

Evaluación de viabilidad y factibilidad de germinación de semillas de *Dendrobium nobile* Lindl. almacenadas a temperatura ambiente sin secado previo

Evaluation of the viability and germination feasibility of *Dendrobium nobile* Lindl. seeds stored at room temperature without pre-drying

Báez Marcela Agustina*, Küppers Guillermo**, García Daily***, Duarte Evelyn Raquel****a

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v26n1.107668

RESUMEN

Dendrobium nobile Lindl. es una especie de orquídea epífita nativa de China de importancia ornamental y medicinal en el mundo, que se encuentra en peligro de extinción por efectos antropogénicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad y factibilidad de la germinación *in vitro* de semillas de *D. nobile* almacenadas en sobres de papel durante 120 días a temperatura ambiente sin previo secado. Para ello, se cosecharon frutos previos a la dehiscencia, se extrajeron las semillas y se cultivaron *in vitro* bajo condiciones de asepsia. Posteriormente se analizó la viabilidad y la germinación cada 30 días de almacenamiento. Los resultados mostraron que las semillas de esta especie mantienen altos porcentajes de viabilidad (84,61 – 90,97 %) y germinación (78,83 – 83,91%) durante 90 días, pero a partir de los 120 días disminuye notablemente hasta un 33,61% de viabilidad y un 27,93% de germinación. En conclusión, si no se produce un secado previo al almacenamiento, las semillas de *D. nobile* empiezan a perder su viabilidad y su potencial de germinación a partir de los 120 días.

Palabras claves: Cultivo *in vitro*, germinación, medicinal, orquídea, viabilidad.

ABSTRACT

Dendrobium nobile Lindl. is a species of epiphytic orchid native to China with ornamental and medicinal importance in the world, which is in danger of extinction due to anthropogenic effects. The aim of this work was to evaluate the viability and feasibility of *in vitro* germination of *D. nobile* seeds stored in paper envelopes for 120 days at room temperature without prior drying. For this purpose, fruits were harvested prior to dehiscence, seeds were extracted and cultured *in vitro* under aseptic conditions. Subsequently, viability and germination were analysed every 30 days of storage. The results showed that the seeds of this species maintained high percentages of viability (84.61 - 90.97 %) and germination (78.83 - 83.91 %) for 90 days, but after 120 days the viability decreased significantly to 33.61 % and the germination in 27.93 %. In conclusion, without drying prior to storage, *D. nobile* seeds start to lose their viability and germination potential after 120 days.

Keywords: *in vitro* culture, germination, medicinal, orchid, viability

Recibido: Julio 3 de 2023 **Aprobado:** Abril 20 de 2024

* Alumna del Profesorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Forestales – Universidad Nacional de Misiones. Bertoni 124, Eldorado, Misiones, Argentina. E-mail agustina20baez@gmail.com; Orcid: <https://orcid.org/0009-0000-3908-5177>

** Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales – Universidad Nacional de Misiones. Bertoni 124, Eldorado, Misiones, Argentina. E-mail guillermokuppers@gmail.com; Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0865-3818>

*** Ingeniera Forestal. Facultad de Ciencias Forestales – Universidad Nacional de Misiones. Bertoni 124, Eldorado, Misiones, Argentina. E-mail: daily.garcia@fcf.unam.edu.ar; Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8669-858X>

**** Doctora en Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Forestales – Universidad Nacional de Misiones. Bertoni 124, Eldorado, Misiones, Argentina. E-mail evelyn.duarte@fcf.unam.edu.ar; Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3331-4447>

^a Autor de correspondencia

INTRODUCCIÓN

Dendrobium es uno de los géneros de la familia Orchidaceae con mayor cantidad de especies, pero varias de ellas están en peligro de extinción por efectos antropogénicos en los hábitats naturales y por sobreexplotación comercial (Teixeira da Silva *et al.*, 2015a). Entre estas especies se encuentra *Dendrobium nobile* Lindl., que es una especie epífita nativa de China, Vietnam, Nepal, Laos, Tailandia, India y Myanmar (Rokaya *et al.*, 2013), la cual es principalmente utilizada como ornamental (Adhikari *et al.*, 2021). Además, se ha demostrado que contiene varios componentes bioactivos del tipo de los polisacáridos y alcaloides, que tienen propiedades farmacológicas que actúan como antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y sobre la regulación inmunitaria (Fu *et al.*, 2023).

