

Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo de plántulas *in vitro* de *Cyrtopodium schargellii* (G. A. Romero, Aymard & Carnevali)

Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium schargellii* (G. A. Romero, Aymard & Carnevali)

*Hernández-Rosales Daniel J**, *Ortega-Macareno Luis C***,
*Martínez-Oviedo Luisa ****, *Beltrán-Herrera Javier*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.121102

RESUMEN

Cyrtopodium schargellii, conocida en ciertas zonas como “lluvia dorada”, es una orquídea nativa de América Central, cuya distribución incluye Venezuela y Colombia, donde habita principalmente en ecosistemas de bosque seco tropical. Esta especie, de interés ornamental y ecológico, enfrenta desafíos que justifican la búsqueda de alternativas para su propagación y conservación. El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de germinación asimbiótica y evaluar la formación de plántulas *in vitro* de la orquídea *C. schargellii*. Para ello, se hizo uso de dos cápsulas maduras de dicha especie, recolectadas en el departamento de Sucre, para posteriormente cultivar las semillas en tres tratamientos: T1 (sales MS al 100%), T2 (sales MS al 50%) y T3 (sales MS al 25%). Para la formación de raíces, T3 fue el mejor tratamiento, mientras que T1 y T2 favorecieron la generación de brotes y la elongación del tallo; sin embargo, T1 fue el mejor tratamiento para la germinación de las semillas. Estos hallazgos evidencian la viabilidad del protocolo propuesto para la obtención de vitroplántulas de la orquídea *C. schargellii*.

Palabras clave: Biotecnología, bosque seco tropical, cultivo de tejidos, orquídea, vitroplántulas.

ABSTRACT

Cyrtopodium schargellii, known in certain areas as “golden rain,” is an orchid native to Central America, whose distribution includes Venezuela and Colombia, where it mainly inhabits tropical dry forest ecosystems. This species, of ornamental and ecological interest, faces challenges that justify the search for alternatives for its propagation and conservation. The objective of this research is to establish an asymbiotic germination protocol and evaluate the formation of *in*

* Estudiante de Biología, Universidad de Sucre, Sincelejo. dherandezrosales@hotmail.com

** Dr. Ecología y Biotecnología, Universidad Veracruzana, México. <https://orcid.org/0000-0002-1253-489X>. luiscr.ortega1@gmail.com

*** Bióloga, Universidad de Sucre, Sincelejo. <https://orcid.org/0000-0002-6933-045X>. Luisa.martinez@unisucre.edu.co

**** Dr. Fitopatología, Universidad de Sucre, Sincelejo. <https://orcid.org/0000-0002-2366-9335>. javier.beltran@unisucre.edu.co

vitro seedlings of the orchid *C. schargellii*. To this end, seeds were extracted from two mature capsules of this species, collected in the department of Sucre. These seeds are then cultivated in three treatments: T1 (100% MS salts), T2 (50% MS salts), and T3 (25% MS salts). For root formation, T3 is the best treatment, while T1 and T2 favor shoot generation and stem elongation; however, T1 is the best treatment for seed germination. These findings demonstrate the viability of the proposed protocol for obtaining *in vitro* seedlings of the orchid *C. schargellii*.

Keywords: Biotechnology, tropical dry forest, tissue culture, orchid, vitroplantlets.

Recibido: junio 24 de 2025

Aprobado: 5 de noviembre de 2025

INTRODUCCIÓN

C. schargellii es una planta epífita de la familia Orchidaceae, nativa de América Central y distribuida en países como Colombia y regiones como el occidente-noroeste de Venezuela, donde habita principalmente en ecosistemas de bosque seco tropical (Hernández y Ortega, 2025) (Figura 1). Se diferencia de otras especies del género porque esta presenta hábito de crecimiento exclusivamente epífito (Romero et al., 2005).

Por otro lado, el estado de conservación actual de esta especie, junto con el de otras especies de orquídeas, se está viendo afectado por la fragmentación del hábitat, derivado de la contaminación del suelo y demás actividades antropogénicas, lo que ha provocado una disminución en el número de las poblaciones silvestres (García et al., 2024). Además, factores como los efectos del cambio climático, la extracción ilegal y el aprovecha-

miento tradicional también compromete el riesgo de extinción (Baider y Florens, 2021; Castillo et al., 2021). Todos estos aspectos traen consigo repercusiones negativas sobre la ecología de las orquídeas y explican su presencia en listas rojas nacionales e internacionales de especies amenazadas o en peligro.

