



Acta Agronómica

ISSN: 0120-2812

actaagronomica@palmira.unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia

Colombia

Bertolini, Vincenzo; Damon Ashby, Anne; Rojas Velázquez, Ángel Natanael
Quelato de hierro y agua de coco en la germinación in vitro de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae)
Acta Agronómica, vol. 63, núm. 3, 2014, pp. 1-14
Universidad Nacional de Colombia
Palmira, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169931322005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Quelato de hierro y agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae)

Iron Chelate and coconut water in in vitro germination of *Rossioglossum grande* (Orchidaceae)

Vincenzo Bertolini^{1*}, Anne Damon Ashby¹ y Ángel Natanael Rojas Velázquez²

¹Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Carretera Antiguo Aeropuerto km. 2.5, CP: 30700, Tapachula, Chiapas, México.
²Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Álvaro Obregón # 64 Colonia Centro, CP: 78000, San Luis Potosí, S. L. P., México Tel. (444) 852 4058 Ext. 6. *Autor para correspondencia: Email: vbortolini@ecosur.mx Tel. (962) 628 9800 Ext. 5444, Fax (962) 628 9806.

Rec.: 03.21.2014 Acep.: 04.14.2014

Resumen

Rossioglossum grande (Lindl.) Garay & G.C. Kenn es una orquídea nativa mexicana considerada en peligro de extinción por la NOM-059-Semarnat-2010. Teniendo en cuenta que la germinación asimbiótica *in vitro* es una herramienta estratégica para la conservación de orquídeas amenazadas, en este estudio se generó información básica mediante la comparación de la germinación de *R. grande* en medios Knudson C (KC) y Dalla Rosa y Laneri modificado con quelato de hierro y agua de coco (DR). Para el efecto se utilizaron un cultivo madre (CM) y dos subcultivos (C1 y C2) y los tratamientos se dispusieron en un diseño experimental totalmente aleatorio. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) y Chi-cuadrada. A 60 días en el CM el medio de cultivo DR favoreció el desarrollo, la tasa de sobrevivencia y disminuyó la clorosis de los protocormos. A los 12 meses se presentó mayor desarrollo y mayor regeneración de protocormos. En los subcultivos C1 y C2 se registraron resultados similares lo que confirma que el DR acelera el desarrollo de los protocormos e incrementa su tamaño y tasa de regeneración. En síntesis, el empleo de hierro-quelato y agua de coco promueven el desarrollo *in vitro* de protocormos de *R. grande*.

Palabras clave: Chiapas, conservación, germinación, NOM-059-SEMARNAT-2010, protocormos.

Abstract

Rossioglossum grande (Lindl.) Garay & G.C. Kenn is a Mexican native orchid threatened to extinguish according to the NOM-059-SEMARNAT-2010. In vitro asymbiotic germination is a conservation tool widely used for threatened orchids. Generate basic knowledge about *in vitro* response of *R. grande* was the object of the work, comparing seed germination in Knudson C medium (KC) versus Dalla Rosa y Laneri medium (DR), modified adding iron chelate and coconut water. We distinguished three different stages of culture: the sowing culture (CM) and two subcultivated culture (C1 and C2). Experimental design was totally aleatory. Anova, Tukey's test ($p \leq 0.05$) y Chi-square were used to analyze germination variables averages. After 60 days from sowing (CM), seedling was more developed, and in general it had more percentage of green and vital protocorms using DR medium. After 12 months without subcultivate, we assist at regeneration of protocorms in DR medium in a significant way. In the subcultivation C1 and C2 we test similar responses. We assume that use of iron chelate and coconut water improves the protocorms development and their regeneration of *R. grande* in *in vitro* conditions.

Key words: Chiapas, conservation, germination, NOM-059-SEMARNAT-2010, protocorms.

Introducción

Orchidaceae es la segunda familia vegetal más grande por número de especies y comprende alrededor de 850 géneros y entre 20,000 y 30,000 especies (Dressler, 2005). México es el puente continental entre las Américas y posee una amplia diversidad biológica favorecida por su alta variedad fisiográfica y climática (Rzedowski, 1986). La flora orquideológica de México se compone de 1250 especies y subespecies, distribuidas en 168 géneros (Soto-Arenas et al., 2007; Salazar, 2013). *Rossioglossum grande* (Lindl.) Garay y Kenn es una orquídea epífita distribuida en bosques de neblina entre México y Guatemala. En México es una de las especies registradas por el estado de Chiapas, específicamente en unos pocos sitios en la región del Soconusco (Damon et al., 2011). Se clasifica en peligro de extinción en el país (Semarnat, 2010) debido a la explotación no sostenible y a la pérdida de su hábitat. Para su conservación es urgente diseñar un método de propagación masiva. La propagación *in vitro* por semilla asegura la conservación de la diversidad genética y puede ser empleada para constituir bancos de germoplasma *ex situ* para fines de conservación (Wing-Yam y Arditti, 2009).

