2	170	67.99 ± 11.98 a	32.00 ± 11.98 g
3	200	52.43 ± 4.97 bcd	47.57 ± 4.97 def
4	172	54.03 ± 7.75 bc	45.96 ± 7.75 ef
5	161	31.55 ± 10.52 fg	68.44 ± 10.52 ab
6	117	36.64 ± 12.88 ef	63.36 ± 12.88 bc
7	191	22.87 ± 4.15 g	77.13 ± 4.15 a
8	122	23.17 ± 10.14g	76.82 ± 10.14 a
9	168	49.23 ± 8.72 bcde	50.76 ± 8.72 cdef
10	125	52.77 ± 15.19 bcd	47.23 ± 15.19 def
11	200	39.65 ± 8.59 def	60.34 ± 8.59 bcd
12	139	43.00 ± 9.29 cdef	56.99 ± 9.29 bcde

Fuente: Elaboración propia

* Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de 0.05 al Test de Duncan.

Cuando las semillas fueron desinfectadas durante 5 minutos, después de 40 días de cultivo se observan protocormos verdes con rizoides en todas las especies, pero todavía se encuentra una alta cantidad de protocormos dentro del tegumento y empiezan a aparecer protocormos blancos (Figura 1A-C), que son originados por la utilización del NaClO y pueden incrementarse a medida que aumenta la dosis y el tiempo en que se exponen las semillas al producto desinfectante (Dalzotto y Lallana, 2013).

Si bien la germinación se inició a los 9, 12 y 14 días para *C. cernua*, *B. chrisantha* y *M. Flavescens* respectivamente, transcurrido 80 días de cultivo las hojas comienzan a visualizarse en los protocormos de *B. chrisantha* (Figura 1D) y de *C. cernua* (Figura 1E), en tanto que en *M. Flavescens*, en este periodo recién comienzan a visualizarles escasamente el desarrollo de los primordios foliares (Figura 1F). Al cabo de 120 días el grado de desarrollo de los protocormos es tal que no se puede continuar observando

la germinación de las semillas en ninguna de las especies y tiempos de desinfección. En *B. chrysantha* puede visualizarse hasta 3 hojas por protocormo, pero aun presentan rizoides (Figura 1G), en *C. cernua* a 120 días ya se observan plantas completamente formadas con hojas y una raíz bien desarrollada (Figura 1H), en tanto que en *M. Flavescens* las hojas recién comienzan a visualizarse (Figura 1I).

La germinación de las semillas de orquídeas puede iniciarse desde los 5 días hasta 3 o 4 meses después del cultivo, porque este proceso morfogénico es altamente influenciado por el grado de maduración de las cápsulas y si se cosechan extremadamente verdes, las semillas podrían no germinar (Rodríguez, 2003; Andrade-Rodríguez, 2015; del Cristo-Banda-Sánchez *et al.*, 2017). En las orquídeas, la germinación es considerada cuando el embrión forma una pequeña estructura llamada protocormo que cambia a una coloración verde, sobre el cual a medida que transcurren los días del cultivo se desarrollan los primordios foliares, rizoides y por último la raíz (Andrade-Rodríguez, 2015).

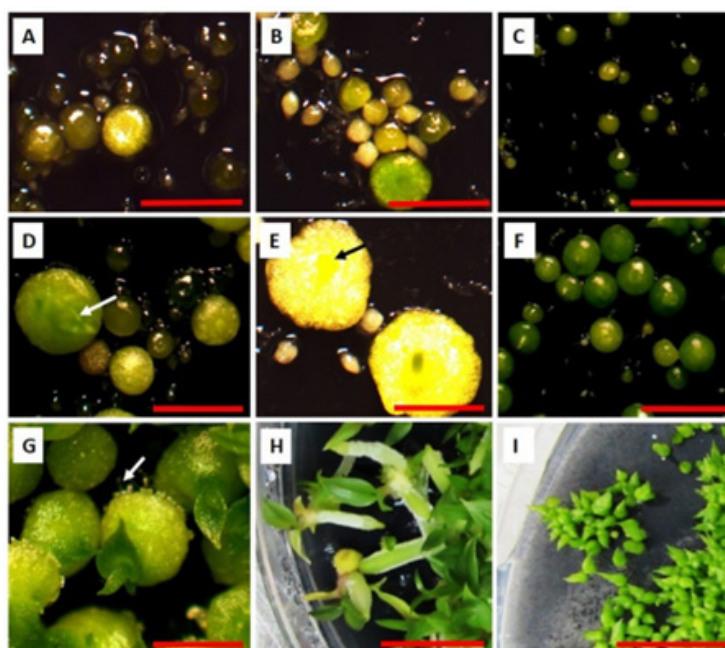


Figura 1. Germinación de semillas desinfectadas durante 5 minutos con NaClO al 0,2 %. Protocormos desarrollados *B. chrysantha* (A, D y G), *C. cernua* (B, E y H); *M. flavescens* (C, F e I), observación a los 40 días (A – C), 80 días (D – F) y 120 días (G – I). Las flechas indican primordios foliares en D y E, rizoides en G. Escala: A-C 1000 μ m; D-G 2000 μ m; H-I 1 cm