Una estrategia importante en la conservación de las plantas es el almacenamiento de sus semillas, porque permite preservar el recurso fitogenético a largo plazo. A su vez, las orquídeas desarrollan grandes cantidades de semillas de pequeño tamaño, lo que les permite su conservación en espacios reducidos (Seaton *et al.*, 2013; Udomdee *et al.*, 2014). Sin embargo, es importante considerar el grado de maduración de las semillas, ya que de esto depende el contenido de humedad que contengan a la hora de almacenar (Schwallier *et al.*, 2011).

Conjuntamente con el almacenamiento de las semillas, existen otras técnicas modernas como el cultivo de tejidos *in vitro*, que ha demostrado ser altamente efectivo en la conservación y germinación de semillas de orquídeas, debido a que permite la propagación de germoplasma valioso, manteniendo la diversidad genética, además de multiplicar una enorme cantidad de plantas a partir de un número limitado de material vegetal (Teixeira da Silva *et al.*, 2015a; Teixeira da Silva *et al.*, 2015b; Franceschi *et al.*, 2019; Guarín *et al.*, 2022). Esta herramienta además de permitir la conservación, contribuye con la obtención de un gran número de plantas para fines comerciales y corroborar el vigor de las semillas almacenadas (Udomdee *et al.*, 2014; Franceschi *et al.*, 2019).

Previo al cultivo de las semillas almacenadas, es fundamental el uso del cloruro trifenil tetrazolio, para conocer el grado de viabilidad y de esta manera determinar la factibilidad de obtener plantas a través de la germinación (Seaton *et al.*, 2013).

Las semillas de *D. nobile* si bien muestran un comportamiento ortodoxo, cuando la humedad disminuye por debajo del 5% y son almacenadas a una temperatura de

-20°C a 25°C, la viabilidad de las semillas no supera los 6 meses (Seaton *et al.*, 2013; Udomdee *et al.*, 2014), por lo que, sin previo secado de las semillas, se desconoce cuál es la longevidad de estas a temperatura ambiente.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la viabilidad y factibilidad de la germinación *in vitro* de semillas de *D. nobile* almacenadas en sobres de papel durante 120 días a temperatura ambiente sin previo secado con inspecciones cada 30 días. La hipótesis fue que la viabilidad y germinación de las semillas de *D. nobile* almacenadas sin previo secado disminuye rápidamente. Una vez que se produce la dehiscencia de la cápsula, las semillas bajo condiciones ambientales, pierden su vigor a partir de los 120 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de propagación vegetativa de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones ubicado en la ciudad de Eldorado (Misiones - Argentina). El clima de la ciudad de Eldorado es subtropical húmedo sin estación seca y veranos con altas temperaturas, es decir prácticamente no se presenta deficiencia de agua, pero si temperaturas elevadas en los meses (diciembre, enero, febrero y marzo) de verano (Barth *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

La precipitación media mensual en Eldorado es de 110 mm y los meses de mayor lluvia son los meses de abril y octubre, en tanto los menos lluviosos son julio y agosto, aunque se pueden presentar periodos extremos con precipitaciones inferiores a 3 mm y hasta 600 mm en promedio mensual. En cuanto a las temperaturas medias mensuales los valores oscilan entre 14,4°C en julio (considerado el mes más frío) a 25,4°C en enero (mes más cálido). En ocasiones, las temperaturas extremas registradas en Eldorado adquieren valores de -7°C a 40°C y el periodo de heladas es de mayo a septiembre (Silva *et al.*, 2008).

Material vegetal: Cosecha y desinfección de semillas

Se cosecharon cápsulas maduras de *D. nobile*, obtenidas de polinización libre o natural previo a la dehiscencia, en el mes de mayo del año 2021.

Para desinfectar las semillas se procedió a colocarlas dentro de sobres de papel filtro, posteriormente se lavaron con etanol al 70 % por un minuto, después con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,2 % durante 5 minutos y enjuagadas con agua destilada estéril cinco veces por un minuto.

Análisis de viabilidad

Para evaluar la viabilidad de las semillas, se empleó el test topográfico de tetrazolio, el cual consistió en colocar una muestra de 5 mg de semillas en un sobre de papel absorbente y se humedeció en agua destilada durante 24 horas, luego se sumergieron en una solución de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 0,5 % y se incubaron en oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se procedió a enjuagar los sobres que contenían las semillas con agua corriente hasta eliminar la solución de tetrazolio, se abrieron y se realizaron muestras sobre un portaobjetos. Con un microscopio binocular digital Wincom modelo NLCD-307 se tomaron fotografías de las muestras de semillas y sobre estas se realizó la obtención de los datos para calcular la viabilidad. Este procedimiento fue utilizado previo al proceso de desinfección de las semillas al realizar los diferentes cultivos.