Las semillas de las orquídeas se encuentran entre las más pequeñas del reino vegetal, con dimensiones de décimas de milímetros y micras de gramos, características que les permiten una amplia dispersión espacial (Arditti y Abdul-Ghani, 2000). Debido a la falta de nutrientes de reserva, su germinación en el medio natural se lleva a cabo a través de relaciones simbióticas obligadas con hongos micorrízicos tipo rhizoctonia (Hadley, 1997; Suárez et al., 2006). El empleo *in vitro* de estos hongos posiblemente es una herramienta útil, pero todavía no se han desarrollado protocolos efectivos para lograr una germinación simbiótica artificial y eficiente (Bertolini et al., 2011).

Se considera que el proceso de germinación empieza cuando la semilla se hincha y toma un color verde, lo que origina una estructura indiferenciada en forma esférica denominada protocormo. A su vez, este protocormo origina la plántula completa después de pasar por cinco etapas de desarrollo (Seaton y Ramsay, 2005). Estas etapas han sido descritas y divididas en: (1) formación del protocormo; (2) aparición de los rizoides; (3) aparición del meristemo apical; (4) desarrollo de la primera hoja; y (5) aparición de la primera raíz verdadera. De la etapa 5 en adelante se considera ya formada la plántula y se identifican tallos, hojas y raíces (Zettler y McInnis, 1994). A partir de las primeras orquídeas obtenidas por Knudson (1922, 1946, 1951), se ha producido abundante literatura sobre la germinación *in vitro* de orquídeas y se han desarrollado medios de cultivo para este fin. Sin embargo, el proceso puede ser lento antes de obtener plantas maduras (Sharma et al., 2004); por ejemplo, Buyun et al. (2004) reportan que el tiempo de cultivo *in vitro* de semillas de *Cattleya* sp. es de 500 - 600 días y de 300 en *Dendrobium* sp. (Orchidaceae) antes de lograr aclimatar el material vegetal en condiciones de invernadero. Knudson (1951) observó que el rango de pH óptimo para el medio de cultivo de semillas de orquídeas varía entre 4.5 y 5.5, además, el medio de cultivo tiende a acidificarse si se mantiene por un periodo de

tiempo prolongado. Este aspecto es importante si se considera que la germinación asimbiótica *in vitro* puede ser más o menos demorada en función de la efectividad del protocolo.

En la germinación de algunas especies epífitas de la región Soconusco se han empleado con éxito los medios C de Knudson (1946) y de Dalla Rosa y Laneri (1977) modificado por Damon et al. (2004). El primero es pobre en hierro debido a que éste se encuentra presente en forma de sulfatos insolubles ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Hicks, 2007). El medio Dalla Rosa y Laneri modificado es una variante del medio Knudson C, que presenta fuentes de hierro en forma de quelatos ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y NaEDTA), además, se emplea agua de coco en su formulación (Damon et al., 2004). No obstante el medio C de Knudson se ha empleado con éxito en la germinación de semilla de algunas especies de orquídeas (Seaton y Pritchard, 2011) y se sigue usando para probar la viabilidad de la semilla de orquídeas de diferentes especies (Hosomi et al., 2012; Nadarajan et al., 2011). Knudson (1922) observó que la sacarosa, la fructosa y otros complejos químicos de extractos vegetales favorecen la germinación y promueven el desarrollo de los protocormos. De igual manera, el endospermo líquido de la semilla de coco se ha usado en varios porcentajes y varias especies establecidas *in vitro*, incluyendo las orquídeas, ya que contiene vitaminas, enzimas, azúcares, fuentes nitrogenadas, reguladores de crecimiento y una fracción de sales inorgánicas (Hicks, 2007). El medio C de Knudson adicionado con NAA (1 mg/lit) y 15% de agua de coco, promueve la germinación de manera eficiente en la especie *Dendrobium chrysanthum* Wall. (Orchidaceae) (De et al., 2006). Igualmente, el agua de coco empleada en *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae) ha dado resultados significativos en la germinación, comparada con el testigo y con el uso de jugo de piña, AIA y GA_3 , respectivamente (Salazar-Mercado, 2012). En orquídeas terrestres de los género *Habenaria* y *Ophrys* se ha evidenciado el efecto positivo del agua de coco en el medio de cultivo, en término de formación y desarrollo de los protocormos (Stewart y Kane, 2006; Kitsaki et al., 2004). En la germinación de esporas de helecho, Smith y Yee (1975) observaron que el empleo de esa agua beneficia la germinación en términos de tiempo; además promueve la ramificación del gametofito, si se usa en concentraciones altas, debido a la acción conjunta de fuentes nitrogenadas (aminoácidos y aminos) y fuentes de azúcares. Los efectos promotores del agua de coco se deben a la presencia de compuestos orgánicos como citoquininas, zeatinas, kinetinas y purinas, que se consideran promotores del crecimiento vegetal (Yong et al., 2009; Hicks, 2007). Es un hecho que en la composición de esta agua extraída de cocos verdes, los fitoreguladores presentes son citoquininas, con un total de 10 compuestos, seguidas por dos giberelinas y una auxina (Yong et al., 2009). Las citoquininas juegan un papel fundamental en la organogénesis vegetal, ya que inducen la formación de hojas y brotes y aumentan la velocidad de desarrollo y la germinación de la semilla (Werner et al., 2001; Huan et al., 2004).

