TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

HORAS FRÍO EN LA PRESERVACIÓN DE LA SEMILLA Y SU GERMINACIÓN DE ORQUÍDEA *Prosthechea baculus* (Rchb. F.) W.E. HIGGINS

Elena Isabel Serrano Cortés[1]; Maricruz Martínez Lara[2]; Estéfana Alvarado Bárcenas[3]; Josefina Muñoz Ledo[3]; Blanca Cecilia López Ramírez[3]; Francisco Chablé Moreno[3]

[1]Estudiante de agronomía TecNM-Roque, [2]Docente TecNM-Roque, [3]Prof-Investigador TecNM-Roque, Correo de correspondencia: fchable4oct@hotmail.com

RESUMEN

Las orquídeas es un amplio grupo de especies de importancia ornamental. Su reproducción sexual en condiciones naturales presenta un nivel de germinación del 1%, la técnica de cultivo de tejidos vegetales puede incrementar su propagación masiva, el fruto lodículo contiene las semillas, con viabilidad reducida, una alternativa es la estratificación para incrementar la viabilidad y aumentar la multiplicación sexual masiva. La formación de rizoides y hojas de las plántulas después de ser sometidas a estratificación de las semillas, aunque retrasa las etapas de la plántula, incrementa su multiplicación sexual. El trabajo se desarrolló en TecNM-Roque, se estratificaron las semillas (7ºC). La siembra aséptica se realizó en el medio MS (1962) al 50% de concentración, se ajustó el pH a 5.6 agregando 3% de sacarosa y 0.6% de Agar bacteriológico. El diseño fue completamente al azar con cinco tratamientos donde se evaluó la acumulación de 240 hasta 2040 HF en el almacenamiento de la semilla en refrigeración y se evaluó el desarrollo de las plántulas, los datos se analizaron con el paquete SAS, mediante un ANAVA y la prueba de comparación de medias (Tukey α 0.05). El ANAVA arrojó diferencias altamente significativas, los resultados muestran que las semillas estratificadas con menor acumulación de horas frío presentan menor tiempo de germinación, la etapa de desarrollo desde la germinación hasta la presencia de hojas y raíces, mientras que a mayor cantidad de horas frío se retrasa la germinación de las semillas y el desarrollo de la plántula.

Palabras claves: *Orquídea, Prosthechea baculus, germinación, estratificación.*

ABSTRACT

TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

Orchids are a large group of species of ornamental importance. Their sexual reproduction under natural conditions presents a germination level of 1%. The technique of plant tissue culture can increase their massive propagation. The lodicule fruit contains the seeds, with reduced viability. An alternative is stratification to increase viability and increase massive sexual multiplication. The formation of rhizoids and leaves of the seedlings after being subjected to seed stratification, although it delays the seedling stages, increases their sexual multiplication. The work was developed at TecNM-Roque, the seeds were stratified (7 ° C). Aseptic sowing was carried out in MS medium (1962) at 50% concentration, the pH was adjusted to 5.6 by adding 3% sucrose and 0.6% bacteriological agar. The design was completely randomized with five treatments where the accumulation of 240 to 2040 HF in seed storage under refrigeration and the development of the seedlings was evaluated, the data were analyzed with the SAS package, through an ANAVA and the comparison of means test (Tukey α 0.05). The ANAVA showed highly significant differences, the results show that stratified seeds with fewer accumulated cold hours have a shorter germination time, the stage of development from germination to the presence of leaves and roots, while with greater amounts of cold, seed germination and seedling development are delayed.
***Keywords**: Orchid, Prosthechea baculus, germination, stratification.*

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es considerada como una de las familias más numerosas del reino vegetal, comprende entre 25 mil a 30 mil especies. En México se calcula que existen alrededor de 1260 especies, distribuidas en 170 géneros, con un porcentaje de endemismo del 40% (Espejo Serna, 2012). La república mexicana cuenta con gran variedad de condiciones climáticas, geológicas y biológicas, que van desde regiones sumamente áridas y desérticas, hasta húmedas y exuberantes selvas del sureste mexicano, la vertiente del Golfo de México es de características relevantes (Téllez, 2011). Los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas albergan la mayor riqueza de orquídeas, otros estados con una cifra respetable de especies son: Morelos, Estado de México y las regiones más bajas de Puebla y San Luís Potosí (Hágsater *et al*., 2005).