Se consideró como semillas viables aquellas que presentaron una coloración rojo oscuro; como no viables las que tenían el embrión sin tinción y vanas aquellas que no contenían embrión. Para el cálculo del porcentaje de viabilidad se empleó la metodología descrita por Duarte *et al.* (2017), que consiste en emplear las siguientes fórmulas.

1- Porcentaje de semillas viables = (número de semillas viables / Total de semillas (viables + no viables + vanas)) * 100

2- Porcentaje de semillas no viables = (número de semillas no viables / Total de semillas ((Viables + no viables + vanas)) * 100

3- Porcentaje de semillas vanas = (número de semillas vanas / Total de semillas ((Viables + no viables + vanas)) * 100

Cultivo *in vitro* de las semillas

Finalizada la desinfección de las semillas, para el cultivo se abrieron los sobres de papel con una tijera esterilizada en autoclave a una atmosfera durante 20 minutos y

con la ayuda de una pinza se esparció las semillas sobre 25 ml de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) a una concentración del 50 % (1/2 de macro, micronutrientes y vitaminas), adicionado con 20 g.L⁻¹ de sacarosa, 2 g.L⁻¹ de carbón activado y 6 g.L⁻¹ de agar dentro de frascos de 100 ml de capacidad. Las semillas restantes fueron almacenadas sin ningún tratamiento de secado en sobre de papel en una habitación a temperatura ambiente (entre 15 y 23°C) y una humedad relativa promedio del 50 %, durante los 4 meses de duración del experimento (de junio a octubre del 2021). Una vez realizado el cultivo, los frascos fueron incubados en cámara de crecimiento a temperatura $27 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta la germinación y formación de planta. Para determinar el porcentaje de germinación, cuando se observó la presencia de protocormos (Aguilar- Morales *et al.*, 2016) sobre toda la superficie de medio, se realizaron microfotografías de los cultivos con una lupa Motic DM 39C. A continuación, sobre estas imágenes se procedieron a realizar los conteos de las semillas que germinaron, del total de las semillas presentes en la muestra y posteriormente se determinaron los porcentajes de germinación según la metodología propuesta por Duarte *et al.*, (2022).

Diseño y análisis estadístico

El experimento fue llevado a cabo con un diseño completamente al azar, constituido por tres frascos de cultivo con cada tratamiento. Para la determinación de la viabilidad y la germinación se emplearon 9 microfotografías seleccionadas al azar de un conjunto de 30 fotos, que fueron tomadas 10 por repetición, la cual estuvo constituida por un frasco (germinación) y un sobre de papel (viabilidad). Los datos se sometieron a un test de normalidad (Shapiro-Wilk modificado) y de homocedasticidad (prueba de Levene), posteriormente se realizó un análisis no paramétrico Kruskal wallis con un nivel de confianza del 0,05 a través del software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Tabla 1. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los porcentajes de viabilidad, germinación y semillas vanas en *Dendrobium nobile* en cada periodo de observación.

Almacenamiento (días)	Semillas viables (%)	Semillas no viables (%)	Semillas vanas (%)	Semillas germinadas (%)	Semillas no germinadas (%)
0	90,97±4,85 ^a	5,75±4,13 ^c	3,27±2,64 ^a	83,91 ±7,37 ^a	16,09±7,37 ^b
30	89,47±2,84 ^a	7,57±1,47 ^{bc}	2,96±0,29 ^a	82,97±3,44 ^a	17,02±3,44 ^b
60	86,47±6,95 ^a	10,72±8,52 ^{bc}	2,80±1,21 ^a	81,58±10,73 ^a	18,41±10,73 ^b
90	84,61±6,74 ^a	14,10±6,93 ^b	1,28±0,85 ^a	78,83±10,80 ^a	21,17±10,79 ^b
120	33,61±14,68 ^b	62,57±16,47 ^a	3,82±2,89 ^a	27,93±9,08 ^b	72,07±9,08 ^a

Valores promedios ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas a 5% de acuerdo con el test de Kruskal wallis (a < P-valor y b > P-valor).

