Artículo de investigación

Acta Botanica Mexicana

Germinación y callogénesis *in vitro* de *Cuitlauzina candida* (Orchidaceae)

In vitro germination and callogenesis of *Cuitlauzina candida* (Orchidaceae)

Fabiola Hernández-Ramírez[1,4], Leobardo Iracheta-Donjuan[2], Anne Damon[3]

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: *Cuitlauzina candida* es una orquídea nativa del Soconusco, Chiapas, México, cuya regeneración natural está limitada por su baja tasa de germinación y a la perturbación de su hábitat. El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo de germinación asimbiótica *in vitro* y evaluar el efecto del medio de cultivo y el escotoperiodo sobre la germinación, formación de protocormos, callogénesis y formación de cuerpos similares a los protocormos (PLBs).

Métodos: Se evaluó la viabilidad de semillas inmaduras de *Cuitlauzina candida* mediante la prueba de tetrazolio (TTC). Las semillas se sembraron en cuatro medios de cultivo (Yasuda 10% y 100%, Dalla Rosa & Laneri y Murashige & Skoog) bajo dos regímenes de oscuridad: escotoperiodo de 12h (12 h oscuridad/12 h de luz) y oscuridad continua (24h), en un diseño factorial completamente al azar. El desarrollo se registró en distintas fases.

Resultados clave: La viabilidad de las semillas de *Cuitlauzina candida* fue alta (87.3%). A los 29 días después de la siembra, más de 78% de las semillas alcanzaron la fase de imbibición en todos los tratamientos. La formación inicial de protocormos osciló entre 89.34 y 98.71%. La formación de callos y PLBs ocurrió únicamente en condiciones de oscuridad continua (24 h), particularmente en los medios Yasuda al 100% y Dalla Rosa & Laneri. Los tratamientos con 12 h de luz presentaron altos niveles de oxidación y no desarrollaron PLBs.

Conclusiones: Aunque la germinación y diferenciación temprana ocurrieron eficientemente en diversos medios, la progresión hacia etapas avanzadas estuvo limitada principalmente por la oxidación. La oscuridad continua y la composición del medio de cultivo fueron determinantes para la formación de PLBs, proporcionando bases para optimizar protocolos de propagación.

Palabras clave: escotoperiodo, germinación asimbiótica, medio de cultivo, orquídeas epífitas, propagación *in vitro*.

Abstract:

Background and Aims: *Cuitlauzina candida* is an orchid native to the Soconusco region, Chiapas, Mexico, whose natural regeneration is limited by low germination rates and habitat disturbance. The aim of this study was to establish an asymbiotic *in vitro* germination protocol and evaluate the effect of culture medium and scotoperiod on germination, protocorm formation, callogenesis, and protocorm-like body (PLB) formation.

Methods: The viability of immature seeds of *Cuitlauzina candida* was evaluated using the tetrazolium test (TTC). Seeds were sown on four culture media (Yasuda 10% and 100%, Dalla Rosa & Laneri, and Murashige & Skoog) under two darkness regimes: a 12 h scotoperiod (12 h dark/12 h light) and continuous darkness (24 h), using a completely randomized factorial design. Development was recorded at different stages.

Key results: Seed viability of *Cuitlauzina candida* was high (87.3%). At 29 days after sowing, more than 78 % of the seeds reached the imbibition stage in all treatments. Initial protocorm formation ranged from 89.34% to 98.71%. Callus and PLB formation occurred only under continuous darkness (24 h), particularly in Yasuda 100% and Dalla Rosa & Laneri media. Treatments exposed to 12 h light showed high oxidation levels and failed to develop PLBs.

Conclusions: Although germination and early differentiation occurred efficiently in several media, progression to advanced developmental stages was mainly limited by oxidation. Continuous darkness and culture medium composition were determinant factors for PLB formation, providing a basis for optimizing propagation protocols.

Key words: asymbiotic germination, culture media, epiphytic orchids, *in vitro* propagation, scotoperiod.

[1]Benemérita Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV, 30660 Huehuetán, Chiapas, México.
[2]Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CERI-INIFAP), Campo Experimental Rosario Izapa, 30870 Tuxtla Chico, Chiapas, México.
[3]El Colegio de la Frontera Sur, 30700 Tapachula, Chiapas, México.
[4]Autora para la correspondencia: fabiola.ramirez@unach.mx

Recibido: 27 de julio de 2026.
Revisado: 18 de agosto de 2026.
Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 29 de septiembre de 2026.
Publicado Primero en línea: 23 de octubre de 2026.
Publicado: Acta Botanica Mexicana 133 (2026).

Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

Citar como: Hernández-Ramírez, F., L. Iracheta-Donjuan y A. Damon. 2026. Germinación y callogénesis *in vitro* de *Cuitlauzina candida* (Orchidaceae). Acta Botanica Mexicana 133: e2647. DOI: https://doi.org/10.21829/abm133.2026.2647

e-ISSN: 2448-7589

Introducción

Las orquídeas constituyen uno de los grupos vegetales más diversos y apreciados a nivel mundial, no solo por su valor ornamental, sino también por su importancia en la ecología de las selvas y bosques (Castillo-Pérez et al., 2019). En la región del Soconusco, Chiapas, las orquídeas forman parte del patrimonio biocultural asociado a prácticas tradicionales y a la identidad local (Damon, 2017). Entre ellas, *Cuitlauzina candida* (Lindl.) Dressler & N.H.Williams, una orquídea epífita pequeña que habita bosques mesófilos de montaña y bosques de pino-encino húmedos de la Sierra Madre de Chiapas y Guatemala, entre 1600 y 2100 m s.n.m. (Hágsater y Salazar, 1990). En el Soconusco, también se ha registrado en cafetales tradicionales bajo sombra y fragmentos de bosque mesófilo de montaña (Solano-Gómez et al., 2016), un ecosistema que actualmente enfrenta procesos acelerados de fragmentación y pérdida de cobertura vegetal (Damon, 2013).