Como hipótesis de este estudio se plantea que el hierro en forma de quelato y el agua de coco, añadidos al medio de cultivo C de Knudson (1946), incrementan el desarrollo *in vitro* de protocormos de *R. grande* y promueven su regeneración. El objetivo fue comparar el medio C de

Knudson (1946) con el de Dalla Rosa y Laneri (1977) modificado (Damon et al., 2004) y conocer la respuesta en el desarrollo de los protocormos, para diseñar a mediano plazo un protocolo adecuado para la germinación *in vitro* de la especie.

Materiales y métodos

En marzo de 2012 se recolectó una cápsula (fruto) dehiscente de *R. grande* procedente de un sitio en la región terrestre prioritaria 135, corredor biológico Tacaná-Boquerón del Estado de Chiapas, Las semillas fueron desinfectadas sumergiéndolas en 100 ml de solución de NaOCl al 1% y tres gotas de emulsionante (Tween® 20) en agitación por 10 min. Un vez retiradas de la solución, se enjuagaron con agua desionizada estéril por tres veces consecutivas.

Los medios de cultivo Knudson (1946) (KC = Tratamiento 1) y Dalla Rosa y Laneri (1977) modificado (Damon et al., 2004) (DR = Tratamiento 2) fueron preparados ajustando el pH a 5.5 y esterilizados en autoclave a 121 °C, 101 kPa por 20 min. El agua de coco (*Cocos nucifera* L.) usada en el medio DR fue extraída y filtrada de frutos verdes producidos en la región del Soco-nusco.

Las semillas fueron sembradas el 13-03-2012 siguiendo el protocolo descrito por Seaton y Ramsay (2005) en cuatro cajas Petri por cada tratamiento. En cada caja Petri se colocaron aproximadamente 1000 semillas. Al total de las placas se le denominó cultivo madre (CM). El desarrollo de los protocormos en CM fue evaluado a 30, 45 y 60 días desde la fecha de siembra. Después de transcurridos 100 días de la siembra, se realizó la transferencia de protocormos a medio fresco para obtener el primer subcultivo (C1), compuesto por cinco cajas Petri por tratamiento. Se emplearon protocormos homogéneos clasificables como etapa de desarrollo 2 (con rizoides), descrita por Zettler y McInnis (1994). Los protocormos no subcultivados fueron mantenidos en el CM. De esta manera el cultivo CM y el C1 fueron evaluados durante 1 año a partir de la siembra de la semilla. En cada caja Petri se cultivaron aproximadamente 150 protocormos.

El subcultivo 2 (C2) se obtuvo después de 110 días de haber originado el C1, para lo cual se utilizaron protocormos homogéneos clasificables como etapa 2 (con rizoides) (Zettler y McInnis, 1994) para un total de cinco cajas Petri por tratamiento. Cada mes, hasta 12 meses después de la siembra inicial, se evaluó el estado de los protocormos. Todos los cultivos fueron mantenidos a $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, con un tiempo de iluminación de 16 h/día con tubos fluorescente de luz fría.

La calidad de los protocormos en los cultivos (CM, C1, C2) se evaluó como: número de protocormos muertos (PM), número de protocormos vivos (PV), número de protocormos en etapa de desarrollo 2 (E2), y número de protocormos en etapa 3 (con meristemo apical visible) en adelante (E3), número de protocormos pigmentados (Pver), número protocormos albinos (PA), número de protocormos parcialmente albinos (protocormos cloróticos con zonas pigmentadas por arriba de 30% de su superficie total) (PpA), número de protocormos con un meristemo apical

(Pmono), número de protocormos con dos meristemos (Pbi), número de protocormos con múltiples meristemos (Pmulti), y diámetro del protocormo (DP). Para el cultivo CM se consideraron además: el número de protocormos hinchados sin rompimiento de testa (PH), hinchados con rompimiento de testa (PHRT), oxidados (PO), cloróticos (Pcl), con rizoides (PR), y con primordio foliar (PF). Igualmente, al finalizar cada ensayo se midió el pH del medio en los tres cultivos (CM, C1, C2) utilizando un potenciómetro digital y 5 mm³ de medio por tratamiento.