En ese orden de ideas, la técnica de propagación *in vitro* a partir del cultivo de tejidos vegetales se ha considerado como una herramienta crucial para la conservación de especies de importancia ornamental, ecológica o comercial (Vásquez et al., 2021; Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2015).

La propagación *in vitro* ha sido implementada exitosamente en especies terrestres, epífitas y litófitas en diversos lugares de todo el mundo, abarcando desde la germinación de semillas hasta la siembra de explantes a partir de diversos órganos de la planta (Beltrán y Solór-



Figura 1. Flor de la especie *C. schargellii* (Autoría propia).

zano, 2022). En el caso de las orquídeas, el proceso germinativo puede darse por vías simbióticas o asimbióticas. El método simbiótico *in vitro* consiste en realizar la siembra de las semillas junto con un inóculo de hongo micorrícico que tenga afinidad con la orquídea (Pujasatria *et al.*, 2020). De igual manera, el método asimbiótico, propuesto por Knudson (1922), mostró ser un avance trascendental, al demostrar que las semillas tenían la capacidad de germinar en medios enriquecidos con sales y azúcares bajo condiciones axénicas y controladas en un laboratorio (Mamani *et al.*, 2022). Posteriormente, se ha señalado que, una vez alcanzada la germinación, las orquídeas desarrollan una estructura conocida como protocormo, una masa de células embrionarias que se caracterizan por presentar divisiones celulares activas, junto con la diferenciación del meristema apical, con una expresión génica distinta a la del embrión inicial (Hernández *et al.*, 2023); los protocormos presentan un alto grado de totipotencialidad, siendo capaces de regenerar plantas completas, bajo las condiciones adecuadas (Ruiz, 2020).

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y recolección del material vegetal

Se hizo uso de 2 cápsulas maduras de *C. schargellii* (Figura 2), las cuales fueron recolectadas en el municipio de Sampues, Sucre, en las coordenadas: 9.21939 de latitud y -75.34243 de longitud del meridiano de Green-

wich. Se conservaron las mismas en papel periódico y bolsas ziploc y se transportaron hacia el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Sucre.

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 realizaron dos lavados con agua destilada estéril para eliminar el exceso de detergente.

Medios de cultivo

Se realizó un total de 60 frascos con medios de cultivo, distribuidos en 3 tratamientos (T1, T2 y T3), donde cada tratamiento estuvo conformado por 20 repeticiones, siendo cada frasco una unidad experimental. Los tratamientos estuvieron compuestos por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% para T1, para T2 se adicionó sales MS (1962) al 50% y para T3 sales MS (1962) al 25%, y para todos los tratamientos sacarosa al 3%, Myo-inositol, tiamina HCl, Gelrite al 0,2%, y se ajustó el pH a 5,7. Luego se disolvió el Gelrite durante 10 minutos en una plancha de calentamiento y se distribuyó a razón de 20 ml por frasco. Finalmente se esterilizó en autoclave durante 20 minutos 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

Las cápsulas se abrieron longitudinalmente con la ayuda de un bisturí previamente desinfectado dentro de la cá-



Figura 2. Cápsula madura de *C. schargellii* (Autoría propia).



Figura 3. Siembra de las semillas de *C. schargellii*.



Figura 4. Semillas germinadas *in vitro* (protocormos) de *C. schargellii* después de aproximadamente 20 días post-siembra.

mara de flujo laminar, se extrajo un cúmulo de semillas y se sembró en los diferentes medios de cultivo distribuyéndolas en cinco puntos 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 ± 5 °C, humedad relativa de 65 % y un fotoperíodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Evaluación del material vegetal

Se evaluó el desarrollo germinativo de las semillas en cada uno de los medios a las 24, 48 y 72 horas, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70 y 90 días con el objetivo de generar una cinética de crecimiento. Al mismo tiempo, se evaluaron parámetros cuantitativos y cualitativos, tales como el 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 ($\alpha: 0.05$), mientras que en caso contrario se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se procesaron en los programas Excel, R Project y R Studio para Windows (de Mendiburu, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran que al transcurrir aproximadamente 20 días después de la siembra de las semillas, fue posible observar inicios de germinación en los medios de cultivo, observándose así una estructura conocida como protocormo globular en diferentes réplicas de los distintos tratamientos implementados (Vargas et al., 2023; Utami et al., 2017) (Figura 4).