La conservación de *Cuitlauzina candida* se ve limitada por su baja tasa de germinación natural, atribuida a la dependencia simbiótica con los hongos endófitos formadores de micorrizas, relación simbiótica indispensable para la germinación en condiciones naturales, que es afectada por la degradación del hábitat, la contaminación y la aplicación de plaguicidas que en su conjunto reducen las posibilidades de regeneración poblacional (McCormick et al., 2018). Ante este escenario, el desarrollo de protocolos eficientes para la propagación *in vitro* se convierte en una estrategia prioritaria para la restauración y conservación *ex situ* (Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón, 2016).

La germinación asimbiótica *in vitro* ofrece ventajas significativas frente a la germinación simbiótica, al permitir la producción masiva de plántulas en condiciones controladas, reducir la dependencia de hongos específicos y acelerar los programas de conservación (Damon, 2013). Sin embargo, la información disponible sobre protocolos de germinación, formación de protocormos y desarrollo morfogénico *in vitro* para *Cuitlauzina candida* es limitada, lo que representa una brecha de conocimiento en la propagación de especies nativas de alto valor ecológico (Menchaca-García et al., 2012).

Una característica distintiva de la germinación de las semillas de las orquídeas es la formación de los protocormos, que se considera una fase previa a la verdadera germinación y que efectivamente consisten en células madre no diferenciadas (Yeung, 2017). En el cultivo *in vitro* se logra obtener cuerpos similares a los protocormos (PLBs). Estos provienen de tejidos somáticos, por lo que se considera un tipo de propagación vegetativa, o clonación, con potencial para la multiplicación masiva (Fang et al., 2016).

Las condiciones ambientales de luz, temperatura y la disponibilidad de nutrimentos son factores determinantes para la germinación y las primeras fases de desarrollo de las orquídeas (Navarro Álvarez et al., 2025), ya que influyen en la activación metabólica del embrión y en la formación de los protocormos y PLBs (Naderi Boldaji et al., 2023). De igual forma, para la propagación *in vitro*, la formulación del medio de cultivo, que incluye concentración de sales, la presencia de reguladores de crecimiento y aditivos orgánicos como el agua de coco, puede acelerar o inhibir procesos clave como la imbibición, la ruptura de la testa y la organogénesis (Hwang et al., 2024). Comprender estas interacciones permite optimizar protocolos *in vitro* y reducir los efectos adversos como la oxidación, y así asegurar una propagación eficiente y estable para fines de conservación. Por tal razón, el objetivo de este estudio fue establecer un protocolo de germinación asimbiótica *in vitro* y evaluar el efecto del medio de cultivo y el escotoperiodo sobre las fases iniciales de germinación y las respuestas morfogénicas observadas durante el cultivo *in vitro.*

Materiales y Métodos

Sitio de colecta

El sitio de colecta se localiza en el municipio de Unión Juárez, en la región del Soconusco, Chiapas, México. La zona se caracteriza por la presencia de cafetales bajo sombra, vegetación secundaria y fragmentos de bosque mesófilo de montaña (INEGI, 2010; Solano-Gómez et al., 2016). Las cápsulas de semillas utilizadas en este estudio se colectaron de individuos de *Cuitlauzina candida* (Fig. 1) en el Orquideario "Santo Domingo" (Fig. 2), anexo del Jardín Botánico Regional del Soconusco del Colegio de la Frontera Sur, ubicado a una elevación aproximada de 1100 m.

Material biológico y desinfección

Se colectaron ocho cápsulas de semillas inmaduras de *Cuitlauzina candida* antes de la dehiscencia (3 cm de longitud × 1 cm de diámetro). De acuerdo con la información fe-

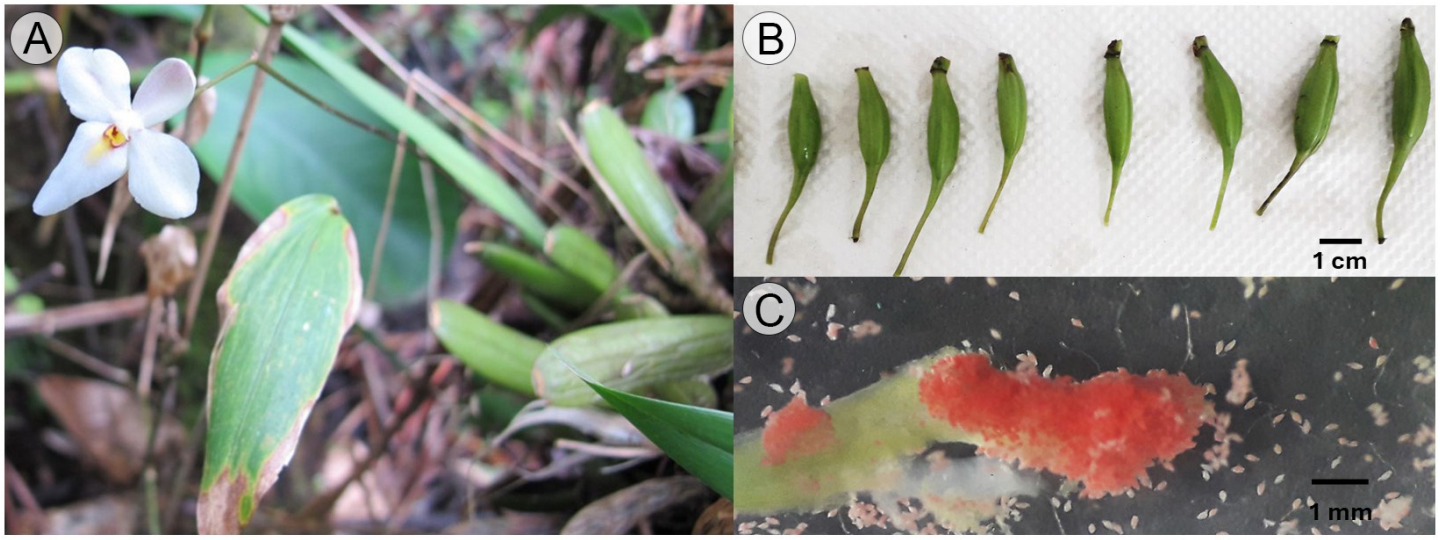


Figura 1: Material biológico utilizado en el presente estudio de *Cuitlauzina candida* (Lindl.) Dressler & N.H.Williams (Orchidaceae). A. flor de un individuo en su habitat natural; B. cápsulas inmaduras colectadas antes de la dehiscencia; C. semillas durante la prueba de viabilidad con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC), donde la tinción roja indica tejido viable. Fotografías: Anne Damon (A) y Fabiola Hernández-Ramírez (B, C).

