

CONSERVACIÓN *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins POR MÍNIMO CRECIMIENTO

In vitro CONSERVATION OF *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins FOR MINIMAL GROWTH

Ramírez-Mosqueda, Marco A.; Raúl López-Aguilar; Andrés Orduño-Cruz y Marco Vinicio Rodríguez-Deméneghi

CONSERVACIÓN *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins POR MÍNIMO CRECIMIENTO

In vitro CONSERVATION OF *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins FOR MINIMAL GROWTH



Conservación *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins por mínimo crecimiento

In vitro conservation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins for minimal growth

Marco A. Ramírez-Mosqueda;
Raúl López-Aguilar;
Andrés Orduño-Cruz y
Marco Vinicio Rodríguez-
Deméneghi

CONSERVACIÓN *in vitro* de
Guarianthe skinneri (Bateman)
Dressler & W. E. Higgins POR
MÍNIMO CRECIMIENTO

In vitro CONSERVATION OF
Guarianthe skinneri (Bateman)
Dressler & W. E. Higgins FOR
MINIMAL GROWTH

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 58: 171-180. Julio 2024

DOI:

10.18387/polibotanica.58.12

Marco A. Ramírez-Mosqueda

Autor de correspondencia: marcomosqueda02@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-2477-4612>

Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México

Raúl López-Aguilar <https://orcid.org/0009-0008-4537-2031>

Andrés Orduño-Cruz <https://orcid.org/0000-0003-0794-0567>

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C, Unidad Guerrero Negro.

Guerrero Negro, Baja California Sur, México

Marco Vinicio Rodríguez-Deméneghi <https://orcid.org/0000-0002-0371-4434>

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana,

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México

RESUMEN: Las técnicas de conservación *in vitro* son consideradas métodos de preservación del germoplasma vegetal a mediano plazo. El periodo de conservación bajo esta técnica usualmente es de 1 a 2 años sin utilizar algún subcultivo. En México, existen recursos fitogenéticos que se encuentran catalogados dentro la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Estas especies vegetales deben ser prioritariamente salvaguardadas y conservadas. *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins es una orquídea que posee una flor que genera la atención de horticultores y/o coleccionistas como planta ornamental. El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo de conservación *in vitro* de *G. skinneri* por mínimo crecimiento. Para ello, se valoraron en medio Murashige and Skoog (MS) diferentes concentraciones (0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹) de ácido abscísico (ABA), paclobutrazol (PBZ), ancimídol (ACD) y diferentes concentraciones (0, 5, 10 y 20 g L⁻¹) de polietilenglicol 8000. Posteriormente se realizó la regeneración del material conservado utilizando medio MS adicionado con 2 mg L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (BAP). Después de 12 meses de conservación *in vitro*, los resultados mostraron una reducción en la altura de los brotes conservado en MS con 2.0 mg L⁻¹ de PBZ y en ABA 0.5 mg L⁻¹. Sin embargo, en el tratamiento con PBZ aumentó la formación de brotes y raíces en comparación con el tratamiento con ABA. Se logró la regeneración de 5.4 brotes/explante en 2.0 mg L⁻¹ de BAP. Así como una supervivencia del 90% durante el proceso de aclimatización. Los resultados de este estudio pueden contribuir a los trabajos de conservación que se llevan a cabo en esta especie de importancia ornamental.

Palabras clave: Conservación, Crecimiento mínimo, Ancimídol, Polietilenglicol, Regeneración *in vitro*.