A pesar de su amplia presencia existen pocos estudios en la multiplicación y conservación de estas especies. Los atributos estéticos de las orquídeas como sus peculiares flores, colores y aromas son responsables del aprecio por estas especies que se les tiene como plantas de ornato. El interés por los coleccionistas, así como la falta de reproducción de orquídeas silvestres, ha provocado que hayan sido extraídas de su hábitat masivamente. Las

principales causas que han puesto en peligro la supervivencia de muchas especies *in situ* son la deforestación y cambio de uso de suelo y el comercio ilegal (Menchaca y Moreno, 2011).

El principal problema en la reproducción de orquídeas por semillas es que carecen de endospermo y la mayoría de las semillas de las orquídeas necesitan de un hongo simbiótico para lograr su germinación, en condiciones naturales el porcentaje de germinación es muy bajo, se estima que solo un 1% de las semillas de una capsula logran germinar y solo algunas cuantas llegan a ser adultas (Menchaca y Moreno, 2011). Para Banda-Sánchez *et al*. (2018) en el género *Prosthechea sp* puede lograr germinación *in vitro* del 29 al 32% dependiendo de la madurez del fruto.

Las técnicas de cultivo *in vitro ha* contribuido a mejorar la germinación de semillas de orquídeas para incrementar y extender la población natural de especies nativas. Algunos factores determinantes para la germinación *in vitro*, son el medio de cultivo, las condiciones de incubación y el balance de los reguladores de crecimiento. Estos requerimientos varían en función de la especie vegetal. El desarrollo de protocolos de conservación a mediano y largo plazo de semillas y explantes vegetativos ofrece la posibilidad de resguardar genotipos nativos valiosos o individuos derivados de programas de mejoramiento genético (Pedraza, 2017).

Para contribuir a la conservación y aprovechamiento de *Prosthechea baculus,* se plantea como objetivo establecer un protocolo para la germinación asimbiótica de *P. baculus,* determinar las etapas de desarrollo de la plántula desde la germinación a la presencia de hojas y raíces en semillas de fruto sometida a la acumulación de horas frío.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Roque ubicado en carretera, Juventino Rosas - Celaya Km. 8, Celaya, Guanajuato con la ubicación geográfica 20.580855 y -100.825199 (Google maps, 2025), temperatura media mensual 21ºC, con precipitación media anual 600 hasta los 800 mm a una altura de 1775 msnm, con un clima de cálido subhúmedo, de acuerdo con la clasificación climática de Köppen (García, 1973) y con predominancia de suelo de tipo vertisol (INEGI, 2017).

La colecta de semillas de *P. baculus* se realizó de una colección privada del municipio de Villagrán, Guanajuato, en las coordenadas 20° 32' 30" N 101° 00' 00" O a 1751 msnm, donde se obtuvo un fruto lodículo de cápsula deshiscente. El fruto deshiscente colectado se le realizó una limpieza superficial del pericarpio y se envasó en un frasco de vidrio limpio y aséptico, posteriormente se introdujo un refrigerador Mabe®, a una temperatura de 7 °C, de donde se fueron extrayendo las semillas a diferentes fechas de almacenamiento y con diferentes horas de acumulación de horas frío (HF), para realizarse la siembra aséptica en el medio básico de cultivo.