El diseño experimental utilizado fue totalmente aleatorio, donde la repetición consistió en cada protocormo analizado. Los datos fueron analizados mediante varianza, con el software Minitab 15® (2007). Para las variables de frecuencia se empleó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrada de Pearson para comparar los tratamientos, mientras que en el caso del diámetro de protocormos se usó la prueba paramétrica de Tukey DHS ($P \leq 0.05$). La investigación se realizó en el laboratorio de Ecología y Cultivo Sustentable de las Orquídeas del Soconusco, en el Colegio de la Frontera Sur (Ecosur), Unidad Tapachula. La medición del pH de los medios se efectuó en el campus Rosario Izapa, Tuxtla Chico, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Resultados y discusión

Cultivo madre (CM)

A los 60 días después de la siembra de las semillas, en el medio DR se presentó un menor porcentaje de protocormos oxidados que el medio KC (Figura 1 y Cuadro 1). Al mismo tiempo, a los 30 y 60 días, en el medio DR se produjeron el mayor número de protocormos con presencia de rizoides y primordios foliares, respectivamente (Figura 1). A 60 días, el análisis Chi-cuadrada mostró diferencias ($P < 0.005$) entre ambos tratamientos, en relación con las etapas de desarrollo alcanzadas por los protocormos (Cuadro 1), donde el medio DR mostró mayor cantidad de protocormos con rizoides (PR). A esta edad, el medio KC registró una reducción del pH mayor que el medio DR ($pH_{KC} = 4.3$ vs. $pH_{DR} = 5.1$), probablemente debido a la baja capacidad amortiguadora del medio KC, previamente observada por Hicks (2007).

Las observaciones a los 12 meses mostraron diferencias ($P < 0.05$) en la sobrevivencia, las etapas de desarrollo y la regeneración de los protocormos (Cuadro 2). No obstante que el medio DR generó valores inferiores de protocormos muertos con respecto al medio KC, ambos porcentajes no se consideran suficientes desde el punto de vista comercial; pero si se debe valorar este resultado considerando el alto valor ecológico de la especie y la falta de conocimiento previo de su respuesta en cultivo *in vitro*. En etapas más avanzadas de desarrollo, el medio DR produjo un mayor número de protocormos ($P < 0.005$) en comparación con el medio KC (Cuadro 2).

El diámetro de protocormos mostró diferencias ($P < 0.001$) entre tratamientos, con valores mayores en el medio DR; lo que no ocurrió con el grado de clorosis que fue similar entre tratamientos, ni con el pH (4.2) a 12 meses.

Subcultivo 1 (C1)

Al finalizar el periodo experimental C1 se observó nuevamente un porcentaje elevado de protocormos muertos en ambos tratamientos, lo que no ocurrió en el medio DR donde el desarrollo y la regeneración fueron mayores ($P < 0.005$) (Cuadro 3). El diámetro de los protocormos (DP) 12 meses después de la siembra fue mayor ($P < 0.005$), siendo de 5.28 ± 2.024 mm en el medio DR vs. 2.6 ± 0.902 mm en el medio KC. La clorosis fue similar (Chi-cuadrada = 4.266, $P < 0.118$) y el pH en el medio KC fue menor (4.8) que en DR (5.1), valores que coinciden con los encontrados por Hicks (2007) y muestran que el medio KC tiene baja capacidad amortiguadora. No obstante Knudson (1951) considera que el pH óptimo para el cultivo de orquídeas se encuentra en el rango 4.5 - 5.5.

Subcultivo 2 (C2)

En ambos tratamientos se encontraron protocormos muertos. En el medio DR este fenómeno no se presentó después del tercer mes; mientras que en el KC continuó hasta el quinto mes (Figura 2 y Cuadro 4). Esta alta mortalidad probablemente es el resultado del estrés ocasionado por el trasplante en medio fresco, ya que la densidad de protocormos por caja Petri fue menor. La clorosis también se presentó de forma significativa después de 12 meses de subcultivo de los protocormos ($P < 0.001$), siendo menos notable en el tratamiento DR (Cuadro 4). En este caso, el cultivo fresco y el contenido de quelato de hierro favorecieron la salud de los protocormos en este tratamiento.

En los 5 meses finales de estudio, las variables de desarrollo de los protocormos mostraron mejores índices en aquellos subcultivados en el medio DR, en el que se presentaron en etapas 4 y 5, en comparación con el medio KC que sólo presentó protocormos en etapas 2 y 3 (Figura 3). A los 12 meses, la cantidad de protocormos en etapas avanzada de desarrollo (E3) contrastaron ($P < 0.002$) entre los medios DR y KC, estando de nuevo a favor del medio DR (Cuadro 5). La regeneración de los protocormos fue significativo ($P < 0.005$) y mostró que, no obstante la elevada mortalidad, gracias a este proceso en el medio DR se pueden remplazar las pérdidas de estas estructuras (Cuadro 5).

El diámetro de los protocormos fue mayor ($P < 0.001$) en el medio DR, donde alcanzó un valor promedio de 5.8 ± 1.81 mm vs. 2.36 ± 0.54 mm en medio KC. El resultado mostró nuevamente el bajo poder de amortiguación del medio KC frente al DR ($pH_{KC} = 4.5$, $pH_{DR} = 5.2$).