ABSTRACT: *In vitro* conservation techniques are considered methods of medium-term conservation of plant germplasm. The conservation period under this technique is usually 1 to 2 years without using any subculture. In Mexico there are plant genetic resources that are cataloged within the Official Mexican Standard NOM-059-SEMARNAT-2010. These plant species must be safeguarded and conserved as a priority. *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins is an orchid that has a flower that attracts the attention of horticulturists and/or collectors as an ornamental plant. The objective of this study was to establish an *in vitro* conservation protocol for *G. skinneri* through minimal growth. For this, different concentrations (0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) of abscisic acid (ABA), paclobutrazol (PBZ), ancimídol (ACD) and different concentrations (0, 5, 10 and 20 g L⁻¹) of polyethylene glycol (8000). Subsequently, the regeneration of the preserved material was carried out using

MS medium added with 2 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP). After 12 months of *in vitro* conservation, the results showed a reduction in the length of the shoots preserved in MS with 2.0 mg L⁻¹ of PBZ and in ABA 0.5 mg L⁻¹. However, in the PBZ treatment, shoot and root formation increased compared to the ABA treatment. The regeneration of 5.4 shoots/explant was achieved at 2.0 mg L⁻¹ of BAP. As well as a survival of 90% during the acclimatization process. The results of this study can contribute to the conservation work carried out on this species of ornamental importance.

Key words: Conservation, Minimum growth, Ancimidol, Polyethylene glycol, In vitro regeneration.

INTRODUCCIÓN

La fragmentación del hábitat natural de los recursos fitogenéticos a nivel global, ha ocasionado pérdidas del germoplasma en especies vegetales (Aguilar *et al.*, 2019; Salgotra & Chauhan, 2023). Por tanto, es necesario implementar estrategias para la conservación de estos recursos (Sahu *et al.*, 2023). La biotecnología a través del cultivo de tejidos vegetales nos brinda la oportunidad de conservar el germoplasma en condiciones *in vitro* a mediano plazo (Chandran *et al.*, 2023) En la conservación *in vitro*, recurrentemente se utiliza un sistema de cultivo por mínimo crecimiento o crecimiento lento, consistiendo en agregar al medio de cultivo inhibidores del crecimiento o la disminución de los nutrientes en el medio de cultivo (Benelli *et al.*, 2022; Spinoso-Castillo *et al.*, 2022). Recientemente, esta técnica se ha utilizado con éxito en la conservación de diversas especies vegetales como: anturios (*Anthurium andraeanum* Linden), caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbridos) y agave (*Agave potatorum* Zucc.) (Spinoso-Castillo *et al.*, 2022). Así como en la conservación de plantas ornamentales, particularmente orquídeas como: *Catasetum integerrimum* Hook. (López-Puc & Herrera-Cool., 2022). *Laelia anceps* Lindl. (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019) y *Stanhopea tigrina* Bateman ex Lind. (Cruz-Cruz *et al.*, 2022).

El saqueo de especies de orquídeas con fines ornamentales es un problema recurrente en todo el mundo (Mackenzie & Yates, 2016; Castillo-Pérez *et al.*, 2019). En México, se extraen especímenes silvestres y en algunas ocasiones especies endémicas de las zonas con alta biodiversidad para su comercio clandestino (Castillo-Pérez *et al.*, 2019; Gutiérrez-Rodríguez, 2022) Aunado a esto, el uso tradicional y cultural de algunas orquídeas contribuye a la reducción de sus poblaciones silvestres (Sosa-Nishizaki, 2009; Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2012; Molina-Luna *et al.*, 2015).

Guarianthe skinneri (Bateman) Dressler & E.W. Higgins es una orquídea que se distribuye naturalmente desde México hasta Panamá (Bertolini *et al.*, 2016) Posee alto valor ornamental debido al tamaño y color de sus flores, favoreciendo su extracción ilegal y la reducción de sus poblaciones naturales (Coutiño-Cortés *et al.*, 2018). Este miembro de la familia Orchidaceae se encuentra catalogado como amenazado en la NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), e internacionalmente se encuentra en la categoría II del CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre) (CITES, 2023). En consecuencia, el problema radica en que no existe un medio de cultivo *in vitro* o protocolo que garantice la conservación *in vitro* de la especie con la finalidad de salvaguardar este valioso germoplasma. El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA), paclobutrazol (PBZ), ancimidol (ACD) y Polietilenglicol (PEG), para desarrollar un medio de cultivo capaz de lograr la conservación *in vitro* del germoplasma de *G. skinneri*, que contribuya a implementar estrategias de preservación de esta orquídea que se encuentra el peligro de extinción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas de *G. skinneri* previamente establecida, provenientes de la germinación asimbiótica de las semillas de esta orquídea. La germinación se realizó en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) sin reguladores del crecimiento vegetal (RCVs), suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa. Se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.8 ± 0.2, posteriormente se agregaron 2.2 g L⁻¹ de Phytigel® como agente gelificante. Se dosificaron 20 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 120 ml, por último, se esterilizaron en una autoclave a 1.5 kg cm⁻² de presión y 121°C por 15 min. Los cultivos fueron

incubados a una temperatura de 25 ± 2 °C, bajo una irradianza de 50 ± 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas LEDs.

