



## ORGANOGENESIS DIRECTA DE BROTES A PARTIR DE PLÁNTULAS DE *Rhynchoaelia glauca* (LINDLEY) SCHLECHTER GERMINADAS *in vitro*

### DIRECT SHOOT ORGANOGENESIS FROM *in vitro* GERMINATED SEEDLINGS OF *Rhynchoaelia glauca* (LINDLEY) SCHLECHTER

J. Manuel Téllez-Casas<sup>1</sup>, Ma. Cristina G. López-Peralta<sup>2\*</sup>, Eleodoro Hernández-Meneses<sup>3</sup> y Nicacio Cruz-Huerta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>2</sup>CP, Campus Montecillo, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>3</sup>Tecnológico Nacional de México, Campus de la Región Sierra, Teapa, Tabasco, México.

\*Autora de correspondencia (cristy@colpos.mx)

#### RESUMEN

*Rhynchoaelia glauca* (Lindley) Schlechter, incluida en la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), es una orquídea epífita mexicana de extraordinario potencial florícola y genético. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* brindan una alternativa viable para la preservación y multiplicación a gran escala de especies amenazadas. El propósito de esta investigación fue establecer un protocolo para la inducción de organogénesis directa de brotes a partir de plántulas germinadas *in vitro*. El proceso comenzó con la germinación de semillas provenientes de una cápsula madura y cerrada. La organogénesis se evaluó en medio MS 100 % con 6-benciladenina (BA, 1.0-3.0 mg L<sup>-1</sup>) y ácido 1-naftalenacético (ANA, 0.25 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>) con carbón activado (1.0 g L<sup>-1</sup>). En multiplicación, los brotes (1.5-2 cm) se cultivaron en medio MS (50 y 100 %) con BA (2.0-3.0 mg L<sup>-1</sup>) y ANA o ácido indolacético (AIA, 0.5 mg L<sup>-1</sup>) con carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>). En alargamiento se colocaron grupos de brotes en medio MS (50 y 100 %) con o sin carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>). Los ensayos se colocaron en un diseño experimental completamente al azar y se utilizó el análisis de varianza para analizar los datos. El mayor porcentaje de germinación (90.48 %) se obtuvo con medio MS 50 % sin reguladores de crecimiento. La mayor cantidad de brotes en inducción (2.48) y multiplicación (3.10) se consiguió con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de BA combinada con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, y 3.0 mg L<sup>-1</sup> de BA combinada con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA, respectivamente. La mayor longitud de brotes fue de 1.2 cm en medio MS 50 % adicionado con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. El conocimiento generado en esta investigación ofrece una alternativa de propagación para el uso sostenible de *Rhynchoaelia glauca* con el fin de contrarrestar su estatus de vulnerabilidad.

**Palabras clave:** *Rhynchoaelia glauca*, endémica, germinación *in vitro*, organogénesis.

#### SUMMARY

*Rhynchoaelia glauca* (Lindley) Schlechter, included in the CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) is a Mexican epiphytic orchid of extraordinary floricultural and genetic potential. *In vitro* plant tissue culture techniques provide a viable alternative for the preservation and large-scale multiplication of endangered species. The objective of this research was to establish a protocol for the induction of direct organogenesis of shoots from seedlings germinated *in vitro*. The process started with germination of seeds from a mature, closed capsule. Organogenesis was evaluated in 100 % MS medium with 6-benzyladenine (BA, 1.0-3.0 mg L<sup>-1</sup>) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA, 0.25 and 0.5 mg

L<sup>-1</sup>) with activated charcoal (1.0 g L<sup>-1</sup>). In multiplication, shoots (1.5-2 cm) were grown on MS medium (50 and 100 %) with BA (2.0-3.0 mg L<sup>-1</sup>) and NAA or indoleacetic acid (IAA, 0.5 mg L<sup>-1</sup>) with activated charcoal (0.5 g L<sup>-1</sup>). In elongation, groups of shoots were placed in MS medium (50 and 100 %) with or without activated charcoal (0.5 g L<sup>-1</sup>). The assays were placed in a completely randomized experimental design and analysis of variance was used to analyze the data. The highest percentage of germination (90.48 %) was obtained with MS medium 50 % without growth regulators. The highest number of shoots in induction (2.48) and multiplication (3.10) was achieved with 2.5 mg L<sup>-1</sup> of BA combined with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of NAA and 3.0 mg L<sup>-1</sup> of BA combined with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of IAA, respectively. The longest shoot length was 1.2 cm on MS medium 50 % added with 0.5 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal. The knowledge generated in this research offers an alternative of propagation for sustainable use of *Rhynchoaelia glauca* to counteract its vulnerability status.