En los medios de cultivo evaluados (CM, C1 y C2) los hallazgos coincidieron con los de Vacin y Went (1949) e Hicks (2007) en relación con la baja capacidad amortiguadora del pH en medio KC, el cual afecta la calidad del material vegetal cuando el cultivo es mantenido por prolongados periodos de tiempo. En el CM, los protocormos en medio KC presentaron mayor clorosis y mortalidad, probablemente debido a la precipitación del hierro en forma de sulfato, siendo

éste un riesgo existente en este tipo de medio (Hicks, 2007). El medio DR resultó menos sensible al descenso en pH que el medio KC, lo que se destacó en los protocormos del cultivo C2. Sin embargo, la mortalidad se presentó en ambos tratamientos, con valores poco recomendables para el uso comercial de ambos medios en la especie evaluada, no obstante, para propósitos de conservación, estos resultados pueden considerarse aceptables.

Para desarrollo y regeneración de los protocormos, el medio DR presentó los valores más altos en todas las etapas del estudio, lo que ratifica los efectos benéficos del agua de coco sobre las variables del estudio. Los resultados en este trabajo concuerdan con encontrados por Hicks (2007) quien encontró que el agua de coco puede promover la regeneración espontánea de protocormos *in vitro* del género *Oncidium* (Orchidaceae). El género *Rossioglossum* es filogenéticamente cercano a *Oncidium* y ambos pertenecen a la subfamilia *Epidendroideae*, subtribu *Oncidinae* (Soto Arenas *et al.*, 2007). Por tanto, lo observado puede ser una característica propia de la especie estudiada, que se expresa mediante el empleo de agua de coco en el medio de cultivo *in vitro*.

Conclusiones

- El estudio proporciona un avance acerca de la respuesta en germinación y desarrollo de los protocormos de *Rossioglossum grande* (Lindl.) Garay & Kenn cultivado *in vitro* en medio Dalla Rosa y Laneri modificado y en medio C de Knudson.
- Se comprobó que la presencia de quelato de hierro y agua de coco (medio DR) promueve el desarrollo e induce una mayor regeneración de los protocormos, comparado con el medio C de Knudson.
- No obstante la alta mortalidad, la posibilidad de promover regeneración de protocormos puede ser interpretada como una ventaja productiva, permitiendo aumentar el número de plántulas producidas a partir de una cantidad limitada de semillas.
- No obstante estos resultados positivos, se debe mejorar el protocolo de cultivo *in vitro* de semillas de *R. grande*, evaluando otros medios de cultivo con diferentes concentraciones de agua de coco e incluyendo carbón activado para limitar el fenómeno oxidativo y la alta mortalidad.

Agradecimientos

Al Doctor Leobardo Iracheta Donjuán, Investigador titular de INIFAP, campus Rosario Izapa, Tuxtla Chico (Chiapas, México) por las sugerencias y aportes brindados en el estudio de las condiciones hídricas de los protocormos y medio de cultivo.

Referencias

Arditti, J. y Abdul-Ghani, A. K. 2000. Transley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytol. 145:367 - 421.