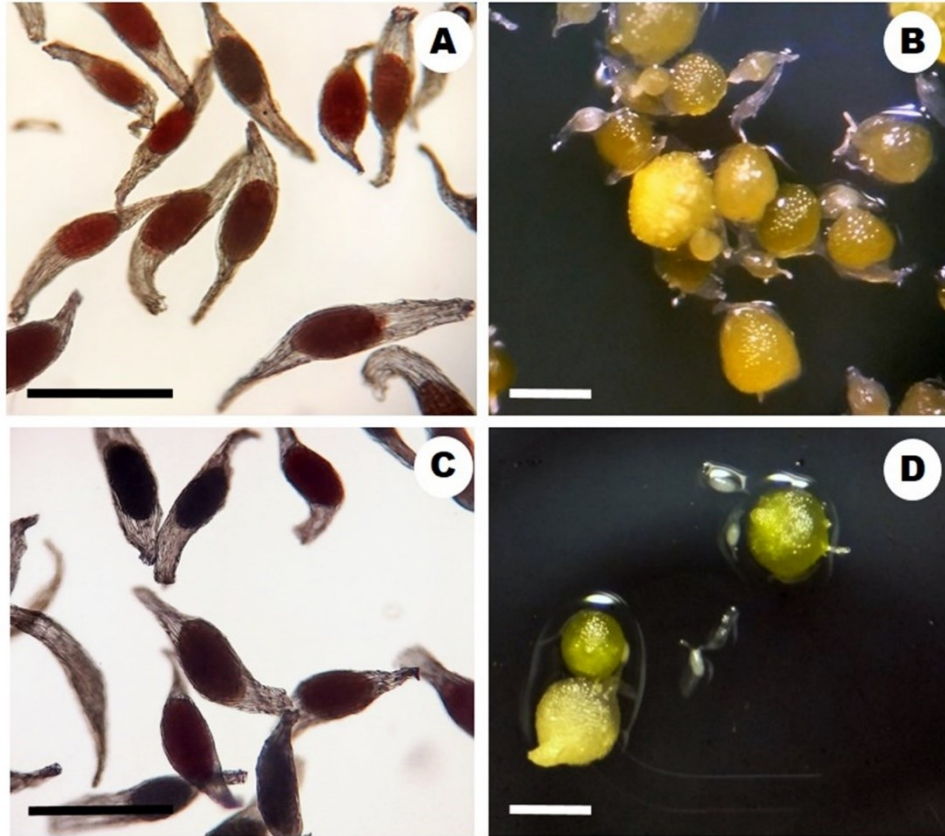


Figura 1. Viabilidad y germinación de semillas de *Dendrobium nobile*. Test de tetrazolio (A) y germinación (B) previo al almacenamiento. Test de tetrazolio (C) y germinación (D) al finalizar la conservación. La barra indica A y C 50 μ m, B y D 500 μ m.

RESULTADOS

Las semillas inmediatamente después de la apertura del fruto, presentaron un porcentaje de viabilidad del $90,97 \pm 4,85\%$, una germinación de $83,91 \pm 7,37\%$, la proporción de semillas no viables y no germinadas fueron de $5,75 \pm 4,13\%$ y $16,09 \pm 7,37\%$ respectivamente, en tanto que la cantidad de vanas fue del $3,27 \pm 2,64\%$. Durante 90 días, los cuales fueron coincidentes con los meses de otoño e invierno (45-80% de humedad y temperaturas mínimas de 0°C), las semillas presentaron altos porcentajes de viabilidad y germinación, sin diferencias significativas entre los días 0, 30, 60 y 90. En este periodo la germinación se mantuvo en valores superiores al $78,83 \pm 10,80\%$. Los últimos 30 días de almacenamiento que coincidieron con el primer mes de primavera (con humedad relativa del 50-80% y temperaturas máximas de 26°C), se observó notablemente una disminución en la viabilidad y germinación (Tabla 1). Por otro lado, en las semillas almacenadas de 0 a 90 días se observó que la germinación se inició después de 12 o 15 días de cultivo y presentaron porcentajes de viabilidad del 84 al

90%. A los 120 días de almacenamiento, la germinación se inició a los 24 días y la viabilidad fue del 33% (Tabla 1).