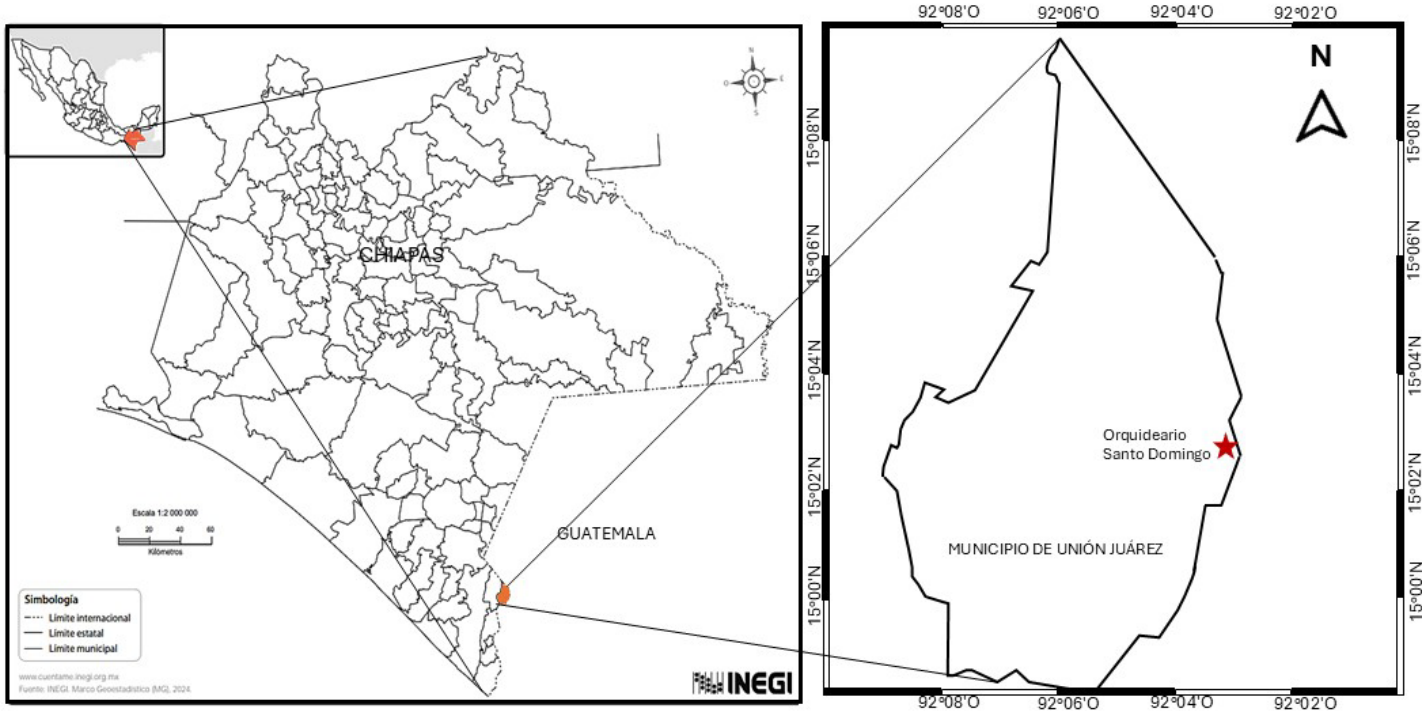


Figura 2: Localización del área de estudio en el municipio Unión Juárez, región del Soconusco, Chiapas, México. La estrella indica el sitio de colecta de las cápsulas de *Cuitlauzina candida* (Lindl.) Dressler & N.H.Williams en el Orquideario "Santo Domingo". El mapa fue elaborado con información cartográfica del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2024).

nológica disponible para la especie, la floración ocurre principalmente durante marzo y probablemente abril (Hágsater y Salazar, 1990). Este patrón coincide con un registro local de individuos en floración observado el 24 de marzo de 2011 (A. Damon, comunicación personal). Con base a ello, los frutos colectados probablemente correspondieron a cápsulas con aproximadamente 5 a 8 meses de desarrollo. Las cápsulas se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología

del Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Tuxtla Chico, Chiapas.

Las cápsulas se desinfestaron mediante lavado con jabón líquido y enjuague con agua corriente a 25 °C, seguido de desinfección con alcohol al 96%. Posteriormente, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, con dos gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución, durante 15 minutos en agitación constante. Después, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Finalmente, las cápsulas se trataron con una solución bactericida de cefotaxima al 1% durante 5 minutos, se recubrieron con fungicida Mancozeb en polvo y se secaron en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar.

Siembra y condiciones de cultivo

Bajo condiciones asépticas, las cápsulas se abrieron mediante corte longitudinal y las semillas se suspendieron en 50 ml de agua destilada estéril con agitación constante. Se distribuyeron alícuotas de 500 µl de la suspensión sobre la superficie de medios de cultivo semisólidos en cajas Petri (60 × 15 mm).

Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de cultivo con temperatura controlada a 26 ± 1 °C bajo dos condiciones de escotoperiodo: 12 h de oscuridad (con iluminación proporcionada por lámparas LED de luz blanca fría, 43 µmol m^{-2} s^{-1} durante la fase de luminosa) y oscuridad continua (24 h).