Los resultados obtenidos sugieren que el porcentaje de germinación de semillas en T1 fue del 75%, en T2 del 29% y en T3, el porcentaje se dio en la menor proporción, es decir, del 25%. Estos hallazgos se relacionan con los obtenidos en trabajos anteriores sobre germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Ruiz (2020) estableció las bases para la micropropagación de la flor de un día (*Sobralia macrantha*), alcanzando un porcentaje superior al 70% de germinación una vez transcurridos 18 días post-siembra, demostrando la eficiencia de la germinación asimbiótica en este tipo de plantas. De igual manera,

Apolo (2021) analizó la viabilidad de semillas de la especie *Epidendrum nocturnum* bajo diferentes condiciones de almacenamiento, evidenciando que, alcanzados los 15 días después de la siembra de las semillas, la germinación sobrepasó el 1,5% en todos los tratamientos implementados; aunque el porcentaje de germinación reportado fue menor que el de Ruiz (2020), la investigación resalta la influencia de las condiciones de almacenamiento en la germinación favorable de las semillas.

Por otro lado, Mamani et al. (2022) detallaron el proceso ontogénico y germinativo de *Epidendrum secundum*, registrando así que, a los 21 días después de la siembra, las semillas comenzaron a germinar en los medios implementados, reafirmando la relevancia de la composición de los medios (incluyendo suplementos como el agua de coco) en el desarrollo germinativo de las semillas.

Todos estos antecedentes resaltan que, si bien los tiempos y porcentajes de germinación pueden presentar variaciones entre especies y tratamientos, la formulación de protocolos de germinación *in vitro* de semillas de orquídeas pone en manifiesto la importancia de esta herramienta clave para la micropropagación y conservación de este tipo de plantas.

Dando continuidad a lo mencionado, el análisis de varianza para el número de semillas germinadas demuestra que hay diferencias significativas entre el número de semillas germinadas y los tratamientos ($p\text{-valor}=8.09\text{e}^{-14}$, $GL=2$, $\alpha=0.05$, $p<\alpha$), siendo T1 (300 semillas germinadas aproximadamente) el tratamiento que presenta mayor diferencia con T2 (110 a 120 semillas germinadas) y T3 (100 semillas germinadas) en cuanto a esta variable (Figura 5).

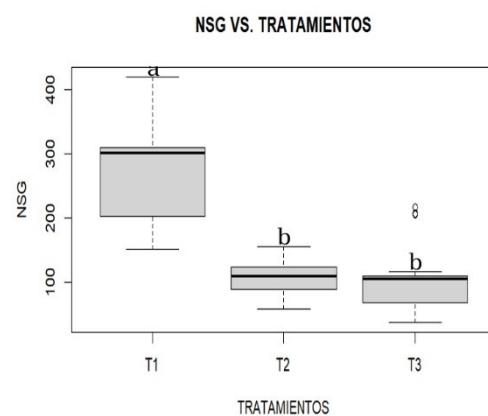


Figura 5. Boxplot del número de semillas germinadas con respecto a los tratamientos.

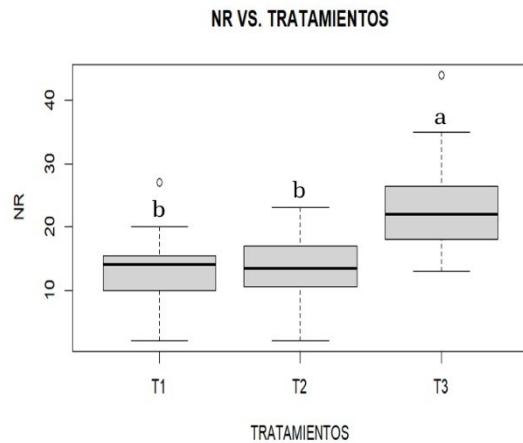


Figura 6. Boxplot del número de raíces con respecto a los tratamientos.