El medio de cultivo utilizado fue el de MS (1962) al 50% de su concentración original, se le adicionó azúcar morena (30 g L^{-1}) y agar Bacteriológico Bioxón® (6 g L^{-1}). El pH se ajustó a 5.6 (± 0.01) con NaOH o HCl (1N). El método de desinfección de las semillas de la cápsula dehiscente consistió en extraer las semillas del frasco, colocarlas dentro del contenedor de una jeringa de 10 ml, donde se le agregó una solución de jabón líquido (5 %) y dos gotas de Tween (20%), se agitó suavemente por tres minutos, por dos veces consecutivas, en cada una de ellas se realizaron un enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente se agregó una solución de cloro al 10 %, por un minuto, donde se agitó suavemente, se procedió a dar dos enjuagues con agua destilada estéril, finalmente en una nueva jeringa se adicionó un ml de agua estéril, se continuó con la agitación suave para distribuir las semillas homogéneamente y se distribuyó la solución sobre el contenedor del medio cultivo en frascos de Gerber® en el interior de la campana de flujo laminar previamente desinfectada con cloro al 30% y alcohol al 70%.

Después de la siembra aséptica de las semillas se identificaron los tratamientos y se colocaron en un cuarto de incubación a una temperatura de 26 ± 2ºC y una intensidad lumínica de 1200 luxes con lámparas de color blanco tipo Led, con fotoperiodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad. El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos y cinco repeticiones para cada tratamiento. Los tratamientos fueron: T1) 10 días (7ºC) (240 HF acumuladas); T2) 23 días (552 HF acumuladas); T3) 42 días (1008 HF acumuladas); T4) 64 días (1536 HF acumuladas) y T5) 85 días (2040 HF acumuladas), la estratificación fue a 7ºC en un refrigerador Mabe®. La evaluación de las variables consistió en: Porcentaje de germinación fue evaluada en días después de la siembra aséptica (dds): Imbibición (Ger1), Inicio de la germinación (InGer), Inicio del protocormo (InProt), Inicio del protomeristemo (InProM), Formación de rizoides (ForRiz), Formación de hojas (ForHj), Formación de raíces (ForRa). En el análisis estadístico se empleó el programa SAS (v 9.1) los tratamientos con diferencias estadísticas se le aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey (α 0.05).

TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza (ANVA) mostró diferencias altamente significativas (P ≤ 0.01) en la etapa fenológica Ger1 (imbibición), es decir desde en la etapa inicial del establecimiento de la semilla (Cuadro 1). Al respecto Rodríguez *et al*. (2015), señala que la germinación de las semillas de *A. chilensis* o maqui fue mejorada por la utilización de la estratificación a 4°C por 8 semanas. Schiappacasse *et al*. (2019) menciona que el efecto de la estratificación a 10° C por 7 y 14 días en la germinación de semillas de *Orites myrtoidea* (Poepp. & Endl.) Benth. & Hook. f. ex B.D. Jacks, es baja mientras que las semillas estratificadas por 21 días alcanzaron mayor porcentaje de germinación.

La investigación realizada por Roa (2017) menciona que en *Passiflora quadrangularis* L, el mayor porcentaje de germinación se presentó cuando se estratificaron a temperatura de 10°C durante 30 días para un total de 720 horas frio. Calderón (2021) menciona que de los tratamientos aplicados de la estratificación en semillas de *Stenocereus stellatus* (Pfeif.) Riccob, encontró que se incrementó el porcentaje de las semillas germinadas con diferencia estadística altamente significativa cuando se realizaron tratamientos alternados de frío y calor (4°/32 ± 2°C 30/30 días) y (4°/32 ± 2°C 15/15 días) en este último tratamiento promovió el incrementó del porcentaje de germinación de un 14.6% a un 18% comparado con las semillas que no fueron estratificadas, donde la germinación fue menor, logrando solamente un 7% germinación.

Es este ensayo se puede señalar que coinciden con los autores señalados, donde se observa que la estratificación es un método que promueve la germinación en varias especies, en el caso de las semillas de *P. baculus* aunque la literatura no menciona la presencia de latencia en sus semillas, se considera importante, debido a que puede prolongar la viabilidad de la semilla por una mayor período de tiempo, es importante en la reproducción sexual de esta especie; aunque se observó que a medida que se incrementaba las horas frío de 240 (10 días) a 2040 (85 días), se observa que las etapas de desarrollo de inicio de germinación hasta llegar a la formación de las primeras hojas, fue más tardado a medida de almacenamiento en frío fue más prolongado, pero la viabilidad se mantuvo en todo momento, el tiempo de germinación es más prolongado además los explantes iniciales presentaron un tamaño más reducido, por lo tanto, de acuerdo con los resultados se puede señalar que no coincide con ninguno de los autores citados, dado que ellos mencionan que incrementaron el porcentaje de germinación, pero no señalan el comportamiento fisiológico de la planta.

TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

Cuadro 1. Análisis de varianza de las variables de las etapas fenológicas de *P. baculus*.

		Cuadrados medios						
F.V.	Gl	Ger1	InGer	InProt	InProtM	ForRiz	ForHj	ForRa
Trat	4	11.84**	30.46 **	39.7**	45.24**	22.34**	83.5**	321**
Error	16	0.26	0.33	0.17	0.11	0.04	0.05	0.07
Total	24	52.56	127.44	162.0	183.76	90.16	334	1284
CV (%)		8.9	4.0	1.8	1.1	0.53	6.03	0.84

** Diferencia altamente significativa (P≤0.01), F.V.= fuente de variación, Gl= grados de libertad, Ger1 = Imbibición, InGer = germinación, InProt = protocormo, InProtM = protomeristemo, ForRiz = formación de rizoides, ForHj = formación de hojas, ForRa = formación de raíz.

La prueba de comparación de media (Tukey α 0.05) en las etapas fenológicas de *Prosthechea baculus* (Cuadro 2), se pudo determinar que durante la germinación inicial (Ger1) se observó que el tratamiento 3 (1008 HF) presenta el menor número de días a germinación, que al mayor tiempo de acumulación de horas frío, en el caso del tratamiento 5 que corresponde a 2040 HF, la germinación se prolongó por más tiempo este comportamiento más tardío es probable que las semillas esté en una etapa de envejecimiento provocando una menor viabilidad de la semilla para su germinación.

Cuadro 2. Prueba de comparación de media de las etapas fenológicas de *Prosthechea baculus.*

	Valores medios						
Trat	Ger1	InGer	InProt	InProtM	ForRiz	ForHj	ForRa
5	8.4 a	17.4 a	24 b	31 b	41 a	77 a	110 a
4	5.6 b	14.4 c	21 d	29 d	38 b	69 b	99 b
1	5.2 bc	13.4 c	27.6 a	35.6 a	36 d	67 d	89 e
2	5.2 bc	15.6 b	22.8 c	29.8 c	37 c	68 c	93 d
3	4.4 c	10.8 d	20.6 d	27.8 e	35.8 d	68 c	95 c

Los valores en la misma columna con la misma letra son estadísticamente iguales, Ger1 = Imbibición (µ días), InGer = Germinación (µ días), InProt = protocormo (µ días), InProtM = protomeristemo (µ días), ForRiz = formación de rizoides (µ días), ForHj = formación de hojas (µ días), ForRa = formación de raíz (µ días).

De acuerdo con las observaciones físicas de los contenedores del cultivo aséptico, en todos los tratamientos donde a las semillas se les aplicó la acumulación de horas frío (HF), estas durante la imbibición mostraron un incremento de tamaño (hinchazón por imbibición) (Figura 1, a) que variaron en función de las HF acumuladas (Figura 1, b), pero a medida que se incrementó las HF acumuladas el inicio de la germinación se vio afectada de 10.8 a 17.4 dds (Figura 1, c) y el inicio de la etapa protocórmica se prolongó por más tiempo.

TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

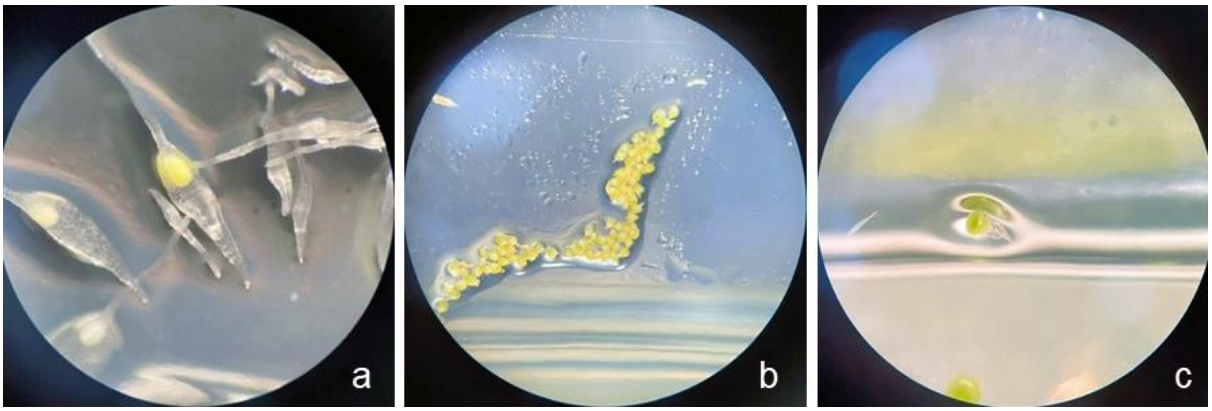

Figura 1. Establecimiento aséptico de semillas de *Prosthechea baculus* (Rchb. F.) W.E. Higgins: a) Etapa de imbibición aséptica, b) Inicio de la germinación, c) Estado protocórmico.

En el inicio de formación del protomeristemo (Figura 2, a) y durante el inicio de formación de rizoides y la aparición del primer par de hojas las semillas donde los tratamientos acumularon más HF, fueron más lentas la aparición de las etapas de desarrollo de la plántula de orquídea, desde los 67 hasta los 77 dds, aun así no se presentaron anormalidades en el desarrollo de la plántula (Figura 2).

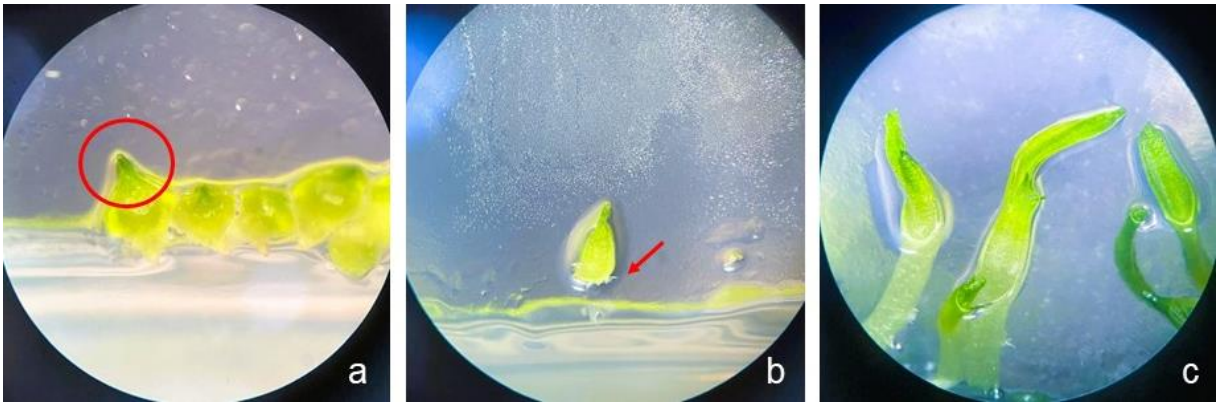

Figura 2. Etapas del desarrollo de plántula de orquídea *Prosthechea baculus* (Rchb. F.) W.E. Higgins: a) Formación del protomeristemo, b) Inicio de la formación de rizoides, c) Formación y aparición de hojas.

En la última fase del desarrollo de las plántulas micropropagadas, se observó el retraso en días, dado que las semillas con mayor tiempo en estratificación a temperaturas (7ºC) presentaron mayor cantidad promedio de días y pasar sus fases de desarrollo *in vitro* desde la germinación, formación de protomeristemo, inicio de las rizogénesis; la micropropagación y raíces completamente desarrolladas para transferirlas a la aclimatación a sustratos de Peat moos®.

TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

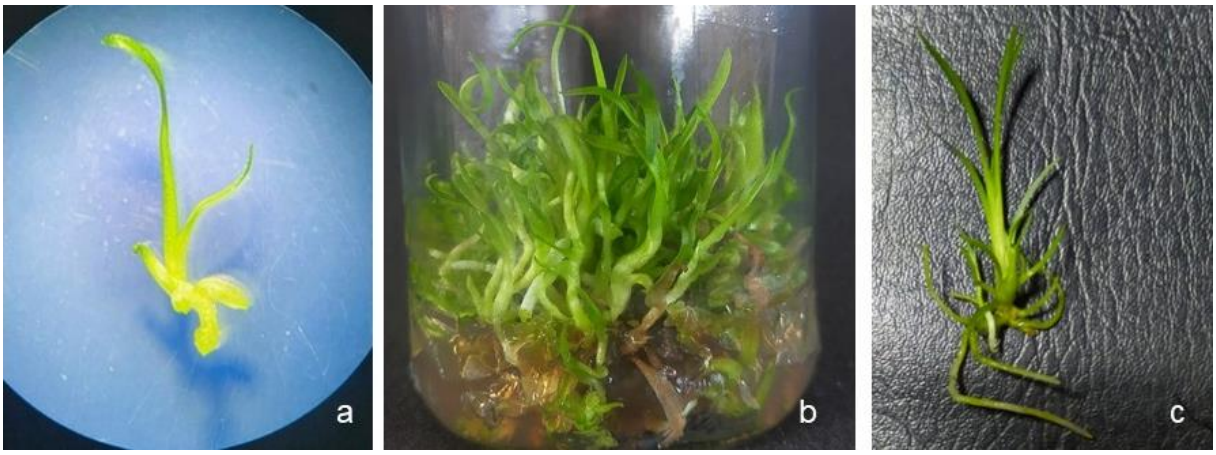

Figura 3. Plántula de orquídea *Prosthechea baculus* (Rchb. F.) W.E. Higgins: a) Plántula con raíz en desarrollo, b) Plántulas multiplicadas *in vitro*, c) Desarrollo radicular completo para su aclimatación.

Al respecto los resultados contrastan con los obtenido por Banda-Sánchez et al. (2018), quienes mencionan que las semillas de *Prosthechea* sp, puede cortarse el fruto en estado verde o amarillo y colocarse en refrigeración (4 y 5º C) y dependiendo del desarrollo del fruto (polinización a cosecha) desde los 195 días hasta los 240 y someterse a refrigeración hasta alcanzar la madurez de las semillas, pero lo más contrastante son los resultados de las semillas de *Odontoglossum* requieren alrededor de 18 meses para madurar (McKendrick 2000) colocadas en refrigeración. En este sentido son varios los factores que pueden influenciar en la viabilidad de las semillas y que pueden ser el ambiente de desarrollo del fruto, la especie en estudio, grado de madurez del fruto, presencia de polinizadores para incrementar el número de semillas fértiles por fruto. Ante ello solo existe un enorme reto en seguir realizando investigaciones que permitan la propagación masiva de especies de orquídeas que sean relevantes para México.

CONCLUSIONES

Las semillas de *P. baculus* con estratificación a 1008 horas frio y establecidas en siembra condiciones asépticas se observa la imbibición a los 4.4 días en condición *in vitro*.

Las semillas sometidas a acumulación de horas frío en condiciones de estratificación (7ºC) entre más horas frío se acumulen su proceso de germinación es más retardado.

El retraso en los días a germinación debido a la acumulación de horas frío provoca que las otras etapas fenológicas también presentan un retraso para la aparición como el protomeristemo y la presencia de hojas verdaderas en comparación con las de menor acumulación de horas frio.