**Index words:** *Rhynchoaelia glauca*, endemic, *in vitro* germination, organogenesis.

#### INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es la segunda familia más grande de plantas con flores (Fatahi *et al.*, 2023) y actualmente cuenta con más de 30,000 especies (Nongdam *et al.*, 2023) que se han diversificado con éxito en distintos hábitats de todo el mundo, pero la mayoría se concentran en áreas tropicales y subtropicales (Djordjević y Tsiftsis, 2022). Las orquídeas poseen características particulares muy especializadas que incluyen la estructura de sus flores y raíces, sus mecanismos de polinización y las interacciones ecológicas establecidas con otras plantas, insectos, hongos o bacterias (Castillo-Pérez *et al.*, 2019). Es uno de los grupos de plantas mejor conocidas en el mercado mundial de la floricultura (Hinsley *et al.*, 2018) y representan alrededor del 10 % del comercio internacional de flores (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2018).

En México existen más de 1200 especies de orquídeas (Otero-Colina *et al.*, 2021), de las cuales el 40 % son endémicas (Beltrán-Nambo *et al.*, 2018). En el estado

de Veracruz se reportan 432 especies de orquídeas, que corresponden al 36 % de la riqueza nacional, así como tres especies endémicas (Baltazar-Bernal *et al.*, 2023).

*Rhyncholaelia glauca* es una orquídea silvestre, epífita, de extraordinario valor ornamental, que se distribuye en los estados de Veracruz, Chiapas y Oaxaca, México; sin embargo, el saqueo y comercio ilegal, la alteración de su hábitat, así como la baja tasa de germinación en la naturaleza han provocado que hoy en día se encuentre catalogada como una especie amenazada en el Apéndice II (Anexos IA y B) de la CITES (Soto *et al.*, 2008).

Por otro lado, las comunidades locales tienen derecho a cosechar con fines culturales, pero todas las ventas requieren un permiso emitido por el gobierno (SEMARNAT, 2013); sin embargo, muy pocos vendedores tienen permisos; en este sentido, la aplicación de la ley es deficiente y hay crecientes preocupaciones de conservación (Ticktin *et al.*, 2020). Por tal motivo, es de vital importancia llevar a cabo acciones estratégicas que solucionen la dificultad asociada con el estado de vulnerabilidad de *Rhyncholaelia glauca*. Una alternativa son las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

La germinación *in vitro* de semillas de orquídeas permite la producción de plántulas rápida y a gran escala (Angheliescu *et al.*, 2023) de especies vegetales de importancia económica, ecológica, amenazadas o en vías de extinción; además, es una opción económicamente viable para la conservación eficiente de la biodiversidad y del acervo genético (Twaij *et al.*, 2020). Hasta la fecha, no existen reportes sobre la morfogénesis *in vitro* de esta especie. Con el propósito de coadyuvar a la preservación y empleo sostenible de esta orquídea de lento crecimiento, esta investigación tuvo como propósito establecer un protocolo para la organogénesis directa de brotes de *R. glauca* a partir de plántulas germinadas *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y desinfección

Cápsulas maduras cerradas proporcionadas por la unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre (UMA) "Vivero Gardenias", ubicada en Fortín de las Flores, Veracruz, México fueron lavadas con agua y jabón comercial (Roma®) durante 5 min y se enjuagaron con agua de la llave; posteriormente, fueron tratadas con etanol 70 % durante 1 min en la campana de flujo laminar y se enjuagaron con agua destilada; después, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl, Cloralex®) 30 % v/v, plata coloidal estable (Microdyn®) 1 % y Tween® 20 4 % por 15 min, se enjuagaron con agua

destilada esterilizada y finalmente se introdujeron en una solución de Captan® (4 g L<sup>-1</sup>) durante 15 min.