Conservación *in vitro*

Se utilizó la técnica de conservación por crecimiento mínimo. Para ello, plantas *in vitro* de *G. skinneri* (1 cm de altura) fueron transferidas a medio de cultivo MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA), paclobutrazol (PBZ), ancimidol (ACD) y polietilenglicol 8000 (PEG). 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg·L⁻¹ para ABA, PBZ y ACD; 0, 10, y 20 g L⁻¹ para PEG. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 ± 0.2 , posteriormente se agregaron 2.2 g L⁻¹ de Phytigel® como agente gelificante. Por último, se dosificó en tubos de ensayo de (22 × 220 mm) conteniendo 15 ml de medio, se esterilizaron en una autoclave a 1.5 kg cm⁻² de presión y 121 °C por 15 min. Los cultivos fueron incubados a una temperatura de 25 ± 2 °C, bajo una irradianza de 50 ± 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas LED. Todos los reactivos fueron de la marca Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA. Después de 12 meses de cultivo se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, el número de brotes, la altura de brotes (distancia entre la base y el ápice del tallo) y el número de raíces.

Regeneración *in vitro*

25 plantas individuales (1.5 cm de altura) de *G. skinneri* obtenidas del mejor tratamiento de crecimiento mínimo fueron transferidos a frascos de vidrio de 120 ml, conteniendo 20 mL de medio de cultivo MS suplementado con 2.0 mg L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 30 g L⁻¹ de sacarosa. Como agente gelificante se utilizó 2.2 g L⁻¹ de Phytigel®. Las condiciones de pH, esterilización de medios de cultivo e incubación fueron las mismas descritas anteriormente. Después de seis semanas de cultivo se evaluó el número de brotes por explante.

Aclimatización

Los brotes con una altura de 3 cm que presentaban un óptimo desarrollo radicular, fueron enjuagados con agua corriente. Posteriormente, se sembraron en sustrato estéril de musgo turboso + agrolita (1:1 v/v) utilizando charolas de 72 cavidades (5 x 5 x 8 cm). Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero con sombra al 50%, humedad relativa entre el $90 \pm 5\%$ y temperatura entre 30 ± 5 °C. Después de ocho semanas de cultivo se evaluó el porcentaje de supervivencia (dividiendo el número total de plantas sembradas entre el número de plantas que prevalecen vivas).

Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado en todos los experimentos fue completamente al azar, los experimentos se realizaron por duplicado. Para la conservación *in vitro*, se utilizaron 25 explantes por tratamiento (un explante por tubo de ensayo). Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$) utilizando el software IBM SPSS Estadísticas (Versión 21 para Windows). La normalidad y la homogeneidad de la varianza se verificaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Cuando las variables no mostraron estos parámetros, se transformaron en logaritmo natural (ln).