Al desinfectarse durante 10 minutos, a los 40 días ya se observan gran cantidad de protocormos blancos y semillas con embriones muertos (Figura 2 A-C) y a los 80 días la cantidad de protocormos verdes con posibilidad de formar una planta es inferior a las semillas que fueron desinfectadas durante 5 minutos (Figura 2 D-F), hecho que puede observarse a simple vista a los 120 días (Figura 2 G-I). El efecto tóxico del tiempo de exposición del NaClO sobre las semillas, se observa claramente sobre la morfofisiología de éstas (Salazar-Marcado *et al.*, 2013), generando protocormos muertos de color blanco (Billard *et al.*, 2013). A su vez a medida que transcurren los días de cultivo se pueden incrementar estos, ya que los protocormos que inicialmente se manifestaban de color verde pueden verse afectados por el NaClO y pueden convertirse en blancos (Dalzotto y Lallana, 2013).

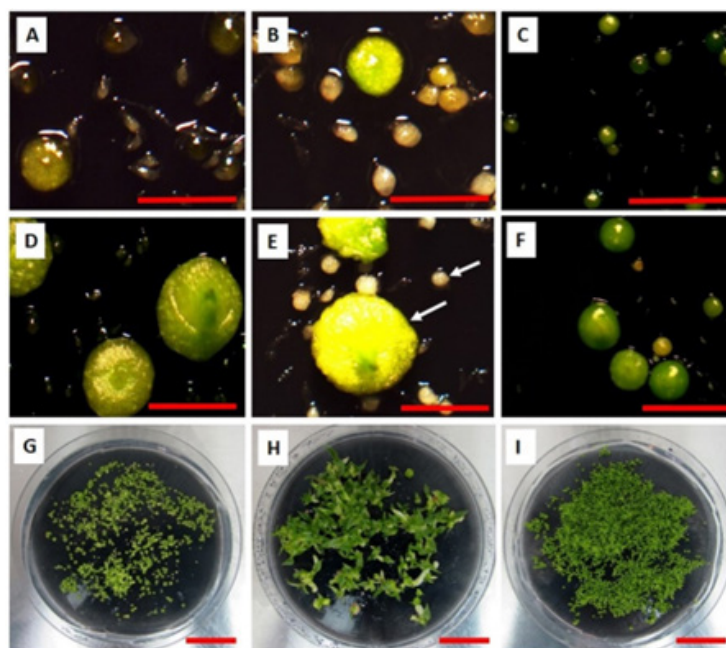


Figura 2. Germinación de semillas desinfectadas durante 10 minutos con NaClO al 0,2 %. Protocormos desarrollados *B. chrysantha* (A, D y G), *C. cernua* (B, E y H); *M. flavescens* (C, F e I), observación a los 40 días (A – C), 80 días (D – F) y 120 días (G – I). Las flechas indican protocormos vivos (verde) y muerto (blanco). Escala A-C 1000 μ m; D-F 2000 μ m; G-I 2 cm

Al analizar los incrementos de germinación entre los 40 y 80 días de cultivo no se observaron diferencias significativas entre las especies, ni en los diferentes tiempos de exposición, sin embargo *C. cernua* fue la especie que presentó menor IG con un tiempo de exposición de 10 minutos (Figura 3A), lo cual conlleva a un bajo PG y *B. chrysantha* la que manifestó el mayor IG, ocasionando un elevado PG (tabla 2). Empleando una dosis de 0.5 % de NaClO las semillas de *Oncidium bifolium* tampoco manifestaron diferencias significativas en los porcentajes de germinación entre los 24 y 67 días después del cultivo y los protocormos muertos solo aparecieron en los tratamientos que no tuvieron un enjuague (Billard *et al.*, 2013), en este trabajo en cambio se observaron protocormos muertos a pesar de tener cinco enjuagues, por lo que las especies aquí estudiadas pueden ser relativamente susceptibles a la toxicidad del NaClO.