### Medio de cultivo y condiciones de incubación

En todos los experimentos se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 9 g L<sup>-1</sup> de agar (Merck®). El pH se ajustó en un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star, Waltham, Massachusetts, EUA) a 5.7 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) 1 N. El medio de cultivo se esterilizó durante 20 min a 121 °C en una autoclave vertical (AESAs® 300, Stolberg, Alemania). Los frascos conteniendo el explante se mantuvieron a 26 ± 2 °C y 16 h de fotoperiodo con intensidad lumínica de 45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### Germinación *in vitro*

Las semillas se extrajeron de las cápsulas desinfectadas y se establecieron en medio MS al 50 % de su concentración con 6-benciladenina (BA, 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>) combinada con ácido 1-naftalenacético (ANA, 0.1 y 0.2 mg L<sup>-1</sup>), un testigo sin reguladores de crecimiento y adicionado o no con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. Se vertieron 30 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 90 mL de capacidad. Al cabo de 10 semanas se cuantificó el porcentaje de germinación, inicio de germinación (dds) y término de germinación (dds). Para la identificación de las variables se consideró la descripción de estadios descritos y adaptados de acuerdo con Vasudevan y Staden (2010). El porcentaje de germinación se calculó marcando cuatro zonas distribuidas al azar en el frasco de cultivo y en cada zona se contabilizaron 50 semillas, luego se dividió el número de semillas germinadas entre el total de semillas contabilizadas. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones y se consideró como unidad experimental un frasco con 200 semillas sembradas.

### Organogénesis directa

#### Inducción de brotes

Se sembraron plántulas germinadas *in vitro* de 1-2 cm de altura en medio de cultivo MS adicionado con BA (1.0, 2.0, 2.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>) combinado con ANA (0.25 y 0.50 mg L<sup>-1</sup>). Todos los tratamientos fueron adicionados con carbón activado (1.0 g L<sup>-1</sup>). Se vertieron 15 mL del medio de cultivo en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad. Se llevó a cabo un subcultivo a medio fresco con los mismos tratamientos a las cinco semanas. Al cabo de 10 semanas de cultivo, se registró el número de brotes por explante (BE), longitud de brotes (LB) en cm y porcentaje de brotación

(%). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 17 repeticiones, y como unidad experimental un frasco con dos plántulas.

### Multiplicación de brotes

Se cultivaron brotes de 1.5 a 2 cm de longitud en medio MS (50 y 100 %) con BA (2.0, 2.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>) en combinación con ANA o AIA (0.5 mg L<sup>-1</sup>). Todos los tratamientos fueron adicionados con carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>). Se vertieron 15 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad y se procedió a hacer un subcultivo a medio fresco con los mismos tratamientos a las cinco semanas. Al cabo de diez semanas de cultivo, se registró el número de brotes por explante (BE), longitud de brotes (LB) en cm y porcentaje de brotación (%). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones, y como unidad experimental un frasco con dos plántulas.

### Alargamiento de brotes

Se transfirieron grupos de brotes de 1 cm en medio MS (50 y 100 %) adicionado o no con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. Se vertieron 30 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 90 mL de capacidad y se realizó un subcultivo a medio fresco con los mismos tratamientos a las cinco semanas. Luego de 10 semanas se registró la longitud de brotes (LB) en cm y el número de brotes por explante (BE). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones, y como unidad experimental un frasco con tres grupos de brotes.

### Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se calculó el valor medio y la desviación estándar (D.E.). Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se realizó análisis de varianza y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el software SAS versión 9.3 (SAS Institute, 2013). Previo al análisis, los valores de porcentaje se transformaron mediante la raíz cuadrada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Desinfección y germinación *in vitro*

La desinfección superficial de cápsulas cerradas de *R. glauca* resultó exitosa al obtener un cultivo 100 % aséptico. El porcentaje de germinación más alto (90.48 %) se obtuvo en medio MS con 50 % de concentración de sales, sin reguladores de crecimiento, después de 10 semanas de cultivo (Cuadro 1).

Las semillas de orquídeas pueden germinar en un medio basal con una baja concentración de sales sin reguladores de crecimiento, como se demostró para *R. glauca*. Así también, para las especies *Acianthera prolifera*, *Laelia rubescens* (Koene *et al.*, 2019; Mayo-Mosqueda *et al.*, 2020) y el híbrido intergenérico *Vanda stangea* × *P. hygrophila* (Devi *et al.*, 2023), donde el medio MS con 50 % de concentración de sales sin reguladores de crecimiento produjo un porcentaje de germinación de 74, 85.2 y 80 %, respectivamente.

La germinación comenzó a los 10 días después de la siembra y finalizó a los 30 días con la formación del embrión. A la décima semana se observó alargamiento del protocormo, con presencia de primordio foliar y rizoides (Figura 1A).

El tiempo requerido para la germinación de semillas de orquídeas es variable entre las especies. En este estudio se obtuvieron plántulas de *R. glauca* de 2 cm de longitud con tres a cuatro hojas y raíces a las 25 semanas después de la siembra (Figura 1B). Por otra parte, se ha reportado que para *Dendrobium strebloceras* se logró el desarrollo de plántulas a las 24 semanas de siembra (Diantina *et al.*, 2020) y para *Sedirea japonica* se logró el desarrollo de plántulas a las 28 semanas después de la siembra (An *et al.*, 2021).