RESULTADOS

Conservación *in vitro*

Posteriormente a 12 meses en conservación *in vitro* en todos los tratamientos se observó un 100 % de supervivencia de las plantas de *G. skinneri*. Para la altura de los brotes se observaron diferencias significativas, las cuales se reportan en la Tabla 1. La menor altura observada fue de 1.50 cm obtenida en el tratamiento con 2 mg L⁻¹ de PBZ (Figura 1c), seguida de 1.65 cm observado en 0.5 mg L⁻¹ de ABA (Figura 1b) y 1.80 cm en 2 mg L⁻¹ de ACD (Figura 1d). La mayor altura se observó en el tratamiento testigo con brotes de 7.35 cm (Figura 1a). Con el uso de PEG no se afectó drásticamente la variable altura de los brotes a diferencia del uso de inhibidores del crecimiento vegetal (Figura 1e). Para el número de raíces, se observaron diferencias significativas en los tratamientos evaluados (Tabla 1). De manera general se observó una mayor formación de brotes en el medio de conservación suplementado con ACD, en el cual se obtuvieron 22.90 brotes en el tratamiento con 2 mg L⁻¹, seguido de 18.30 brotes en 1 mg L⁻¹ y 16.10 en 0.5 mg L⁻¹ (Figura 1d). El tratamiento con 2 mg L⁻¹ de PBZ generó 15.00 brotes (Figura 1c), mientras que el menor número de brotes (2.60) se observó en el tratamiento testigo (Figura

1a). Para número de raíces, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 1). La adición de PBZ y ACD estimularon la formación de raíces a diferencia de los tratamientos restantes: 22.30 raíces se obtuvieron en el tratamiento con 2 mg L⁻¹ de ACD, 22.0 raíces en el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de PBZ y 19.80 raíces en el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de ACD. El menor número de raíces (5.70) se observó en 2 mg L⁻¹ de ABA.

Tabla 1. Efecto de la concentración de inhibidores del crecimiento y PEG sobre la conservación *in vitro* de *G. skinneri*.

Table 1. Effect of growth inhibitor and PEG concentration on *in vitro* preservation of *G. skinneri*.

Tratamiento	Concentración	Altura de los brotes (cm)	Núm. de brotes	Núm. de raíces
Testigo	MS	7.35±0.24a	2.60±0.49g	8.40±1.46bc
ABA (mg L ⁻¹)	0.5	1.65±0.11d	6.90±0.58e	8.30±1.54b
	1	1.85±0.14cd	4.40±0.42f	6.30±1.36c
	2	1.85±0.12cd	4.60±0.54f	5.70±1.22c
PBZ (mg L ⁻¹)	0.5	1.95±0.15cd	7.40±0.88e	19.20±1.95a
	1	2.05±0.18cd	11.60±1.02d	22.00±2.14a
	2	1.50±0.16d	15.00±1.24bc	19.40±1.90a
ACD (mg L ⁻¹)	0.5	1.90±0.19cd	16.10±1.34bc	19.50±1.94a
	1	2.05±0.15cd	18.30±1.35a	19.80±1.98a
	2	1.80±0.12cd	22.90±1.90a	22.30±2.18a
PEG (g L ⁻¹)	5	4.65±0.20b	7.40±0.94e	10.30±1.49b
	10	4.50±0.21b	6.80±0.68e	7.50±1.79bc
	20	3.25±0.19bc	9.20±1.12d	12.10±1.89b

Los valores representan la media ± ES (error estándar). Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