Considerando los protocormos blancos (muertos), en la evaluación del incremento de estos, no se observaron diferencias significativas entre las especies ni los diferentes tiempos de exposición, pero los mayores IM se observaron en *B. chrysantha* y *C. cernua* (Figura 3B).

El NaClO es un agente desinfectante efectivo en el establecimiento *in vitro* de semillas de orquídeas, pero se debe ser cauto con las dosis y tiempos de inmersión, porque puede ocasionar elevada mortalidad de semillas incluso varios días después del cultivo (de Feria *et al.*, 2007; Dalzotto y Lallana, 2013; Salazar-Mercado *et al.*, 2013), tal como se observó en *Isochilus linnearis* y *Oeceolades maculata* que tuvieron una incremento de protocormos blancos del 25 y 52,3% respectivamente a los 77 días de cultivo por efecto del NaClO (Dalzotto y Lallana, 2013).

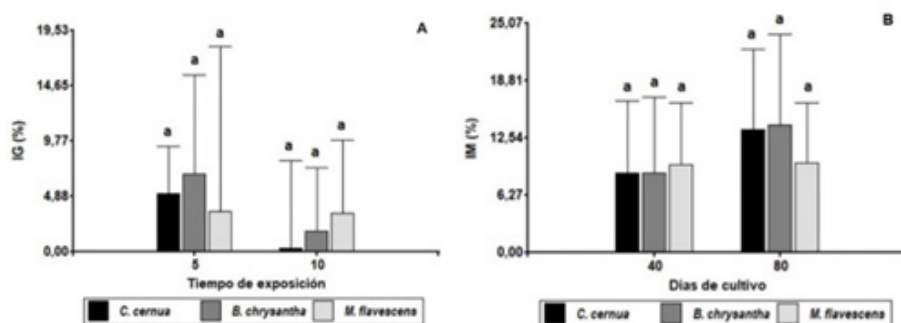


Figura 3. Incremento de germinación entre los 40 y 80 días después del cultivo cuando el tiempo de exposición en hipoclorito de sodio fue de 5 y 10 minutos (A). Incremento de mortalidad de las semillas 40 y 80 días después del cultivo de las semillas desinfectadas por 5 y 10 minutos en hipoclorito de sodio (B).

El cultivo *in vitro* es una herramienta indispensable para mejorar la capacidad germinativa y desarrollo de las especies de orquídeas con el objetivo de comercializar o realizar futuros estudios (Salazar-Mercado *et al.*, 2013). En este sentido, los resultados de este estudio al igual que otros de la misma índole han demarcado la importancia de contar con protocolos *in vitro* para las orquídeas, sobre todo para aquellas que se encuentren en peligro de extinción (Salazar-Mercado y Gélvez-Manrique, 2015; Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón, 2016).

CONCLUSIONES

El incremento del tiempo de exposición de las semillas al NaClO en una dosis de 0,2% provoca una disminución en la germinación en *B. chrysantha* y en *C. cernua*, pero no así en *M. flavescens* porque exponer las semillas de esta especie a 5 o 10 minutos a esa concentración de NaClO, no genera diferencias significativas en la germinación.