### Inducción de brotes

Se observó brotación en la totalidad de los tratamientos. El máximo número de brotes por explante (2.48) se registró en medio MS con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA a las 10 semanas de cultivo (Figura 1C), comparado con el medio MS sin reguladores de crecimiento (testigo) que produjo 1.01 brotes (Figura 1D). En cuanto a la longitud de brotes no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Los brotes con una coloración verde claro comenzaron a formarse en la base de los explantes. Después de cinco semanas de cultivo se observaron brotes con primordio foliar. A la décima semana de cultivo los brotes presentaron de dos a tres hojas formadas de color verde intenso y longitud máxima de 0.37 cm.

Se ha reportado que el equilibrio de citocinina y auxina desempeña un papel importante en la inducción de brotes *in vitro* en orquídeas. En *Cyrtopodium paludicolum* se obtuvieron 5.24 brotes por explante con BA y ANA, ambos a la concentración de 0.51 mg L<sup>-1</sup> (Ferreira *et al.*, 2022). En *Cattleya maxima* se consiguieron 1.8 brotes por explante con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Vilcherrez-Atoche *et al.*, 2020) y en *Catasetum macrocarpum* se alcanzaron

**Cuadro 1. Germinación *in vitro* (%) de semillas de *Rhyncholaelia glauca* inducida con 6-benciladenina (BA), ácido 1-naftalenacético (ANA) y carbón activado (CA) a las 10 semanas de cultivo.**

Adicionados al medio de cultivo			Germinación (%)	D.E.
BA (mg L <sup>-1</sup> )	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	CA (g L <sup>-1</sup> )		
0.0	0.0	0.0	90.48 a	2.25
0.5	0.0	0.0	8.72 i	2.48
0.5	0.1	0.0	11.37 hi	3.86
0.5	0.2	0.0	31.41 f	6.91
1.0	0.0	0.0	13.57 ghi	3.64
1.0	0.1	0.0	24.57 fg	2.95
1.0	0.2	0.0	21.12 efgh	4.99
0.0	0.0	0.5	89.90 a	5.58
0.5	0.0	0.5	64.20 cd	2.35
0.5	0.1	0.5	55.45 e	6.50
0.5	0.2	0.5	69.50 bc	6.45
1.0	0.0	0.5	60.00 cde	8.21
1.0	0.1	0.5	52.50 e	16.92
1.0	0.2	0.5	78.50 b	11.89

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). BA: 6-bencil adenina, ANA: ácido naftalenacético, CA: carbón activado, D.E.: desviación estándar.

**Cuadro 2. Porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE), longitud de brotes (LB) e inducidos en plántulas de *Rhyncholaelia glauca* con 6-benciladenina (BA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) a las 10 semanas de cultivo.**

Adicionados al medio		B (%)	D.E.	BE (Núm.)	D.E.	LB (cm)	D.E.
BA (mg L <sup>-1</sup> )	ANA (mg L <sup>-1</sup> )						
0.0	0.0	38.87 c	6.85	1.01 b	0.27	0.36 a	0.04
1.0	0.25	64.77 ab	11.0	2.24 b	0.65	0.34 a	0.005
1.0	0.50	49.99 bc	7.20	1.59 b	0.21	0.35 a	0.01
2.0	0.25	57.08 ab	3.40	1.70 b	0.38	0.37 a	0.02
2.0	0.50	58.82 ab	6.35	1.77 b	0.41	0.37 a	0.01
2.5	0.25	53.39 bc	3.98	1.56 b	0.43	0.35 a	0.01
2.5	0.50	71.17 a	7.76	2.48 a	0.77	0.34 a	0.01
3.0	0.25	54.90 abc	7.96	2.02 b	0.90	0.37 a	0.01
3.0	0.50	63.86 ab	9.09	1.74 b	0.22	0.37 a	0.02

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). BA: 6-bencil adenina, ANA: ácido naftalenacético, D.E.: desviación estándar.



Figura 1. Germinación *in vitro* y organogénesis directa de *Rhyncholaelia glauca*. A) etapas de la germinación durante 10 semanas, B) plántulas *in vitro* empleadas como explantes para la organogénesis, C) inducción de brotes con  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA a las 10 semanas, D) inducción de brotes en medio MS sin reguladores de crecimiento (testigo) a las 10 semanas, E) multiplicación de brotes con  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA a las 10 semanas, F) multiplicación de brotes con medio MS al 50 % sin reguladores de crecimiento a las 10 semanas, G) crecimiento de brotes en medio MS al 50 % con  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de carbón activado después de 10 semanas, H) crecimiento de brotes en medio MS completo sin carbón activado después de 10 semanas.