El análisis de varianza para el número de raíces demuestra que hay diferencias significativas entre el número de raíces y los tratamientos ($p\text{-valor}=1.14e^{-6}$, $GL=2$, $\alpha=0.05$, $p<\alpha$), siendo T3 (20 a 22 raíces obtenidas) el tratamiento que presenta mayor diferencia con T1 y T2 (10 a 15 raíces) en cuanto a esta variable (Figura 6).

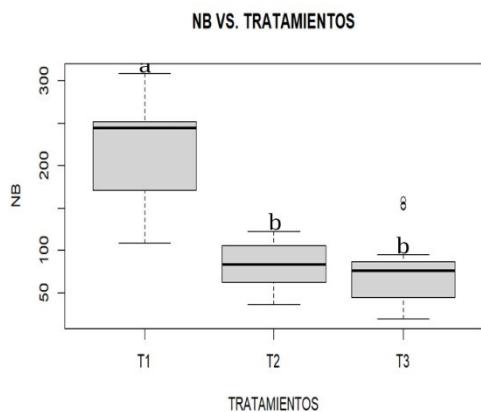


Figura 7. Boxplot del número de brotes con respecto a los tratamientos.

El análisis de varianza para el número de brotes demuestra que hay diferencias significativas entre el número de brotes y los tratamientos ($p\text{-valor}=5.62e^{-15}$, $GL=2$, $\alpha=0.05$, $p<\alpha$), siendo T1 (240 a 250 brotes aproximadamente) el tratamiento que presenta mayor diferencia con T3 (80 a 90 brotes) y T2 (60 a 80 brotes) en cuanto a esta variable (Figura 7).

El análisis de varianza para la longitud del vástago demuestra que hay diferencias significativas entre la longitud del vástago y los tratamientos ($p\text{-valor}=0.00532$, $GL=2$, $\alpha=0.05$, $p<\alpha$), siendo T3 (0,5 a 1 cm) el

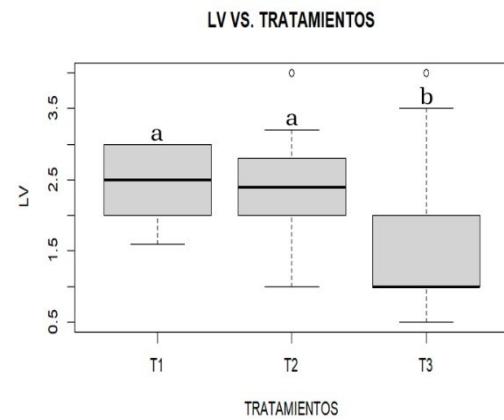


Figura 8. Boxplot de la longitud del vástago con respecto a los tratamientos.



Figura 9. A. Vitroplantas en T1, T2 y T3 respectivamente, después de 120 días post-siembra.

tratamiento que presenta mayor diferencia con T1 y T2 (2 a 2,5 cm) en cuanto a esta variable (Figura 8).

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

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que la concentración de sales minerales en el medio de cultivo tiene una influencia decisiva sobre las distintas etapas del desarrollo *in vitro* de las orquídeas (Hwang et al., 2024), incluyendo a *C. schargellii*. En términos de germinación, el medio MS al 100% (T1) fue el más eficiente, mientras que la disminución de sales al 25% (T3) inhibió considerablemente tanto la germinación como la formación de brotes. 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 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.

Sin embargo, los resultados obtenidos por Andrade *et al.* (2015) evidencian un efecto contrario en híbridos de *Brassolaeliocattleya*, donde la concentración de sales al 100% provocó un potencial osmótico negativo que inhibió la germinación. Estas diferencias dan cabida a la necesidad de implementar pruebas de susceptibilidad previas, variando la concentración de sales según la especie y su respuesta en fases críticas del proceso germinativo, como la imbibición y el desarrollo de protocormos.