- Bertolini, V.; Damon, A. y Rojas Velázquez, A. N. 2011. Symbiotic germination of three species of epiphytic orchids susceptible to genetic erosion, from Soconusco (Chiapas, Mexico). *Eur. J. Environ. Sci.* 1(2):60 - 68.
- Buyun, L.; Lavrentyeva, A.; Kovalska, L. e Ivannikov, R. 2004. In vitro germination of seeds of some rare tropical orchids. *Acta Universitatis Latviensis, Biol.* 676:159 - 162.
- Dalla Rosa, M. y Laneri, U. 1977. Modification of nutrient solutions for germination and growth in vitro of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. *Amer Orchid Soc. Bull.* 46:813 - 820.
- Damon, A.; Aguilar-Guerrero, E.; Rivera, L. y Nikolaeva, V. 2004. Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, Mexico. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 10(2):195 - 203.
- Damon, A.; Solano-Gómez, R.; García-González, A. et al. 2011. Diversidad y conservación de las orquídeas del corredor biológico Tacaná-Boquerón. *Fondos Mixtos, Chiapas.* 37 p.
- De, K. K.; Majumdar, S.; Sharma, R. N.; y Sharma, B. 2006. Green pod culture and rapid micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. - an horticultural and medicine orchid. *Folia Hortic.* 18(1):81 - 90.
- Dressler, R. L. ¿How many orchid species? 2005. *Selbyana* 26:155 - 158.
- Hadley, G. 1997. Orchid mycorrhiza. En: Arditti, J. y Pridgeon, A. M. (eds.). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives* vol. 2. Cornell University Press. Ithaca, Nueva York. p:83 - 118.
- Hicks, A. J. 2007. Orchid seed germination media, a compendium of formulations. The Orchid SeedBank Project, Chandler, USA. 210 p.
- Hosomi, S. T.; Custódio, C. C.; Seaton, P. T.; Marks, T. R.; y Machado-Neto, N. B. 2012. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 48:127 - 136.
- Huan, L. V. T.; Takamura, T.; y Tanaka, M. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci.* 166:1443 - 1449.
- Kitsaki, C.; Zigouraki, S.; Ziobora, M.; y Chintziest, S. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Rep.* 23:284 - 290.
- Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 78(1):1 - 25.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin* 15:214 - 217.
- Knudson, L. 1951. Nutrient solutions for orchids. *Bot. Gaz.* 112(4):528 - 532.
- Minitab® 15.1.39.0 - © 2007 Minitab INC.
- Nadarajan J.; Wood, S.; Marks, T. R.; Seaton, P. T.; y Pritchard, H. W. 2011. Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *J. Trop. Forest Sci.* 23(2):204 - 212.
- Rzedowski, J. 1986. Vegetación de México. 3ª. edición. Limusa, México, D.F. 432 p.
- Salazar, G. A. 2013. Two additions to the Mexican orchid flora. *Nota Científica. Rev. Mex. de Biodiversidad* 84(1):378 - 380.
- Salazar-Mercado, S. A. 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica* 61(1):69 - 78.
- Seaton, P. T. y Pritchard, H. W. 2011. Orchid seed store for sustainable use: a model for future seed-banking activities. *Lankesteriana* 11(3):349 - 353.
- Seaton, P. T. y Ramsay, M. 2005. Growing orchid seed. Royal Botanic Garden, Kew, Londres. 82 p.
- Semarnat (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-Semarnat-2010, Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre de 2010. 78 p.
- Sharma R. N.; Sharma, B.; y De, K. K. 2004. Micropropagation of *Dendrobium fimbriatum* Hook - an endangered orchid of Sikkim Himalaya. *J. Hill. Res.* 17(2):65 - 67.
- Smith, C. W. y Yee, R. N. 1975. The effect of coconut milk on the germination and growth of spores of *Nephrolepis hisutula*. *Am. Fern J.* 65 (1):13 - 18.
- Soto Arenas, M. A.; Hágsater, E.; Jiménez Machorro, R.; et al. 2007. Las Orquídeas de México. Catalogo Digital. Disco interactivo multimedia Win-Mac. Herbario AMO, Instituto Chinoin, A.C. México.
- Stewart, S. y Kane, M.. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid plant. *Cell. Tiss. Organ Cult.* 86:147 - 158.
- Suárez, J. P.; Weib, M.; Abele, A.; Garnica, S.; Oberwinkler, F.; y Kottke, I. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol. Res.* 110:1257 - 1270.
- Vacin, E. y Went, F. W. 1949. Some pH changes in nutrient solution. *Bot. Gaz.* 110(4): 605 - 613.

- Werner, T.; Motyka, V.; Strnad, M. y Schmulling, T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:10487 - 10492.
- Wing-Yam, T. y Arditti, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Plant Biotech. Rep. 3:1 - 56.
- Yong, J. W.; Ge, L.; Ng, Y. F.; y Tan, S. N. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Molecules 14:5144 - 5164.
- Zettler L. W. y McInnis, T. M. 1994. Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). Plant Sci. 102:133 - 138.

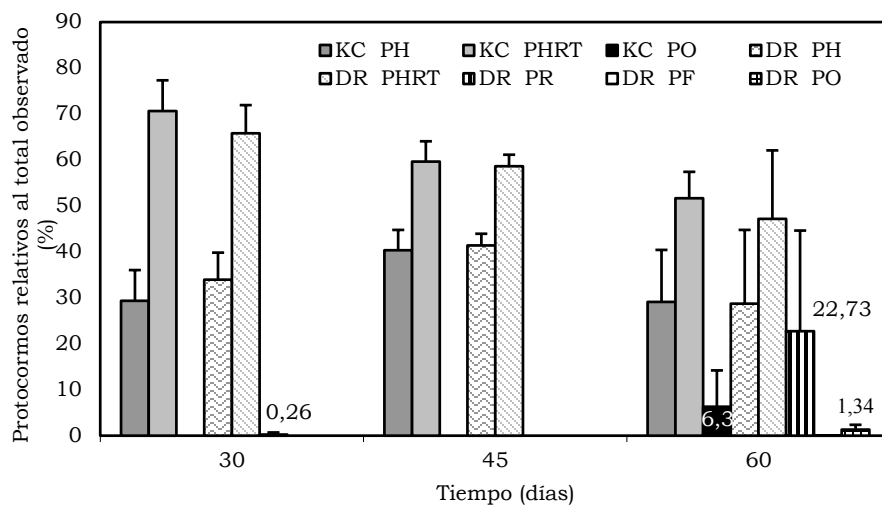


Figura 1. Cinética del desarrollo de los protocormos de *Rossioglossum grande* en el cultivo madre.