4.1 brotes por explante con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (Ferreira *et al.*, 2018); sin embargo, los resultados de esta investigación y la amplia evidencia en la literatura demuestran que los efectos promotores del crecimiento de los reguladores de crecimiento vegetal son específicos para cada especie e híbrido.

#### Multiplicación de brotes

Los tratamientos evaluados favorecieron distintas tasas de brotación (Cuadro 3). El mayor número de brotes por explante fue de 3.1 con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA en medio MS completo a las 10 semanas (Figura 1E),

en contraste con el medio MS al 50 % sin reguladores de crecimiento que produjo 0.70 brotes (Figura 1F). La mayor longitud de brote fue de 0.46 cm con  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA en medio MS completo. Se observó la formación de brotes en la base del explante a la tercera semana de cultivo.

Aunque no existen reportes anteriores sobre la multiplicación *in vitro* en *Rhyncholaelia glauca*, diversos estudios han demostrado el efecto significativo de las proporciones de citocinina y auxina para promover la formación de brotes múltiples en orquídeas. Subrahmanyeswari *et al.* (2022) lograron 12 brotes por

**Cuadro 3. Porcentaje de brotación (B), número de brotes por explante (BE) y longitud de brotes (LB) inducidos en plántulas de *Rhyncholelia glauca* con concentraciones del medio MS, 6-benciladenina (BA), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) a las 10 semanas de cultivo.**

Adicionados al medio de cultivo				B (%)	D.E.	BE (Núm.)	D.E.	LB (cm)	D.E.
MS (%)	BA (mg L <sup>-1</sup> )	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	AIA (mg L <sup>-1</sup> )						
50	0.0	0.0	0.0	23.3 d	7.67	0.70 e	0.48	0.39 b	0.03
50	2.0	0.5	0.0	29.9 cd	7.53	1.20 cde	0.63	0.41 ab	0.06
50	2.0	0.0	0.5	36.6 cd	10.53	1.50 cde	0.52	0.39 ab	0.07
50	2.5	0.5	0.0	33.3 cd	7.48	1.40 cde	0.51	0.38 ab	0.04
50	2.5	0.0	0.5	39.9 bcd	16.66	1.60 cde	0.84	0.33 ab	0.05
50	3.0	0.5	0.0	29.9 cd	7.53	1.30 cde	0.67	0.40 ab	0.06
50	3.0	0.0	0.5	40.3 bcd	17.56	1.90 bcd	0.87	0.41 ab	0.07
100	0.0	0.0	0.0	26.6 d	7.59	0.90 de	0.56	0.45 ab	0.05
100	2.0	0.5	0.0	36.6 cd	10.53	1.60 bcde	0.69	0.45 a	0.05
100	2.0	0.0	0.5	49.9 bcd	17.50	2.10 abc	0.73	0.43 ab	0.04
100	2.5	0.5	0.0	36.6 bcd	14.05	1.70 bcde	0.67	0.41 ab	0.07
100	2.5	0.0	0.5	59.9 ab	14.02	2.60 ab	0.51	0.46 a	0.05
100	3.0	0.5	0.0	36.6 cd	10.53	1.90 bcd	0.73	0.40 ab	0.06
100	3.0	0.0	0.5	73.3 a	14.00	3.10 a	0.57	0.43 ab	0.07

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). MS: medio Murashigue y Skoog, BA: 6-bencil adenina, ANA: ácido naftalenacético, AIA: ácido indolacético, D.E.: desviación estándar.

explante en la multiplicación de brotes en *Dendrobium Yuki White* con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. En *Oeceoclades maculata*, Viana *et al.* (2022) obtuvieron un máximo de 0.87 brotes por explante con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, y en *Dendrobium moniliforme* la dosis de 1 mg L<sup>-1</sup> de BA y ANA produjo el mayor coeficiente de proliferación de brotes (6.1) (Liu *et al.*, 2023).

La concentración adecuada de citocinina y auxina para estimular la brotación difiere en cada especie, ya que las respuestas dependen de muchos factores, como la especie, el tejido u órgano usado y el estado fisiológico del explante (Purwanto *et al.*, 2023).