Medios de cultivo

Se evaluó la germinación de *Cuitlauzina candida* en cuatro medios de cultivo que se describen a continuación:

El medio Yasuda al 10% (Y10) consistió en sales inorgánicas al 10% y componentes orgánicos estándar: mioinositol (100 mg l^{-1}), ácido nicotínico (1 mg l^{-1}), piridoxina (1 mg l^{-1}) y tiamina (10 mg l^{-1}), suplementado con 0.112 mg l^{-1} de 6-bencilaminopurina (BAP), 30 g l^{-1} de sacarosa, pH 6.3 y 5.2 g l^{-1} de Phytagel (Yasuda et al., 1985).

El medio Yasuda al 100% (Y100) incluyó las mismas sales y componentes al 100% y 1.125 mg l^{-1} de BAP (Yasuda et al., 1985; Torres-González et al., 2011).

El medio Dalla Rosa & Laneri (DR) se preparó con la formulación base, suplementado con 150 ml l^{-1} de agua de coco, 20 g l^{-1} de sacarosa, pH 5.5 y 8 g l^{-1} de agar (Dalla y Laneri, 1977).

El medio Murashige & Skoog (MS) consistió en su formulación original, suplementado con 30 g l^{-1} de sacarosa, pH 5.8 y 5.2 g l^{-1} de Phytagel (Murashige y Skoog, 1962).

Todos los medios se esterilizaron a 120 °C y 1.1 kg cm^{-2} durante 20 minutos en un autoclave All American 1941X (Wisconsin, EUA) y se vertieron en cajas Petri estériles con un volumen de 10 ml por unidad.

Prueba de viabilidad (TTC)

La viabilidad de las semillas se evaluó mediante la prueba de tetrazolio. La prueba se realizó utilizando una submuestra de 1.5 ml, obtenida de la misma suspensión de semillas empleada para el establecimiento de los tratamientos de germinación. Esta submuestra se dividió en tres alícuotas de 500 µl, consideradas como repeticiones de la prueba. Tras la sedimentación, se retiró el sobrenadante y se añadieron 1.5 ml de una solución de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (1 g l^{-1}).

Las muestras se incubaron en oscuridad durante 24 h y posteriormente se observaron en un microscopio estereoscópico Stereo Discovery V8 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania). Se consideraron viables las semillas cuyo embrión se tiñó de rojo, no viables aquellas con embrión blanco y vanas las que carecían de embrión. El porcentaje de viabilidad se estimó como el promedio de diez conteos en diferentes campos de visión.

Diseño experimental

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4 × 2, correspondiente a cuatro medios de cultivo y dos condiciones de escotoperiodo (12 y 24 h), lo que generó ocho tratamientos. La evaluación de cada tratamiento incluyó cuatro repeticiones, cada una evaluada sobre un área de 1 cm^2 del medio, con aproximadamente 125 semillas.

Variables evaluadas

El desarrollo se evaluó con base en las fases descritas por Damon et al. (2004), modificadas para este estudio: Fase 1 (semillas con embrión visible antes del inicio de la germinación), Fase 2 (imbibición) y Fase 3 (ruptura de la testa y

formación inicial del protocormo). Debido a que el experimento concluyó con las etapas de callogénesis y formación de cuerpos semejantes a los protocormos (PLBs), estas respuestas morfogénicas fueron registradas de manera independiente y no como fases subsecuentes obligatorias del proceso germinativo. El porcentaje de cada fase se calculó como la proporción de semillas que alcanzaron dicha etapa respecto al total observado en cada repetición, multiplicado por 100. La oxidación se evaluó mediante cambios de coloración del tejido, considerando como oxidado el material que presentó coloración café sin desarrollo morfogénico. La callogénesis se registró como la formación de masas celulares indiferenciadas sin progresión directa a PLBs.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) bajo un diseño factorial. Previo al análisis se verificaron los supuestos de normalidad de los residuos y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Cuando se detectaron diferencias significativas, las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los análisis se realizaron utilizando el software R v. 4.1.2 (R Core Team, 2021).

Resultados

Prueba de TTC y pregerminación de semillas de *Cuitlauzina candida*

La prueba de tetrazolio (TTC) indicó alta viabilidad de las semillas inmaduras de *Cuitlauzina candida* (87.3%). La viabilidad determinada mediante TTC corresponde a una evaluación fisiológica inicial registrada a las 24 h de exposición al reactivo, mientras que las observaciones de germinación y desarrollo morfológico fueron registradas posteriormente durante el cultivo *in vitro*. Con base en las evaluaciones realizadas, la Fase 2 (imbibición) se registró en aproximadamente 29 días después de la siembra (dds), mientras que la Fase 3 (ruptura de testa y formación inicial del protocormo) se observó alrededor de 20 días después. La formación de callos ocurrió a los 126 dds y la presencia de PLBs se registró aproximadamente 80 días después. Estos tiempos corresponden a observaciones del proceso y no a valores promedio entre tratamiento (Cuadro 1).

A los 29 días dds, más de 78% de las semillas alcanzaron la Fase 2 (imbibición) en todos los tratamientos (Cuadro 1). Los porcentajes oscilaron entre 78.86 ± 4.24% en DR-24h y 96.65 ± 0.92% en MS-24h. Los tratamientos MS-24h y MS-12h, Y10-12h, Y100-24h y DR-12h presentaron los valores más altos de imbibición (89.75-96.65%), mientras que Y10-24h y Y100-12h mostraron valores intermedios (88.99-89.28%). Aunque se detectaron diferencias estadísticas significativas entre algunos tratamientos, la mayoría compartió grupos estadísticos similares, reflejando una elevada proporción de semillas imbibidas independientemente del medio de cultivo y del escotoperiodo.

A los 49 días dds, se registraron porcentajes correspondientes a la Fase 3 (ruptura de la testa y formación inicial del protocormo) en todos los tratamientos (Cuadro 1). Los tratamientos Y10-12h, Y10-24h, MS-12h y MS-24h presentaron los mayores porcentajes de semillas en Fase 3 (>96%), sin diferencias significativas entre ellos ($p \leq 0.05$). Los tratamientos Y100-12h, Y100-24h y DR-12h mostraron valores ligeramente menores, aunque estadísticamente similares a los tratamientos que presentaron los porcentajes más altos de semillas en Fase 3. En contraste, el tratamiento DR-24h presentó el menor porcentaje de semillas en Fase 3 (89.34%), aunque la diferencia fue menos marcada en comparación con la observada en la Fase 2.