KC: medio de cultivo Knudson C; DR: medio de cultivo Dalla Rosa y Laneri modificado con quelato de hierro y agua de coco; PH: protocormos hinchados sin rompimiento de testa; PHRT: protocormos hinchados con rompimiento de testa; PO: protocormos oxidados; PR: protocormos con rizoides; PF: protocormos con primordio foliar. Barras: desviación estándar.

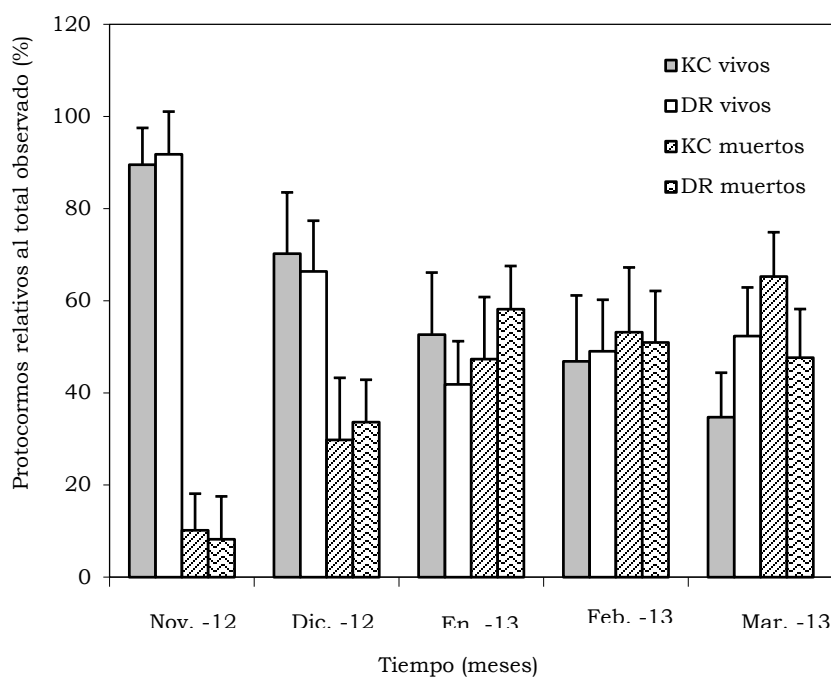


Figura 2. Cinética de la mortalidad de protocormos de *R. grande* en 5 meses del subcultivo 2.

KC: medio de cultivo Knudson C; DR: Dalla Rosa y Laneri modificado con quelato de hierro y agua de coco.

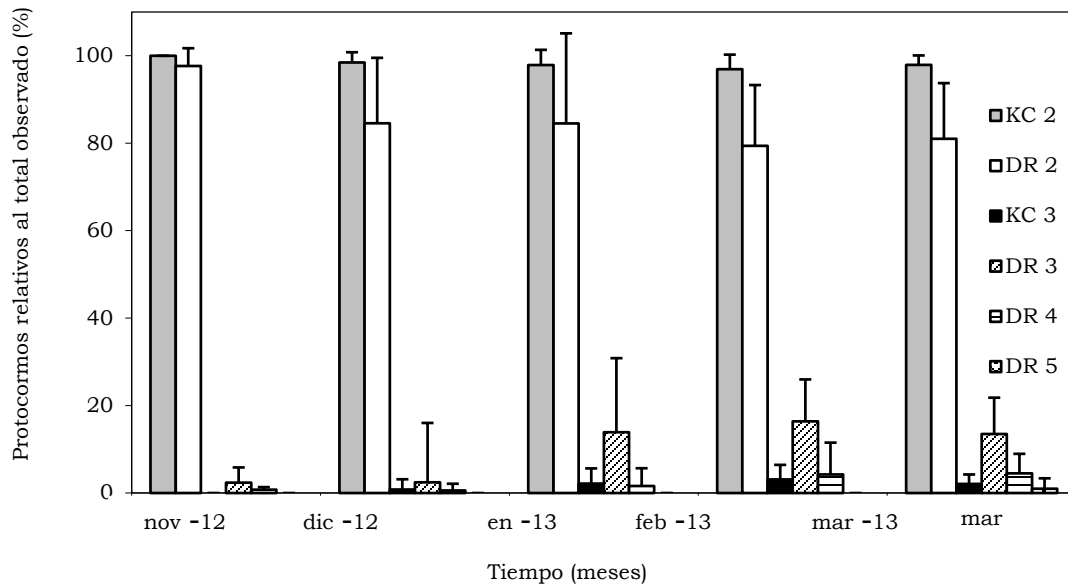


Figura 3. Cinética del desarrollo de los protocormos de *R. grande* según etapas de desarrollo en el subcultivo 2, en los cinco meses finales de evaluación.

KC: medio de cultivo Knudson C; DR: medio de cultivo Dalla Rosa y Laneri con quelato de hierro y agua de coco.