La estratificación y la acumulación de 1008 horas frio presentó la germinación de las semillas de orquídeas a los 10.8 días, en contraste cuando la acumulación de 2040 horas frio los días la germinación se prolongó hasta 17.4 días después de la siembra aséptica.

El ciclo fenológico del desarrollo de la plántula de orquídea se logró desde los 89 días con 240 horas frio acumuladas, mientras que al someter las semillas a 2040 horas frio el ciclo fenológico se completó a los 110 días. Las plántulas germinadas de *P. baculus* sometidas a acumulación de horas frío, no presentaron anormalidades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Banda SL del C; Pinzón AYH; Vanegas MLE (2017). Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea* sp. de la zona andina, Fusagasugá, Colombia. Biota Colombiana 18 (1): 80–87. DOI: 10.21068/c2017.v18n01a5

Calderón GOD; Trujillo H A; Mandujano PM (2021). Efecto de la estratificación por temperatura sobre la germinación de las semillas de *Stenocereus stellatus*. Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química, 7(7), 570–575.

Espejo SA (2012). El endemismo en las Liliopsida mexicanas. Acta botánica mexicana *100*: 195-257.

Hágsater E; Soto AMÁ; Salazar CGA; Jiménez MMA; López R; Dressler RL (2005). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.

INEGI. Marco Geoestadístico Municipal (2017). versión 4.3. Celaya, Guanajuato.

Menchaca GRA; Moreno MD (2011). Conservación de orquídeas, una tarea de todos. Red Quelites, Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (México), Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.

McKendrick S (2000). Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. 9 pp.

Menchaca GRA; Moreno MD (2011). Manual para la propagación de Orquídeas. CONAFOR. México. 56 p.

Murashige T; Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3): 473-497.

Pedraza SME (2017). La propagación masiva de orquídeas (Orchidaceae); una alternativa de conservación de especies silvestres. Agroproductividad. 10 (6): 31-36.

Roa NCE (2017). Efecto de la estratificación sobre la germinación de semillas de badea *(Passiflora quadrangularis L.)*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia "UNAD". Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y del Medio Ambiente.

Rodríguez BM; Tampe PJ; Hormazábal VN; Araneda DX; Tighe NR; Cámarmo FP (2017). Efecto de la escarificación y estratificación sobre la germinación in vitro de Aristotelia chilensis. Gayana Bot, 74(2): 282–287.

Schiappacasse F; Peña C; Peñailillo P (2019). Orites myrtoidea (Proteaceae): Efecto de estratificación fría en germinación de semillas y ácido indol butírico en enraizamiento de estacas. Gayana. Botanica, *76*(2): 168–175. https://doi.org/10.4067/s0717-66432019000200168

Statistical Analysis System Institute (SAS). Software: changes and enhancements trough release v 9.0. Cary, NC. 1996.

Téllez VMA (2011). Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 174.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL DE LA SIERRA DE GUANAJUATO

Nathalie Paola Silva-Rodríguez[1]; César L. Aguirre-Mancilla[2]; Juan C. Raya-Pérez[2]; Juan G. Ramírez-Pimentel[2]; Erika Cañada-Coyote[2]

[1]IEstudiante de posgrado TecNM-Roque. [2]Docente de TecNM-Roque. Km.8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado Postal 508, C. P. 38110 Celaya, Guanajuato. ericka.cact@gmail.com

RESUMEN

Las bacterias del suelo desempeñan un papel esencial en los ecosistemas agrícolas, participan en procesos como la descomposición de materia orgánica, el reciclaje de nutrientes y la promoción del crecimiento vegetal. Entre ellas, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) destacan por su capacidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes, estimular el desarrollo radicular y proteger a las plantas contra patógenos. Su uso como biofertilizantes representa una alternativa ecológica frente al uso excesivo de agroquímicos. El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal a partir de muestras de suelo recolectadas en la región de la sierra de Guanajuato, México. Se llevaron a cabo procedimientos microbiológicos de estándar para el aislamiento y caracterización preliminar de las bacterias. Los resultados preliminares indican la presencia de cepas bacterianas con potencial para ser utilizadas como biofertilizantes en