El intervalo entre la Fase 2 y la evaluación de la Fase 3 fue de aproximadamente 20 días. En general, la mayoría de los tratamientos presentó porcentajes elevados de semillas que alcanzaron la Fase 3. Aunque se observaron ligeras variaciones entre medios de cultivo y escotoperiodo (Cuadro 1), estas fueron menores que las registradas entre las evaluaciones de la Fase 1 a la Fase 2.

Efecto del medio y del escotoperiodo sobre la Fase 3

Aunque la mayoría de los tratamientos presentó porcentajes elevados de semillas en Fase 3 (Cuadro 1), únicamente los tratamientos Y100-24h y DR-24h desarrollaron respuestas morfogénicas posteriores a la formación inicial del protocormo. En ambos tratamientos se registró callogénesis (32.75%), observándose posteriormente la diferenciación

Cuadro 1: Progresión temporal de fases morfológicas durante la germinación *in vitro* de semillas inmaduras de *Cuitlauzina candida* (Lindl.) Dressler & N.H.Williams evaluadas en distintos momentos de desarrollo bajo diferentes medios de cultivo y condiciones de escotoperiodo. Valores expresados como media ± EE de cuatro réplicas de 125 semillas. PLBs= Protocorm-Like Bodies (cuerpos semejantes a protocormos). * Valores expresados como media ± EE. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba de Tukey, p≤0.05). Tratamientos que comparten al menos una letra no difieren significativamente.

Tratamiento	Fase 2 (%)	Fase 3 (%)			Oxidación máxima (%)
	Imbibición (29 dds)	Ruptura testa y formación inicial del protocormo (49 dds)	Callogénesis (126 dds)	PLBs (06 dds)	
Y10-12h	91.18 ± 3.43* a	98.71 ± 1.14 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 c
Y10-24h	89.28 ± 0.69 ab	98.00 ± 0.92 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 c
Y100-12h	88.99 ± 1.73 ab	92.40 ± 1.44 ab	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00	80.00 ± 2.6 a
Y100-24h	90.93 ± 1.34 a	93.58 ± 0.86 ab	32.75 ± 4.11 a	91.46 ± 2.03	0.00 ± 0.00 c
DR-12h	89.75 ± 2.45 a	94.17 ± 1.71 ab	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00	93.00 ± 5.2 a
DR-24h	78.86 ± 4.24 b	89.34 ± 3.03 b	32.75 ± 1.93 a	72.12 ± 7.93	0.00 ± 0.00 c
MS-12h	92.79 ± 0.60 a	96.34 ± 1.71 ab	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00	72.00 ± 1.3 b
MS-24h	96.65 ± 0.92 a	96.46 ± 0.79 ab	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 c

hacia cuerpos semejantes a protocormos (PLBs). Los tratamientos Y100-24h y DR-24h fueron los únicos que presentaron esta respuesta, mientras que los demás tratamientos no desarrollaron callos ni PLBs.

En contraste, los tratamientos con 12 horas de luz no registraron formación de PLBs y presentaron altos niveles de oxidación (72-93%). Las etapas de germinación, callogénesis y formación de PLBs se muestran en la figura 3, donde se observa la secuencia temporal del desarrollo de *Cuitlauzina candida* en el tratamiento de Y100-24h.

Oxidación y estabilidad del tejido

Los tratamientos sometidos a escotoperiodo de 12 h de luz presentaron altos niveles de oxidación durante la Fase 3, lo que se observó como pardeamiento progresivo del tejido sin desarrollo morfogénico posterior. En estos tratamientos, la oxidación máxima alcanzó valores de 80% en Y100-12h, 93% en DR-12h y 72% en MS-12h (Cuadro 1), lo que coincidió con la ausencia de callogénesis y formación de PLBs.

En contraste, los tratamientos mantenidos bajo condiciones de oscuridad continua (24 h) mostraron una oxidación baja o nula en todos los medios evaluados (Cuadro 1). Bajo estas condiciones, los protocormos conservaron su estabilidad, lo que permitió la inducción de callos y su posterior diferenciación en PLBs, particularmente en los medios de Yasuda al 100% y Dalla Rosa & Laneri, donde se registró callogénesis en el 32.7% del tejido evaluado y 91.46% de PLBs en el tratamiento Y100-24h. Los callos obtenidos en estos tratamientos se mantuvieron viables y proliferativos tras su subcultivo en los mismos medios, durante el periodo de evaluación no se observó la formación de plántulas.

Discusión

Imbibición y formación de protocormos

La imbibición constituye una de las primeras etapas observables durante la germinación de semillas de orquídeas, ya que permite la rehidratación de los tejidos embrionarios mediante la absorción de agua (Jolman et al., 2022). Aunque este proceso puede ocurrir independientemente de la viabilidad de la semilla, representa un requisito previo para la activación metabólica y la progresión hacia etapas posteriores del desarrollo (Carrera-Castaño et al., 2020). En este estudio, los elevados porcentajes de semillas imbibidas registrados en todos los tratamientos indican que las condiciones del cultivo permitieron mantener la hidratación de los tejidos y el seguimiento posterior de las fases de desarrollo. Este proceso es esencial porque desencadena