El tiempo transcurrido desde la siembra entre los 40 y 80 días no demarca diferencias en la germinación, por lo que a los 40 días prácticamente se logran valores similares a los 80 días, que pueden ser concordantes con los valores finales de germinación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Morales, M. A., Laguna-Cerda, A., Vences-Contreras, C. y Lee-Espinosa, H. E. (2016). Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación *ex situ*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(7), 1741-1747. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342016000701741&script=sci_arttext
- Andrade-Rodríguez, M. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Cattleya* (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro*. *Interciencia*, 40(8), 549-553. <https://www.proquest.com/openview/2989191ee5712c0f08dea0e63547ad49/1?pq-origsite=gscholar&cbl=27688>
- Barman, D. y Devadas, R. (2013). Climate change on orchid population and conservation strategies: a review. *Journal of Crop and Weed*, 9(2), 1-12. <https://www.cropandweed.com/vol9issue2/pdf2005/1.pdf>
- Billard, C. E., Dalzotto, C. A. y Lallana, V. H. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, (38), 145-157. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-27682014000200008&script=sci_abstract&tlng=pt
- Cox, L. (2013). Orquídeas: importancia y uso en México. *Bioagrocencias*, 6(2), 4-7. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/33974642/Articulo_1-libre.pdf?1403045854=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DOrquideas_Importancia_y_uso_en_Mexico.pdf&Expires=1659745177&Signature=ZN1XpJcsHrjX-gtLPldcpD2-w1tdB31BJL58SAmXSdn7389pQvyJY3WlvvVy5OOhb4G4GLZqg9FV0I9DmjakFxDQFw7pkwuo-dTA2phdwn2v6yp-7Nv80TCzp0erOEN-CAOUhIH-PazCYdM5rBCSTF~j3Si7pbm85STnVHSZZjEgcoHCdkJ2iMdyAme1Pgch30aZcn~Ds3oR6cYvgffqYIFluPR6uu9usgmrtqxtP7f1qh8ahIPYULAaEFV5LAYSu0eKRgp-CkOIBlhQrn0KsQBuvRFb36V-DQRnveqhim7qxxuhY9j5k9IO-9H3lg66120oh24h~eh7n2KLxfO9MQ_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
- Dalzotto, C. A. y Lallana, V. H. (2013). Viabilidad, germinación asimbiótica y vigor de tres especies de orquídeas nativas. *Revista Científica Agropecuaria*, 17(1-2), 39-49. http://www2.fca.uner.edu.ar/rca/Volumenes%20Anteriores/Vol%20Ante%2017/rca_17_1-2_pdf/RCA_207_OFICIO_Final.pdf
- de Feria, M., Chávez, M. y Quiala, E. (2007). Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*. *Bioteología Vegetal*, 7(1). <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/353>
- del Cristo-Banda-Sánchez, L., Pinzón-Ariza, Y. H. y Vanegas-Martínez, L. E. (2017). Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea* sp. de la zona andina, Fusagasugá, Colombia. *Biota Colombiana*, 18(1), 80-87. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.21068/c2017.v18n01a5>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2020) InfoStat, versión 2020, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/>
- Freuler, M. J. (2008). 100 Orquídeas Argentinas, 1ª Ed. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina.
- Johnson, A. E. (2001). Las Orquídeas del Parque Nacional Iguazú. Buenos Aires: LOLA.
- Krömer, T., García-Franco, J. G. y Toledo-Aceves, T. (2014). Epífitas vasculares como bioindicadores de la calidad forestal: impacto antrópico sobre su diversidad y composición. In: González-Zuarth, C. A., Vallarino, A., Pérez-Jimenez, J. C., Low-Pfeng, A. M. (eds) Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental, Mexico City, Mexico: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), pp. 606-623. <https://www.uv.mx/personal/>

tkromer/files/2020/04/Kr%C3%B6mer-et-al.-2014_Bioindicadores-Cap-29.pdf

- Murashige, T. y Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Copenhagen. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Ortega-Larrocea, M. P., Martínez, A. y Chávez, V. M. (2009). Conservación y propagación de orquídeas. Biodiversidad del Ecosistema del Pedregal. México, Coordinación de la Investigación Científica/ Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel-Universidad Nacional Autónoma de México, 483-495. http://www.repsa.unam.mx/documentos/Ortega-Larrocea_et_al_2009_conservacion_y_propagacion.pdf
- Rodríguez, L., González, R., Díaz, A., Fajardo, E., Sánchez, E., Hernández, J., Castañeira, M., de la Cruz, G. y González, J. (2003). Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiata*. *Bioteología Vegetal*, 3(2), 119-121. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/236>
- Ruiz Sánchez, M. E. (2021). Micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 45-61. <https://doi.org/10.51252/raa.v1i1.99>
- Ruiz, B. C., Laguna, C. A., Iglesias, A. L. G., Damon, A., Marín, H. T. N. J., Azpíroz, R. H. S. y Moreno, M. J. L. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Phyton (Buenos Aires)*, 77, 203-215. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-56572008000100017&script=sci_abstract&tlng=es
- Salazar-Mercado, S. A. y Cancino, G. O. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Bioteología*, 14(1), 53-59. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000100006
- Salazar-Mercado, S. A. y Gélvez Manrique, J. D. (2015). Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas utilizando la prueba de Tetrazolio e Índigo Carmín. *Revista de Ciencias*, 19(2), 59-69. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-19352015000200004
- Salazar-Mercado, S. A., Amaya-Nieto, A. Z. y Barrientos-Rey, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Bioteología*, 15(2), 97-105. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41268>
- Santos-Pérez, U. I., Pedraza-Santos, M. E., Salgado-Garciglia, R., Martínez-Palacios, A., Chávez-Bárcenas, A. T. y González-Arno, M. T. (2019). Efectividad de métodos para desinfestar semillas de *Laelia autumnalis* para la conservación en nitrógeno líquido. *Nova scientia*, 11(23). <https://doi.org/10.21640/ns.v11i23.1855>
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M. A. A. y Trejo-Téllez, L. I. (2017). Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. Alternativa de aprovechamiento sustentable *ex situ*. *Agro Productividad*, 10(6), 37-45. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1037>