La comparación entre resultados de estudios confirma que no existe un medio y/o concentraciones universalmente óptimas, sino que la respuesta depende considerablemente de los requerimientos fisiológicos y ecológicos de cada especie. Por ejemplo, *Cyrtopodium paludicolum*, especie adaptada a suelos hidromórficos pobres en nutrientes, arrojó mayores porcentajes de germinación en medios diluidos, como VW y MS 1/2 (50%) (de melo *et al.*, 2022), lo cual reafirma la relación existente entre condiciones ambientales naturales y desarrollo *in vitro*. De igual manera, Caramaschi (2001) registró que *Cyrtopodium punctatum* mostró mayores porcentajes de germinación en medio VW que en MS, mientras que Dutra *et al.* (2009) documentaron en la misma especie una mejor respuesta en VW en comparación con MS y KC. Por su parte, de Sousa *et al.* (2017) demostraron que *Cyrtopodium saintlegerianum* responde favorablemente tanto en medio MS como en medio Knudson C modificado, siendo este último más fácil de preparar y más económico, convirtiéndolo en una alternativa viable para la propagación *in vitro* de esta especie.

En este estudio, aunque la germinación se dio de una manera más eficiente en T1 (100%), la formación de tejido radicular fue considerablemente mayor en T3 (25%). Este comportamiento podría estar relacionado

con el efecto de la sacarosa, la cual tiene un papel determinante en el potencial osmótico del medio en comparación con las sales minerales (Pierik, 1990; Arditti, 2008). La hidrólisis de la sacarosa a glucosa y fructosa proporciona carbono disponible (Yoshida *et al.*, 1973), promoviendo la organogénesis de raíces en medios con bajas concentraciones de sales, tal como se observó en T3. Este resultado afirma que, para etapas posteriores de desarrollo radicular, medios con bajas concentraciones de sales podrían ser favorables para esta especie.

En cuanto al número de brotes y la longitud del vástago, los mejores resultados se obtuvieron en T1 (100%) y T2 (50%). Estos hallazgos contradicen lo reportado por Dogan (2020), quien asegura que las altas concentraciones de sales limitan el crecimiento longitudinal del vástago, debido a un potencial osmótico reducido; en este caso en particular, la mayor disponibilidad de nutrientes parece haber favorecido un mejor desarrollo, evidenciándose así que *C. schargelli* presenta una tolerancia relativamente alta a concentraciones elevadas de sales MS. Esto coincide con lo observado por de Oliveira *et al.* (2023) en *Cyrtopodium aliciae*, donde el medio MS al 50% produjo plantas con mayor resistencia y mejor adaptación a la aclimatación.

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 las respuestas a los tratamientos implementados.

Los resultados de la presente investigación reafirman la idea de que la respuesta de las orquídeas a los cultivos *in vitro* depende de la especie y de las condiciones del medio, lo que impide el establecimiento de un protocolo de aplicación general. Mientras que para *C. schargelli* la germinación y formación de brotes se ven favorecidas en medios con altas concentraciones de sales, la formación de tejido radicular se da de una manera más eficiente en medios con bajas concentraciones.

CONCLUSIONES

La respuesta *in vitro* de *C. schargelli* está directamente relacionada con la concentración de sales del medio de

cultivo. Se concluye que el tratamiento más viable y efectivo para la formación de plántulas *in vitro* de *C. schargellii* es el que viene dado por sales MS al 100%.