Los altos valores de viabilidad de las semillas durante los primeros 90 días se observaron a través de una tinción roja de los embriones (figura 1A). Posteriormente, al poner a germinar las semillas en el medio de cultivo descrito, se observó la formación abundante de unas estructuras de color verde, conocidas como protocormos (Figura 1B). A los 120 días, cuando se realizó la prueba de viabilidad, se observó una mayor cantidad de semillas sin tinción con tetrazolio, efecto demostrado a través de los embriones de color negro (Figura 1C). En esta última observación también se presentaron una alta cantidad de semillas sin germinar (Figura 1D).

DISCUSIÓN

La viabilidad de las semillas de orquídeas puede variar entre el 60 y el 99 %, pero la temperatura y tiempos óptimos de conservación dependen de la especie y del genotipo (Franceschi *et al.*, 2019; Magrini *et al.*, 2019). Los

porcentajes de germinación decrecen a los pocos meses durante el almacenamiento a temperatura ambiente (Udomdee *et al.*, 2014). En cambio, si las semillas se almacenan a bajas temperaturas (entre 4 y -80°C), el porcentaje de la germinación puede alcanzar altos valores a largo plazo (Udomdee *et al.*, 2014; Franceschi *et al.*, 2019; Guarín *et al.*, 2022). Las mejores combinaciones para el almacenamiento de semillas de orquídeas, es cuando se secan hasta un 5% de humedad y se almacenan a bajas temperaturas (Puspitaningtyas y Handini, 2020). Sin embargo, si se crioconservan las semillas de *D. nobile*, pueden mantener porcentajes de viabilidad y germinación del 50 y 60% en tiempos prolongados de conservación y a baja temperaturas (-196°C) (Vendrame *et al.*, 2007).

Según el estudio de Udomdee, la viabilidad de las semillas de *D. nobile* a temperatura ambiente disminuye después de 6 meses, pero la germinación es mayormente afectada después de los 3 meses cuando las semillas son secadas previamente al almacenamiento (Udomdee *et al.*, 2014). En este estudio se ha demostrado que las semillas de *D. nobile* sin ningún proceso de secado mantienen porcentajes de viabilidad y germinación superior al 78% hasta los tres meses de almacenamiento en sobres de papel, por lo tanto, si se desean almacenar semillas de *D. nobile* por un periodo inferior a 90 días, no es necesario secar las semillas de esta especie para almacenar a temperatura ambiente (considerando las condiciones ambientales bajo las cuales fueron evaluadas). Consecuentemente, si se quiere lograr mayor tiempo de almacenamiento, se deben secar las semillas previo al almacenamiento, tal como lo ha reportado Udomdee *et al.*, (2014).

Las semillas de orquídeas si se secan previo al almacenamiento mantienen buena calidad y un alto potencial de sobrevivencia por varios años y los ensayos viabilidad y germinación *in vitro* son relevantes para evaluar las cualidades de las semillas durante el periodo de almacenamiento (Magrini *et al.*, 2019). Por otro lado, el cultivo de tejidos *in vitro* en sí mismo es una herramienta útil y ampliamente utilizada en conservación de las orquídeas (Chacón-Velasco, 2018). En consecuencia, se puede contar con grandes cantidades de semillas en bancos de germoplasma *in vitro* en sitios que no poseen bancos de semillas, ya que, de acuerdo con los resultados de este estudio, las semillas de *D. nobile* pueden permanecer almacenadas a temperatura ambiente en sobres de papel hasta realizar los cultivos correspondientes hasta un periodo de 90 días. Posterior a ese periodo, las semillas de *D. nobile* que no son sometidas a un proceso de secado previo a su almacenamiento y la conservación y bajo las condiciones cambiantes de humedad y temperatura del ambiente circundante, se produce una brusca disminución del vigor de las semillas.

CONCLUSIONES

Las semillas de *D. nobile* almacenadas a temperatura ambiente en sobres de papel y sin secado previo, mantienen altos porcentajes de viabilidad y germinación hasta los 90 días.

Transcurrido los 90 días, la viabilidad y la germinación de las semillas disminuyen rápidamente hasta la pérdida total a medida que pasa el tiempo.