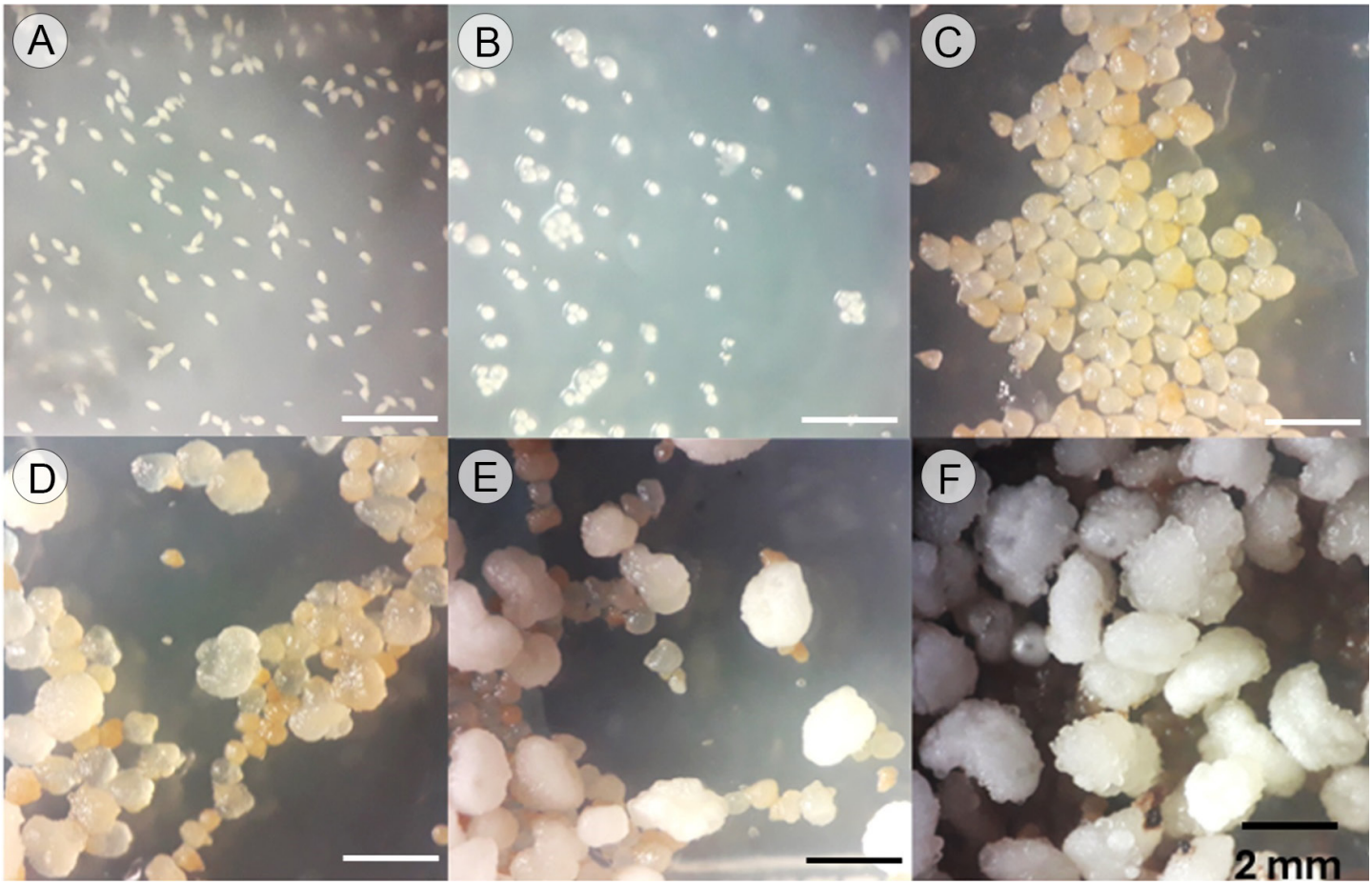


Figura 3: Secuencia temporal del desarrollo *in vitro* de *Cuitlauzina candida* (Lindl.) Dressler & N.H.Williams desde la siembra hasta la formación de estructuras avanzadas en el tratamiento Yasuda 100 + 1.125 mg l^{-1} BAP. A. semillas recién sembradas en medio de cultivo (Fase 1); B. inicio de imbibición o hinchamiento de embrión (Fase 2); C. ruptura de testa y formación inicial del protocormo (Fase 3); D. formación de masas celulares compatibles con callogénesis; E. incremento de volumen y diferenciación de estructuras protocórmicas; F. presencia simultánea de protocormos avanzados y cuerpos semejantes a protocormos (PLBs). Barra = 2 mm.

la síntesis de proteínas y enzimas que regulan la ruptura de la testa y la formación del protocormo (Fase 3), como lo describe Yeung (2017), quien destaca que el embrión de orquídeas está estructuralmente programado para generar un protocormo funcional. La respuesta observada en medios enriquecidos con BAP y agua de coco sugiere que, además de la disponibilidad hídrica, la presencia de reguladores de crecimiento y compuestos orgánicos acelera la diferenciación celular y favorece la formación de estructuras morfogénicas. Estos resultados coinciden con reportes previos que destacan la interacción entre factores físicos (agua, luz) y químicos (fitohormonas) como determinantes para la germinación, la formación de protocormos y las respuestas morfogénicas observadas durante el cultivo *in vitro* de orquídeas (Damon et al., 2004; Samala et al., 2014). En este trabajo, el medio DR, que contiene agua de coco, aportó compuestos orgánicos y fitohormonas que aceleraron la división celular y la diferenciación. Lo anterior fue asociado a que las citoquininas, como la BAP, son reconocidas por inducir la proliferación celular y activar meristemos (Real-Carrasco et al., 2007). La literatura confirma que la combinación de citoquininas (BA) con auxinas incrementa la eficiencia de inducción de PLBs en orquídeas (Samala et al., 2014). Asimismo, la ausencia de luz durante la fase inicial y el uso de aditivos como agua de coco han sido reportados como factores críticos para la inducción de callos y cuerpos semejantes a protocormos (PLBs) en diversas especies de orquídeas (Gätjens-Boniche et al., 2018).