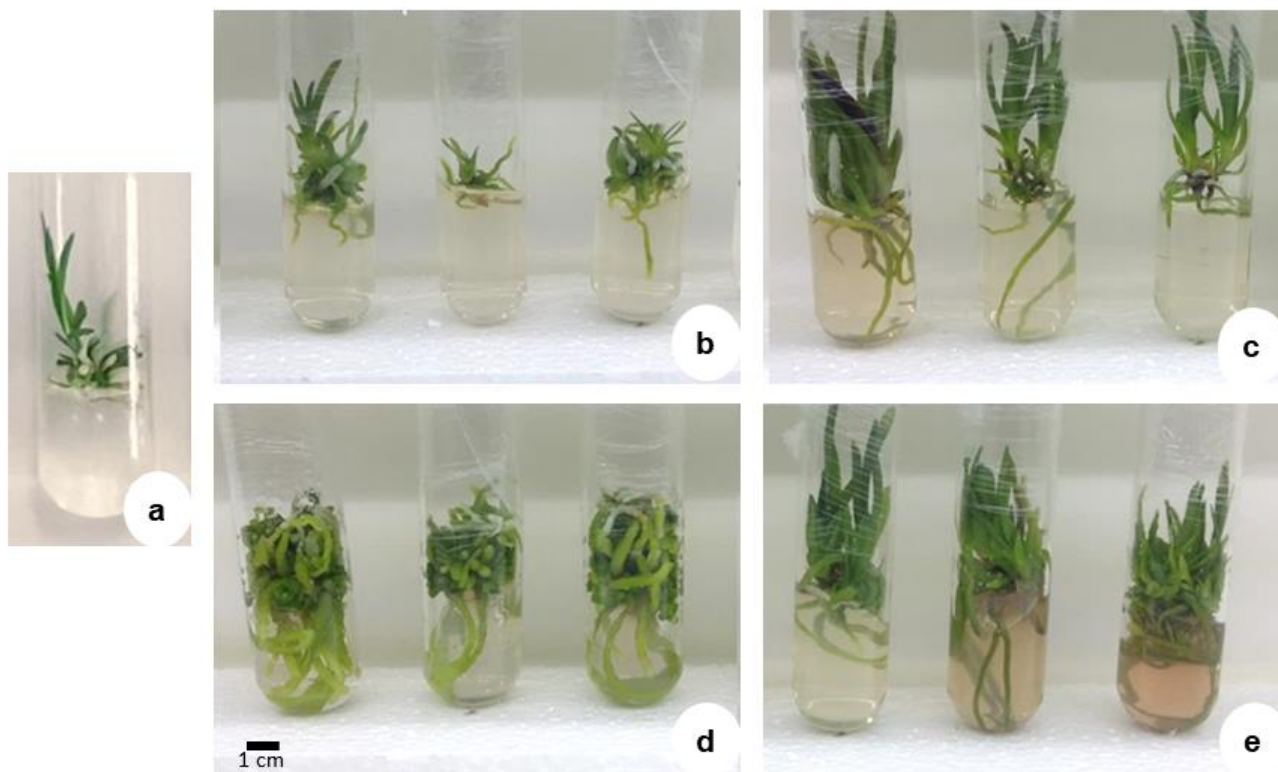


Figura 1. Conservación *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & E.W. Higgins por 12 meses en mínimo crecimiento: a) MS (tratamiento testigo), b) Ácido abscísico a 0.5, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ (izquierda-derecha), c) Paclobutrazol a 0.5, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ (izquierda-derecha), d) Ancimídol a 0.5, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ (izquierda-derecha), e) Polietilenglicol a 5, 10 y 20 mg L⁻¹ (izquierda-derecha).

Figure 1. *In vitro* storage of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & E.W. Higgins for 12 months at minimum growth: a) DM (control treatment), b) Abscisic acid at 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ (left-right), c) Paclobutrazole at 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ (left-right), d) Ancimídol at 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ (left-right), e) Polyethylene glycol at 5, 10 and 20 mg L⁻¹ (left-right).

Regeneración *in vitro* y aclimatización

Del tratamiento superior de conservación (2.0 mg L⁻¹ de PBZ), después de seis semanas de cultivo en el medio de regeneración *in vitro*, se logró la generación de 5.4 brotes por explante en un medio de cultivo suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP (Figura 2a-b). Posterior a ocho semanas en el proceso de aclimatización, se observó un 75% de supervivencia en las plantas de *G. skinneri* (Figura 2c).



Figura 2. Regeneración *in vitro* y aclimatización del germoplasma conservado de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins. a) Proliferación de brotes en medio MS con 2.0 mg L⁻¹ de BAP, b) Proliferación de brotes después de seis semanas de cultivo, c) Plantas aclimatizadas después de ocho semanas de cultivo.

Figure 2. *In vitro* regeneration and acclimatization of conserved germplasm of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins. a) Proliferation of shoots in MS medium with 2.0 mg L⁻¹ of BAP, b) Proliferation of shoots after six weeks of cultivation, c) Acclimatized plants after eight weeks of cultivation.