Cuadro 1. Prueba de Chi-cuadrada en el desarrollo de protocormos de *R. grande* a los 60 días en medios de cultivo Knudson C (KC) y Dalla Rosa y Laneri modificado con quelato de hierro y agua de coco (DR).

Medio	PR	PHRT	PH	PO	Total
DR	220	646	322	15	1203
KC	143	573	337	61	1114
total	363	1219	659	76	2317

Chi-Cuadrado de Pearson = 45.537, grados de libertad (GL) = 3, $P < 0.001$

PR: protocormos con rizoides; PHRT: protocormos hinchados con rompimiento de testa; PH: protocormos hinchados sin rompimiento de testa; PO: protocormos oxidados.

Cuadro 2. Prueba de Chi-cuadrada de la tasa de mortalidad, etapas de germinación y regeneración de los protocormos de *R. grande* en cultivo madre, a los 12 meses de edad.

Medio	Estado de protocombro			Etapa de protocombro			Protocombros y meristema			
	PM	PV	Total	E 2	E 3	Total	Pmono	Pbi	Pmulti	Total
DR	93	105	198	89	16	105	6	3	96	105
	40									
KC	6	314	720	295	19	314	131	82	105	318
	49				35					
total	9	419	918	384		419	137	85	201	423
Chi-Cuadrado de Pearson =5.553, Grados de libertad (GL)=1, P = 0.018				Chi-Cuadrado de Pear- son=8.675, GL=1, P = 0.003			Chi-Cuadrado de Pearson=108.009, GL=2, P = 0.001			

¹PM: protocormos muertos; PV: protocormos vivos; E 2: protocormos en etapa de desarrollo 2; E 3: protocormos en etapa de desarrollo 3 en adelante; Pmono: protocormos con un meristema apical; Pbi: protocormos con dos meristemas; Pmulti: protocormos con múltiples meristemas.

Cuadro 3. Prueba de Chi-cuadrada de la tasa de mortalidad, de las etapas de germinación y de la regeneración de los protocormos de *R. grande*, a los 12 meses de edad, en el subcultivo 1.

Medio	Estado de protocormo			Etapa de protocormo			Protocormos y meristema			
	PM	PV	Total	E 2	E 3	Total	Pmono	Pbi	Pmulti	Total
DR	516	376	892	264	112	376	24	16	336	376
KC	403	239	642	238	1	239	114	46	79	239
total	919	615	1534	502	113	615	138	62	415	615
Chi-Cuadrada de Pearson=3.770, GL=1, P = 0.052				Chi-Cuadrada de Pearson=83.774, GL=1, P = 0.001			Chi-Cuadrada de Pearson =212.387, GL=2, P =0.001.			

PM: protocormos muertos; PV: protocormos vivos; E 2: protocormos en etapa de desarrollo 2; E 3: protocormos en etapa de desarrollo 3 en adelante; Pmono: protocormos con un meristema apical; Pbi: protocormos con dos meristemas; Pmulti: protocormos con múltiples meristemas.

Cuadro 4. Prueba de Chi-cuadrada de la tasa de mortalidad y clorosis de *R. grande*, a los 12 meses de edad, en el subcultivo 2 en los medios de cultivo Dalla Rosa y Laneri modificado con quelato de hierro y agua de coco (DR+) y Knudson C (KC).

Medio	PM	PV	Total	PA	Ppa	Pver	Total
DR	181	200	381	7	28	165	200
KC	175	95	270	24	0	71	95
total	356	295	651	31	28	236	295
Chi-Cuadrada de Pearson = 19.103, GL=1, P = 0.001				Chi-Cuadrada de Pearson = 42.814, GL=2, P = 0.001			

¹PM: protocormos muertos; ¹PV: protocormos vivos; [§]PA: protocormos albinos; [°]Ppa: protocormos parcialmente albinos; [°]Pver: protocormos verdes.

Cuadro 5. Prueba de Chi-cuadrada de las etapas de desarrollo y de regeneración de los protocormos de *R. grande*, a los 12 meses de edad, en el subcultivo 2 en los medios de cultivo Dalla Rosa y Laneri modificado con quelato de hierro y agua de coco (DR) y Knudson C (KC).

Medio	E 2	E 3	Total	Pmono	P bi	Pmulti [¶]	Total
DR	172	28	200	48	9	143	200
KC	93	2	95	57	17	21	95
total	265	30	295	105	26	164	295
Chi-Cuadrada de Pearson=9.975, GL=1, p=0.002				Chi-Cuadrada de Pearson=64.829, GL=2, p=0.000			

[†]E 2: protocormos en etapa de desarrollo dos; [¶]E 3: protocormos en etapa de desarrollo tres en adelante; §Pmono: protocormos con un meristemo apical; ¶Pbi: protocormos con dos meristemas; ¶Pmulti: protocormos con múltiples meristemas.