Oxidación

La oxidación de embriones y protocormos en cultivo *in vitro* constituye un obstáculo importante para la continuidad del desarrollo, ya que puede limitar la diferenciación hacia estructuras morfogénicas posteriores. En este estudio, la oxidación no se presentó de manera uniforme entre tratamientos. Los mayores niveles se registraron en los tratamientos Y100-12h, DR-12h y MS-12h, mientras que en Y10-12h y en todos los tratamientos mantenidos bajo oscuridad continua no se observaron tejidos oxidados. Estos resultados sugieren que la oxidación observada respondió a una interacción entre la composición del medio de cultivo y las condiciones de iluminación, más que exclusivamente a la presencia de luz. Este fenómeno se ha asociado con el estrés fotooxidativo, donde la intensidad lumínica puede afectar procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo de los tejidos (Samala et al., 2014). Estos resultados coinciden parcialmente con reportes previos que señalan la ausencia de luz como un factor favorable para la formación de callos y cuerpos semejantes a protocormos (PLBs) en diversas especies de orquídeas (Gätjens-Boniche et al., 2018; Guo et al., 2024; Hernández-Ramírez et al., 2023). Sin embargo, los resultados también sugieren que la respuesta estuvo influenciada por la composición del medio de cultivo.

Callogénesis y formación de PLBs

La formación de cuerpos semejantes a protocormos (PLBs) en orquídeas representa una alternativa para la regeneración vegetal, especialmente en especies con baja eficiencia germinativa (Cardoso et al., 2020), por lo menos bajo las condiciones actuales de fragmentación y contaminación, como es el caso de *Cuitlauzina candida*. No obstante, la inducción de PLBs puede ocurrir de manera directa a partir de los protocormos iniciales o, en algunos casos, de forma indirecta mediante una fase callogénica previa (Cardoso et al., 2020; Lee et al., 2013). En este trabajo, se observó la formación de callo exclusivamente en medios Yasuda al 100% más BAP y Dalla Rosa & Laneri suplementado con agua de coco, bajo condiciones de oscuridad continua. La callogénesis observada probablemente respondió a una interacción entre la composición del medio de cultivo, la concentración hormonal, la presencia de compuestos orgánicos como el agua de coco, las condiciones de oscuridad y la respuesta fisiológica particular de *Cuitlauzina candida*. Este comportamiento coincide con estudios en especies de *Phalaenopsis* Blume y *Paphiopedilum* Pfitzer, donde la oscuridad y el uso de aditivos orgánicos con compuestos que pueden aportar reguladores de crecimiento, incluyendo auxinas y citoquininas, influyen en la inducción de PLBs (Samala et al., 2014; Guo et al., 2024).

Los callos presentaron características de tejidos desdiferenciados, como crecimiento irregular y coloración traslúcida. Posteriormente, se observó la presencia simultánea de callos y PLBs en los tratamientos Y100-24h y DR-24h, lo que sugiere una posible vía de regeneración indirecta. Sin embargo, se requieren estudios anatómicos o histológicos para confirmar el origen de estas estructuras.

Este hallazgo es relevante porque demuestra la capacidad de los medios de cultivo evaluados para inducir respuestas morfogénicas complejas en *Cuitlauzina candida*. Asimismo, la formación simultánea de callos y PLBs observada en los tratamientos Y100-24h y DR-24h aporta información útil para comprender la respuesta morfogénica de esta especie bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Conclusiones

El presente estudio estableció un protocolo asimbiótico para la germinación *in vitro* de *Cuitlauzina candida*, una especie nativa de alto valor ecológico del Soconusco, Chiapas. Los resultados demostraron que la viabilidad de las semillas inmaduras es elevada, lo que confirma su idoneidad para la propagación *in vitro*. Entre los factores evaluados, la composición del medio y las condiciones de escotoperiodo fueron determinantes en el desarrollo de las fases evaluadas. Los medios Yasuda al 100 % suplementados con BAP y Dalla Rosa & Laneri con agua de coco favorecieron la formación de protocormos, callogénesis y desarrollo de PLBs bajo condiciones de oscuridad continua.

Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de las respuestas germinativas y morfogénicas de *Cuitlauzina candida* bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Se recomienda continuar el seguimiento de los materiales obtenidos para evaluar etapas posteriores del desarrollo y optimizar futuros protocolos de propagación.

Contribución de autores

Administración del proyecto: AD; Análisis formal: FHR, LID; Conceptualización: FHR, LID, AD; Curación de datos: FHR; Investigación: FHR; Metodología: LID; Obtención de financiamiento: AD; Recursos: LID, AD; Supervisión: AD, LID; Validación: LID; Redacción – borrador original: FHR, LID, AD; Redacción – revisión y edición: FHR, LID, AD.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por The Orchid Growers´Association, Inc· (TOGA), a través del Proyecto "Restoration of populations of *Cuitlauzina candida* (Lindl.) Dressler & N.H.Williams, starting with protocols for the asymbiotic, *in vitro* propagation by seed, and laboratory pre-aclimatization of young plants".

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa (INIFAP-CERI) por el apoyo técnico proporcionado durante el desarrollo de la investigación. Asimismo, agradecen a los revisores anónimos y a los editores por sus comentarios y sugerencias, que contribuyeron a mejorar la calidad del manuscrito.

Declaración de disponibilidad de datos

El conjunto de datos que respalda los resultados de este estudio fue depositado en SciELO Data y está disponible en: https://doi.org/10.48331/SCIELODATA.GMCGWZ.

Declaración de uso de Inteligencia Artificial

No se utilizó Inteligencia Artificial en la elaboración del manuscrito, en ninguno de sus apartados.

Literatura citada

Cardoso, J. C., C. A. Zanello y J.-T. Chen. 2020. An Overview of Orchid Protocorm-Like Bodies: Mass Propagation, Biotechnology, Molecular Aspects, and Breeding. International Journal of Molecular Sciences 21(3): 985. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms21030985

Carrera-Castaño, G., J. Calleja-Cabrera, M. Pernas, L. Gómez y L. Oñate-Sánchez. 2020. An updated overview on the regulation of seed germination. Plants 9(6): 703. DOI: https://doi.org/10.3390/plants9060703

Castillo-Pérez, L. J., D. Martínez-Soto, J. J. Maldonado-Miranda, A. J. Alonso-Castro y C. Carranza-Álvarez. 2019. The endemic orchids of Mexico: a review. Biologia 74: 1-13. DOI: https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x

Dalla, R. M. y U. Laneri. 1977. Modification of nutrient solutions for germination and growth "*in vitro*" of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. American Orchid Society Bulletin 46: 813-820.