DISCUSIÓN

En este estudio se estableció con éxito un protocolo de conservación *in vitro* de *Guarianthe skinneri* a través de un medio de cultivo para mínimo crecimiento. Se observó que el paclobutrazol (PBZ) permitió la conservación *in vitro* por 12 meses, reduciendo la altura de los brotes, aumentando la formación de brotes y el número de raíces, sin afectar la supervivencia de los mismos. El uso del mínimo crecimiento para la conservación *in vitro* de recursos fitogenéticos, ha sido la estrategia biotecnológica mayormente usada como conservación a mediano plazo (Chauhan *et al.*, 2019; Spinoso-Castillo *et al.*, 2022). Otra estrategia utilizada y reportada para la conservación a corto plazo, es la elaboración de semilla sintética y su almacenamiento *in vitro* (Sharma *et al.*, 2020; Rathour *et al.*, 2023). Mientras que la criopreservación es una técnica biotecnológica que permite la conservación a largo plazo (Bettoni *et al.*, 2021; Nausch & Buyel, 2021).

En este estudio se observó que el ABA (0.5 mg L⁻¹) y el PBZ (2.0 mg L⁻¹) tienen efectos similares en la reducción de la altura de los brotes. El ácido abscísico es un regulador del crecimiento vegetal (RCV) que regula diversos procesos fisiológicos en la planta como: el cierre de estomas, la acumulación de cera cuticular, la senescencia de las hojas (desprendimiento de hojas, frutos y otras partes de la planta), la dormancia de las yemas, la regulación osmótica, la germinación de las semillas, la respuesta al estrés y la regulación del crecimiento (Chen *et al.*, 2020). El ABA es un inhibidor de crecimiento vegetal que ha resultado eficaz para la conservación *in vitro* de diversas especies vegetales como áster (*Taraxacum pienanicum*) (Kamińska *et al.*, 2021), laelia (*Laelia anceps*) (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019), *Stanhopea tigrina* (Cruz-Cruz *et al.*, 2022), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Al-Abdallat *et al.*, 2017) y vainilla (*Vanilla planifolia*) (Bautista-Aguilar *et al.*, 2021). Sin embargo, en nuestro estudio se observó que el uso de PBZ influyó en la proliferación de brotes del germoplasma conservado, así como en el aumento del número de raíces a diferencia de las plantas conservadas en ABA.

El PBZ es un RCV ampliamente usado en la inducción de la floración en cultivos en campo, así como en los últimos años se utilizado en técnicas de conservación *in vitro* por el efecto que tiene en la reducción de brotes (Orozco-Meléndez *et al.*, 2022; Spinoso-Castillo *et al.*, 2022). Su acción en el metabolismo celular, es el bloqueo de la oxidación del ácido ent-kauronoico mediante la inactivación de la oxigenasa dependiente del citocromo P450 durante la síntesis de giberelina, que actúa sobre el alargamiento celular e inhibe el crecimiento de las plantas (Desta & Amare, 2021). El PBZ se ha utilizado en diferentes concentraciones en la conservación *in vitro* de diferentes especies vegetales. Spinoso-Castillo *et al.* (2022) determinaron que para la conservación *in vitro* en mínimo crecimiento por seis meses de *anthurium* (*Anthurium andraeanum*) y caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) fue necesario utilizar 1 mg L⁻¹ de PBZ. Mientras que para agave (*Agave potatorum*) fue necesario adicionar 3 mg L⁻¹ de PBZ. Esto concuerda con lo observado en nuestro estudio, debido a que para la conservación *in vitro* de *G. skinneri* por 12 meses fue necesario la adición de 2 mg L⁻¹ de PBZ. Sin embargo, contrasta con lo observado por Cruz-Cruz *et al.* (2022) en *Stanhopea tigrina*, en donde 2 mg L⁻¹ de ABA mostró una mayor reducción en la altura de los brotes en comparación de cualquier dosis (0.5, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹) de PBZ.

No solo el uso de inhibidores del crecimiento vegetal es utilizado para optimizar protocolos de conservación *in vitro* del germoplasma vegetal. Existen estudios en donde las condiciones de incubación tienen un papel importante y sinérgico con el uso de inhibidores, logrando conservar por un periodo mayor de tiempo. Samarina *et al.* (2014) demostraron que se puede conservar *Citrus limon* cv. Novoafonsky por 12 meses en medio ½ MS a temperaturas de 10 °C con una baja intensidad lumínica (12-14 μmol m⁻² s⁻¹). Sin embargo, algunas especies son altamente susceptibles a la reducción de la temperatura de incubación como en el caso de vainilla (*V. planifolia*) (Bautista-Aguilar *et al.*, 2021).