El medio MS completo produjo el mayor número de brotes en *Rhyncholelia glauca*, lo que concuerda con lo reportado por Mora-Cruz *et al.* (2023) donde el medio MS completo favoreció el número de brotes por explante (2.03), a diferencia del medio MS al 50 % en *Prosthechea vitellina*. Esto podría explicarse porque el medio MS al 100 % posee una composición que ya contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas en comparación con la reducción de nutrientes del medio MS al 50 % (Turang *et al.*, 2023).

### Alargamiento de brotes

La máxima longitud de brotes fue de 1.20 cm en medio MS al 50 % de sales con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de carbón activado a las 10 semanas (Figura 1G, Cuadro 4) comparado con el MS completo sin carbón activado (Figura 1H). La mayor cantidad de brotes por explante (1.6) se obtuvo en medio MS completo con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de carbón activado.

El carbón activado es empleado en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para mejorar el desarrollo celular, ya que desempeña un papel crucial en la adsorción de toxinas o compuestos inhibidores en los medios de cultivo, promoviendo una mayor elongación y enraizamiento; sin embargo, la concentración debe adaptarse a diferentes especies de plantas (Navarro *et al.*, 2023).

Se han publicado diversos estudios en otras especies de orquídeas, donde se ha evaluado el efecto de la concentración del medio MS y la adición de carbón activado. En el caso de *Encyclia cordigera*, Baltazar-Bernal *et al.* (2022) reportaron que con el medio MS al 25 % adicionado con carbón activado (1.5 g L<sup>-1</sup>) se obtuvo

**Cuadro 4. Longitud de brotes (LB) y número de brotes por explante (BE) en *Rhyncholelia glauca* a las 10 semanas de cultivo en dos concentraciones de MS y CA.**

MS (%)	CA (g L <sup>-1</sup> )	LB (cm)	D.E.	BE (Núm.)	D.E.
100	0.0	0.85 b	0.02	1.40 ab	0.51
100	0.5	0.88 b	0.08	1.60 a	0.52
50	0.0	0.90 b	0.09	0.80 b	0.42
50	0.5	1.20 a	0.22	1.10 ab	0.56

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). MS: medio Murashigue y Skoog, CA: carbón activado, DE: desviación estándar.

la mayor longitud de plántula (1.53 cm); y para *Cattleya warneri*, el medio MS al 50 % adicionado con carbón activado (3 g L<sup>-1</sup>) produjo mejores respuestas en la fase de elongación y enraizamiento (Navarro *et al.*, 2023).

Los resultados de esta investigación demostraron que el medio MS al 50 % no limita el crecimiento de brotes de *R. glauca*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Flores-Hernández *et al.* (2017), donde el medio MS al 50 % promovió la mayor longitud de brote en comparación con el medio MS al 100 %, y por Frausto *et al.* (2019), donde el medio MS al 50 % mejoró la viabilidad y supervivencia de explantes de vara floral en *Phalaenopsis* en comparación con el medio MS al 100 %. Es importante destacar que, aunque el medio MS al 100 % es un medio muy completo, contiene una alta cantidad de sales que pueden provocar efectos negativos en ciertas especies que requieren concentraciones de iones más bajas. Las orquídeas tienen un bajo requerimiento mineral, ya que han evolucionado en algunos aspectos que les ayudan a sobrevivir en medios con poca disponibilidad de agua y nutrientes (Frausto *et al.*, 2019); por lo tanto, usar la composición adecuada del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) puede aumentar el crecimiento de las plantas (Turang *et al.*, 2023).

### CONCLUSIONES

La mayor respuesta de germinación *in vitro* de semillas de *R. glauca* se obtuvo sin la adición de reguladores de crecimiento vegetal. Se lograron plántulas de 2 cm de longitud para ser utilizadas como explantes entre las 24 y 30 semanas después de la siembra. Se desarrolló un protocolo eficiente para la inducción de organogénesis directa a partir de plántulas germinadas *in vitro*, en el que el número más alto de brotes se consiguió con 3 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA. El mayor alargamiento de plántulas se logró con la mitad de la concentración de sales MS y 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. Esta investigación sienta las bases para la propagación, preservación y uso sostenible de esta especie de lento crecimiento con el fin de mitigar su estatus de vulnerabilidad.

### AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por el uso de las instalaciones. Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (CONAHCyT) por la beca (766356) otorgada al primer autor para llevar a cabo estudios de posgrado.