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Forestales por brindar los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, Y. P., Bhattarai, P., Acharya, K. P., Kunwar, R. M., & Bussmann, R. W. (2021). *Dendrobium nobile* Lindl. Kunwar RW, Sher H, Bussmann RW. *Ethnobotany of the Himalayas*. Springer, Cham. 10, 978-3. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45597-2_80-1
- Aguilar-Morales, M. A., Laguna-Cerda, A., Vences-Contreras, C., & 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
- Barth, S., Eibl, B., Palavecino, J., & Martinez, A. (2008). Composición florística y estructura del componente arbóreo de bosques remanentes de la cuenca del arroyo Elena – Eldorado – Misiones – Argentina. En Actas: 13^{as}. Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales, Eldorado, 6-8 de junio de 2008. FCF/ UNaM- EEA Montecarlo del INTA.
- Chacón-Velasco, M. R. (2018). Contribución a la conservación de Orchidaceas de Santander mediante cultivo *in vitro* de semillas. Chacón-Velasco, M. R., Contreras Acero, O. M., Cáceres Cárdenas H. E. Barranquilla: Ediciones Universidad Simón Bolívar, p 176. <http://bonga.unisimon.edu.co/handle/20.500.12442/624>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020) InfoStat, versión 2020, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/>
- Duarte, E. R., Da Vega, L., Ortiz, L. M., Samudio, A., & Küppers, G. (2022). Evaluación de la germinación de semillas de orquídeas según el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. *Innova Biology Sciences*, 2 (2), 24-34. <https://bit.ly/3e8xV9>
- Duarte, E. R., Mangeón, V., Küppers, G., Rocha, P., & Nie-

- Ila, F. (2017). Tamaño y viabilidad de semillas: implicancias en la evolución y conservación de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae). *Caldasia*, 39(2), 388-399. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v39n2.6218>
- Franceschi, C. R., Smidt, E. C., Vieira, L. N., & Ribas, L. L. (2019). Storage and *in vitro* germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3), 1-11. <https://doi.org/10.1590/0001-376520192018043>
- Fu, X., Chen, S., Xian, S., Wu, Q., Shi, J., & Zhou, S. (2023). *Dendrobium* and its active ingredients: Emerging role in liver protection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157, 114043. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.11404>
- Guarín, J. H. C., Rieche, A. K. S., & Mercado, S. A. S. (2022). Aplicación de semillas artificiales como método de conservación *in vitro* de orquídeas: Encapsulación de embriones. *Revista Mutis*, 12(1). <https://doi.org/10.21789/22561498.1818>
- Magrini, S., De Vitis, M., Torelli, D., Santi, L., & Zucconi, L. (2019). Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. *Plant Biology*, 21(3), 544-550. <https://doi.org/10.1111/plb.1293>
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Copenhagen. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Puspitaningtyas, D. M., & Handini, E. (2020). Ex-situ conservation of *Cymbidium finlaysonianum* by seed storage. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(8). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210813>
- Rokaya, M. B., Raskoti, B. B., Timsina, B., Münzbergová, Z. (2013). An annotated checklist of the orchids of Nepal. *Nordic Journal of Botany*, 31:511-50. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2013.01230>
- Schwallier, R., Bhoopalan, V., & Blackman, S. (2011). The influence of seed maturation on desiccation tolerance in *Phalaenopsis amabilis* hybrids. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 136-140. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.01>
- Seaton, P., Kendon, J. P., Pritchard, H. W., Puspitaningtyas, D. M., & Marks, T. R. (2013). Orchid conservation: the next ten years. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 13(1-2), 93-101. <https://www.redalyc.org/pdf/443/44340043010.pdf>
- Silva, F., Eibl, B., & Bobadilla, E. (2008). Características climáticas de la localidad de Eldorado, Misiones, Argentina. En Actas: 13^{as} Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales, Eldorado, 6-8 de junio de 2008. FCF/UNaM- EEA Montecarlo del INTA.
- Teixeira da Silva, J. A., Tsavkelova, E. A., Bun Ng, T., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., Rao, M. V., & Zeng, S. (2015b). Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. *Plant Cell Rep*, 34, 1685-1706. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1829->
- Teixeira da Silva, J.A., Tsavkelova, E.A., Zeng, S., Bun Ng, T., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Rao, M. V. (2015a). Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242, 1-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301->
- Udomdee, W., Wen, P. J., Chin, S. W., & Chen, F. C. (2014). Effect of storage temperature on seed viability and *in vitro* germination of *nobile* *Dendrobium* hybrids. *Thai Agricultural Research Journal*, 32(2), 201-217. <https://doi.org/10.14456/thaidoa-agres.2014>
- Vendrame, W. A., Carvalho, V. S., & Dias, J. M. M. (2007). *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Scientia Horticulturae*, 114(3), 188-193. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.06.00>