Damon, A. 2013. Conservation status and strategies for the preservation of orchids in the Soconusco region of southeast Mexico. Lankesteriana 13(1-2): 27-31. DOI: https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11530

Damon, A. 2017. Estrategia para el rescate, conservación y aprovechamiento sustentable de las orquídeas (Orchidaceae) en el sureste de México. Agro Productividad 10(6): 25-30. DOI: https://doi.org/10.22004/AG.ECON.352685

Damon, A., E. Aguilar-Guerrero, L. Rivera y V. Nikolaeva. 2004. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 10(2): 195-203. DOI: https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2002.05.025

Fang, S. C., J. C. Chen y M.J. Wei. 2016. Protocorms and Protocorm-Like Bodies Are Molecularly Distinct from Zygotic Embryonic Tissues in *Phalaenopsis aphrodite*. Plant Physiology 171(4): 2682-2700. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.16.00841

Gätjens-Boniche, O., C. L. Acuña-Matamoros, W. Montero-Carmona, C. Díaz y S. Torres. 2018. Propagación masiva y formación de callos protocórmicos de Vainilla a partir de ápices radicales. Polibotánica 45(23): 157-180. DOI: https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.12

Guo, B., H. Chen, Y. Yin, W. Wang y S. Zeng. 2024. Tissue Culture via Protocorm-like Bodies in an Orchids Hybrids *Paphiopedilum* SCBG Huihuang90. Plants 13(2): 197. DOI: https://doi.org/10.3390/plants13020197

Hágsater, E. y G. A. Salazar. 1990. *Palumbina candida*. En: E. Hágsater y G. A. Salazar (eds.). Icones Orchidacearum.

Fascicle I. Orchids of Mexico. Part 1. Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Plate 82. México, D.F., México. https://herbarioamo.org/index_archivos/Fascicle1.pdf (consultado septiembre de 2026).

Hernández-Ramírez, F., L. Iracheta-Donjuan, A. A. Damon, S. P. Fernández-Pavía y K. Guillén-Navarro. 2023. Efecto del medio de cultivo y escotoperiodo en la germinación de semillas y crecimiento *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae) Polibotánica 56: 151-170. DOI: https://doi.org/10.18387/polibotanica.56.8

Hwang, J. E., H. B. Park, D. Y. Jeon, H. J. Park, S. Kim, C. W. Lee, Y. J. Kim y Y. J. Yoon. 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. DOI: https://doi.org/10.3390/plants13192721

INEGI. 2010. Compendio de información geográfica municipal 2010. Unión Juárez, Chiapas. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Aguascalientes, México. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/07/07105.pdf (consultado septiembre de 2026).

INEGI. 2024. Marco Geoestadístico, versión 2024. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Aguascalientes, México. https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=889463807469 (consultado septiembre de 2026).

Jolman, D., M.I. Batalla, A. Hungerford, P. Norwood, N. Tait y L. E, Wallace. 2022. The challenges of growing orchids from seeds for conservation: An assessment of asymbiotic techniques. Applications in Plant Sciences 10(5):e11496. DOI: https://doi.org/10.1002/aps3.11496

Lee, Y. I., S. T. Hsu y E. C. Yeung. 2013. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. American Journal of Botany 100(11): 2121-2131. DOI: https://doi.org/10.3732/ajb.1300193

McCormick, M., F. Whigham y A. Canchani-Viruet. 2018. Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. New Phytologist 219(4): 1207-1215. DOI: https://doi.org/10.1111/nph.15223

Menchaca-García, R. A., M. A. Lozano-Rodríguez y L. Sánchez-Morales. 2012. Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 3(13): 9-16.

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15(3): 473-497. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Naderi Boldaji, H., S. Dianati Daylami y K. Vahdati. 2023. Use of light spectra for efficient production of PLBs in temperate terrestrial orchids. Horticulturae 9(9): 1007. DOI: https://doi.org/10.3390/horticulturae9091007

Navarro Álvarez, F., P. Martínez García, I. Salmeron-Santiago, M. E. Pedraza-Santos y A. T. Chávez. 2025. Germinación de orquídeas: la clave está en la relación con los hongos. Revista Digital Universitaria 26(1): 1-9. DOI: https://doi.org/10.22201/ceide.16076079e.2025.26.1.7

Pérez-Martínez, B. A. y S. L. Castañeda-Garzón. 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. Biotecnología Vegetal 16(3): 143-151.

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. https://www.r-project.org/ (consultado noviembre de 2025).

Real-Carrasco, S., D. Moreno-Martínez y R. A. Menchaca-García. 2007. Cultivo de protocormos de *Mormodes maculata* var. unicolor L.O. Williams (Orchidaceae). Foresta Veracruzana 9(1): 55-59.

Samala, S., S. Te-Chato, S. Yenchon y K. Thammasiri. 2014. Protocorm-like body proliferation of *Grammatophyllum speciosum* through asymbiotic seed germination. ScienceAsia 40: 379-383. DOI: https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2014.40.379

Solano-Gómez, R., A. Damon, G. Cruz-Lustre, L. Jiménez-Bautista, S. Avendaño-Vázquez, V. Bertolini, R. Rivera-García y G. Cruz-García. 2016. Diversity and distribution of the orchids of the Tacaná-Boquerón region, Chiapas, Mexico. Botanical Sciences 94(3): 625-656. DOI: https://doi.org/10.17129/botsci.589

Torres-González, M. J., J. F. Aguirre-Medina y L. Iracheta-Donjuan. 2011. Germinación de semillas y obtención de plántulas de *Vanilla planifolia* Andrews en condiciones *in vitro*. Agroproductividad 2: 3-8.

Yasuda, T., Y. Fujii y T. Yamaguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiology 26(3): 595-597. DOI: https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076946

Yeung, E. C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. Botanical Studies 58: 33. DOI: https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4