REFERENCIAS

- Andrade, M., Vargas, J., Villegas, O., López, V., Guillén, D., Alia, I. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Cattleya* (Brassolaeliocattleya) *in vitro*. *Interciencia*, 40 (8), 549-553.
- Apolo, K. (2021). Evaluación de procedimientos en la conservación y germinación *in vitro* de semillas de la orquídea *Epidendrum nocturnum* (Jacq). Guayaquil, Ecuador: Universidad Agraria del Ecuador, p 46.
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of Orchids* (2da edición). California, Estados Unidos: Blackwell Publishing, p 511.
- Baider, C., Florens, F. V. (2022). *Diversity, Ecology, and Conservation of Mauritius Orchids. Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture: Fundamentals and Applications*. Springer Chams, p 1-27.
- Beltrán, D.; Solórzano, A. (2022). Estudio de la germinación y desarrollo temprano *in vitro* de una especie de orquídea del género *Cymbidium* cultivada entre diferentes tratamientos simbióticos y asimbióticos. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay, p 1.
- Cadavid, I.; Salazar, S. (2008). *Micropropagación de Cattleya quadricolor*. Medellín, Colombia: Universidad EAFIT, p30-32.
- Caramaschi, G. (2001). Propagação *in vitro* de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae). 110 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, p110.
- Castillo, L., Martínez, D., Fortanelli, J., Carranza, C. (2021). Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 146, 249-257.
- de Melo, W., Magno, A., Cavalcante, J., Mamoru, R., Gomes, J. (2022). Asymbiotic germination, initial development *in vitro* and acclimatization of *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, a Brazilian Savanna orchid species. *Ciencia Rural*, 53 (5), 2023.
- De Mendiburu, F. (2012). Manual rápido de uso de la librería agrico-lae. Universidad Nacional Agraria La Molina. 60 p.
- de Oliveira, J., Moraes, M., Castilho, C. & Machado, N. (2023). *In vitro* development and acclimatization of *Cyrtopodium aliciae* L. Linden & Rolfe, an endemic species of the Chapada Diamantina. *Revista Ciencia Rural* 53 (5) 2023.
- de Sousa, C., Garcés, L., Inácio, K., Mota, D., Tadeu, S., Faria, P. (2017). Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado. *Ornamental Horticultura*, 23 (1), 96-100.
- Dogan, M. (2020). Effect of salt stress on *in vitro* organogenesis from nodal explant of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. and *Bacopa monnieri* (L.) Wetst. and their physio-morphological and biochemical responses. *Physiol Mol Biol Plants*, 26 (4), 803-816.
- Dutra, D., Kane, M., Richardson, L. (2009). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96, 235-243.
- García, G. F., Ramírez, M. A., Mata, H., López, A. V., López, R. (2024). *In vitro* conservation of *Notylia barkeri* Lindl. *Bio Ciencias*, 11, e1633.
- Hernández, F., Iracheta, L., Damon, A., Fernández, S., Guillén, K. (2023). Efecto del medio de cultivo y escotoperíodo en la germinación de semillas y crecimiento *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae). *Polibotánica*, 56 (28), 151-170.
- Hernández, D., Ortega, 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.
- Hwang, J.E., Park, H.B., Jeon, D.Y., Park, H.J., Kim, S., Lee, C.W., Kim, Y.-J., Yoon, Y.-J. (2024). Effect of Different Basal Media and Organic Supplements on *In Vitro* Seedling Development of the Endangered Orchid Species *Dendrobium moniliforme* (L.) Swartz. *Plants*, 13 (19), 2721.
- Knudson, L. (1922). Non symbiotic germination of orchid seeds. *Bot Gaz* 73, 1-7.
- 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.
- Mamani, B., Nova, M., Espinal, J. (2022). Germinación *in vitro* de *Zigopetalum maculatum* con diferentes protocolos de desinfección y adición de agua de coco en el medio de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9 (2), 26-36.
- Martínez, Y., Andrade, M., Colinas, M., Villegas, Ó., Castillo, A., Alia, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista fitotecnia mexicana*, 38 (4), 369-374.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3), 473-497.
- Pierik, L. (1990). Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid, España: Ediciones Mundiprensa, p45-82.
- Pujasatria, G., Miura, C., Kaminaka, H. (2020). *In Vitro Symbiotic Germination: A Revitalized Heuristic Approach for Orchid Species Conservation*. *Plants* 9 (12), 1742.
- Ramírez-Mosqueda, M., Iglesias-Andreu, L. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Development Biology - Plant*, 51 (6), 683-692.
- Romero, G., Aymard, G., Carnevali, G. (2005). *Cyrtopodium schargellii* (cyrtopodiinae, orchidaceae), a new species from northern south america. *Harvard Papers in Botany*, 10 (1), 123-127.
- Ruiz, A. (2020). Germinación asimbiótica *in vitro* de *Sobralia macrantha* Lindl., una orquídea terrestre nativa de México. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México, p 57.
- Utami, E., Setiti, A., Hariyanto, S., Manuhara, 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*, 7 (4), 329-335.
- 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.
- Vásquez, M., Morales, F., Rodríguez, P. (2021). Germinación y crecimiento *in vitro* de especies de orquídeas amenazadas en comunidades aledañas al Biotopo del Quetzal. Ciudad de Guatemala, Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, p6.
- Yoshida, F., Kobayashi, T., Yoshida, T. (1973). The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco I. Effects of salts, sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlo-rophyll contents and mineral absorption of cells. *Plant Cell Physiol*, 14, 329-339.