### BIBLIOGRAFÍA

- An J., P. B. Kim, H. B. Park, S. Kim, H. J. Park, C. W. Lee, ... and J. E. Hwang (2021) Effects of different growth media on *in vitro* seedling development of an endangered orchid species *Sedirea japonica*. *Plants* 10:1193, <https://doi.org/10.3390/plants10061193>
- Anghelescu N. E., Y. Vafae, K. Ahmadzadeh and J. T. Chen (2023) Asymbiotic seed germination in terrestrial orchids: problems, progress, and prospects. *In: Advances in Orchid Biology, Biotechnology and Omics*. P. Tiwari and J. T. Chen (eds.). Springer. Singapore. pp:221-260, [https://doi.org/10.1007/978-981-99-1079-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-99-1079-3_8)
- Baltazar-Bernal O., V. M. De la Cruz-Martínez, A. Hernández-García and J. Zavala-Ruiz (2023) An exploratory study of Orchidaceae species fruits in the central zone of Veracruz state, Mexico. *Agrociencia* 57:981-1007, <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2860>
- Baltazar-Bernal O., V. M. De la Cruz-Martínez, M. A. Ramírez-Mosqueda and J. Zavala-Ruiz (2022) *In vitro* seed germination and acclimatization of *Encyclia cordigera* (Kunth) Dressler. *South African Journal of Botany* 151 Part A:578-582, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.031>
- Beltrán-Nambo M. A., M. Martínez-Trujillo, J. C. Montero-Castro, R. Salgado-Garciglia, J. T. Otero-Ospina and Y. Carreón-Abud (2018) Fungal diversity in the roots of four epiphytic orchids endemic to Southwest Mexico is related to the breadth of plant distribution. *Rhizosphere* 7:49-56, <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.07.001>
- Castillo-Pérez L. J., D. Martínez-Soto, J. J. Maldonado-Miranda, A. J. Alonso-Castro and C. Carranza-Álvarez (2019) The endemic orchids of Mexico: a review. *Biología* 74:1-13, <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>
- Devi K. S., R. Sanabam, N. S. Singh, E. J. Devi and H. S. Devi (2023) Intergeneric hybridization of two endangered orchids, *Vanda stangeana* and *Phalaenopsis hygrophila*, and molecular confirmation of hybridity using SSR and SCoT markers. *South African Journal of Botany* 161:140-150, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.07.048>
- Diantina S., S. Kartikaningrum, A. Clavijo McCormick, J. Millner, C. McGill, H. W. Pritchard and J. Nadarajan (2020) Comparative *in vitro* seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 143:619-633, <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01947-7>
- Djordjević V. and S. Tsiftsis (2022) The role of ecological factors in distribution and abundance of terrestrial orchids: *In: Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture*. J. M. Merillon and H.

- Kodja (eds.). Springer. Cham, Switzerland. pp:3-72, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38392-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38392-3_4)
- Fatahi M., N. E. Anghelescu, Y. Vafaee and A. Khoddamzadeh (2023) Micropropagation of *Dactylorhiza umbrosa* (Kar. & Kir.) Nevski through asymbiotic seed germination and somatic embryogenesis: a promising tool for conservation of rare terrestrial orchids. *South African Journal of Botany* 159:492-506, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.06.036>
- Ferreira W. M., S. P. de Oliveira, R. M. Suzuki, K. L. F. Silva and J. W. P. Soares Júnior (2018) Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. *Rodriguésia* 69:2137-2151, <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869442>
- Ferreira W. M., A. M. de Oliveira, J. C. Viana, R. M. Suzuki and J. R. G. de Oliveira (2022) Asymbiotic germination, initial development *in vitro* and acclimatization of *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, a Brazilian savanna orchid species. *Rodriguésia* 73:e01272020, <https://doi.org/10.1590/2175-7860202273043>
- Flores-Hernández L. A., A. Robledo-Paz and M. J. Jimarez-Montiel (2017) Culture medium and agar substitutes for *in vitro* growth of orchids. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:1315-1328, <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i6.297>
- Frausto J. K. A., M. C. Ojeda Z., O. G. Alvarado G., E. A. García Za., H. Rodríguez F. and G. Rodríguez P. (2019) Outbreak induction from floral stem orchid *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10:1207-1218, <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.608>
- Hinsley A., H. J. de Boer, M. F. Fay, S. W. Gale, L. M. Gardiner, R. S. Gunasekara, ... and J. Phelps (2018) A review of the trade in orchids, and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186:435-455, <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box083>
- Koene F. M., É. Amano and L. L. F. Ribas (2019) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany* 121:83-91, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.019>
- Liu X., L. Sun, T. Nie, Y. Chen and Z. Yin (2023) *In vitro* rapid propagation technology system of *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw., a threatened orchid species in China. *Plant Biotechnology Reports* 17:369-378, <https://doi.org/10.1007/s11816-023-00838-5>
- Mayo-Mosqueda A., L. F. Maceda-López, S. B. Andrade-Canto, E. Noguera-Savelli, H. Caamal-Velázquez, J. S. Cano-Sosa and F. Alatorre-Cobos (2020) Efficient protocol for *in vitro* propagation of *Laelia rubescens* Lindl. from asymbiotic seed germination. *South African Journal of Botany* 133:264-272, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.030>
- Mora-Cruz Y., M. C. G. López-Peralta, E. Hernández-Meneses and N. Cruz-Huerta (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>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Navarro Q. R., D. O. Corrêa, A. Behling, M. D. Nosedá and L. L. F. Ribas (2023) Effect of microalga *Desmodesmus subspicatus* and plant growth regulators on the *in vitro* propagation of *Cattleya warneri*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 153:77-89, <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02442-x>
- Nongdam P., D. G. Beleski, L. Tikendra, A. Dey, V. Varte, S. El Merzougui, ... and W. A. Vendrame (2023) Orchid micropropagation using conventional semi-solid and temporary immersion systems: a review. *Plants* 12:1136, <https://doi.org/10.3390/plants12051136>
- Otero-Colina G., P. L. Ramos-González, C. Chabi-Jesus, J. Freitas-Astúa, A. D. Tassi and E. W. Kitajima (2021) First detection of orchid fleck virus in orchids in Mexico. *VirusDisease* 32:167-172, <https://doi.org/10.1007/s13337-021-00676-5>
- Purwanto E., R. B. Arniputri, G. C. Handoyo, A. Yunus, Samanhudi, D. Purnomo, ... and F. Brimantara (2023) *In vitro* growth of *Dendrobium stratiotes* on various medium and growth regulator. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 1165:012019, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1165/1/012019>
- SAS Institute (2011) SAS/STAT® 9.3 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA. 8621 p.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2013) Ley general de vida silvestre. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México. 30 de diciembre de 2010.
- Soto A. M. A., R. Solano G., E. Hagsater, R. Jiménez M., V. Sosa and G. A. Salazar C. (2008) Icones Orchidacearum. Fascicle 10. In: Orchids of México Part 4. E. Hagsater and M. Soto (eds.). Instituto Chinoín. México D. F. 240 p.
- Subrahmanyeswari T., S. K. Verma and S. Gantait (2022) One-step *in vitro* protocol for clonal propagation of *Dendrobium Yuki* White, a high value ornamental orchid hybrid. *South African Journal of Botany* 146:883-888, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.036>
- Tejeda-Sartorius O., L. I. Trejo-Téllez, Y. Ríos-Barreto and J. L. Rodríguez-de la O (2018) Mineral fertilization and biofertilization in physiological parameters of the orchid *Laelia anceps* subsp. *anceps*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 24:181-190, <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.07.027>
- Ticktin T., D. Mondragón, L. Lopez Toledo, D. Dutra Elliott, E. Aguirre León and M. Hernández Apolinar (2020) Synthesis of wild orchid trade and demography provides new insight on conservation strategies. *Conservation Letters* 13:e12697, <https://doi.org/10.1111/conl.12697>
- Turang V. M., W. Tilaar, J. Pongoh, S. D. Runtunuwu, S. M. T. Tulung and Y. Pamandungan (2023) Effect of combination of MS media and growth regulator BAP on growth and development of *Dendrobium mirbelianum* Gaudich. orchid shoots *in vitro*. *Applied Agroecotechnology Journal* 4:352-360, <https://doi.org/10.35791/jat.v4i2.49386>
- Twajj B. M., Z. H. Jazar and M. N. Hasan (2020) Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. *International Journal of Plant Biology* 11:8385, <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8385>
- Vasudevan R. and J. Van Staden (2010) *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae* 123:496-504, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.010>
- Viana J. C., P. R. A. Cerqueira, L. R. Alves, F. C. L. Arrais, R. M. Suzuki and W. M. Ferreira (2022) Germination and initial development *in vitro*, and acclimatization of *Oeceoclades maculata* (Orchidaceae), aiming at its reintroduction in natural environments. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 44:e59497, <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v44i1.59497>
- Vilcherrez-Atoche J. A., C. Rojas-Idrogo and G. E. Delgado-Paredes (2020) Micropropagation of *Cattleya maxima* J. Lindley in culture medium with banana flour and coconut water. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 10:179-193.