Las plantas conservadas en PBZ y ABA fueron regeneradas (proliferación de brotes) sin alguna complicación utilizando BAP como RCV. El uso de BAP para la formación *in vitro* de brotes de *G. skinneri* ha sido ampliamente reportada: Hernández-Ramírez *et al.* (2023) utilizaron 1.12 mg L⁻¹ de BAP en medio de cultivo Yasuda. Mientras que Leyva-Ovalle *et al.* (2020) utilizaron 3 mg L⁻¹ de BAP en medio MS en combinación con el uso de biorreactores de inmersión temporal (BIT).

CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo eficiente para la conservación *in vitro* de *G. skinneri* por crecimiento mínimo mediante la inhibición en el desarrollo con la adición de PBZ y regeneración del material conservado con BAP. Los sistemas de conservación y regeneración *in vitro* contribuirán a las estrategias de preservación y reintroducción de germoplasma de este valioso recurso fitogenético.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, R., Cristóbal-Pérez, E. J., Balvino-Olvera, F. J., De Jesús Aguilar-Aguilar, M., Aguirre-Acosta, N., Ashworth, L., Lobo, J. A., Martín-Rodríguez, S., Fuchs, E. J., Sánchez-Montoya, G., Bernardello, G., & Quesada, M. (2019). Habitat fragmentation reduces plant progeny quality: a global synthesis. *Ecology Letters*, 22(7), 1163–1173. <https://doi.org/10.1111/ele.13272>
- Al-Abdallat, A. M., Shibli, R. A., Akash, M. W., Rabbaa, M., & Al-Qudah, T. (2017). *In vitro* preservation of transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants overexpressing the stress-related SIAREB1 transcription factor. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1477. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms18071477>
- Bautista-Aguilar, J. R., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ramírez-Mosqueda, M. A., & Ortiz-García, M. M. (2021). *In Vitro* Conservation and Genetic Stability in *Vanilla planifolia* Jacks. *HortScience*, 56(12), 1494–1498. <https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI16118-21>

- Beltrán-Rodríguez, L. A., Martínez-Rivera, B., & Maya, A. P. (2012). Etnoecología de la flor de catarina-*Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl.-(Orchidaceae) en una comunidad campesina al sur del estado de Morelos, México: conservando un recurso y preservando saberes populares. *Etnobiología*, 10(1), 1–17. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5294459>
- Benelli, C., Tarraf, W., Izgu, T., & De Carlo, A.-. (2022). *In Vitro* Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years. *Plants*, 11(23), 3188. <https://doi.org/10.3390/plants11233188>
- Bertolini, V., Damon, A., & Cerdeña-Ibarra, C. (2016). Atlas de las orquídeas del Soconusco: modelos digitales de nichos ambientales entre Centro y Sudamérica. En: *Modelos digitales de nichos ambientales entre Centro y Sudamérica. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/306465164_Atlas_de_las_orquideas_del_Soconusco_Modelos_digitales_de_nichos_ambientales_entre_Centro_y_Sudamerica* (1ra ed.). El Colegio de la Frontera Sur. <https://www.researchgate.net/publication/306465164>
- Bettoni, J. C., Bonnard, R., & Volk, G. M. (2021). Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144(1), 21–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11240-020-01846-x>
- Castillo-Pérez, L. J., Martínez-Soto, D., Maldonado-Miranda, J. J., Alonso-Castro, A. J., & Carranza-Álvarez, C. (2019). The endemic orchids of Mexico: a review. *Biología*, 74, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>
- Chandran, S., Raghu, A. V., & Mohanan, K. V. (2023). *In vitro* conservation of rare, endangered, and threatened plants. En: *Conservation and Sustainable Utilization of Bioresources*, Sukumaran, S. T., Keerthi, T. R. (pp. 391-408). Singapore: Springer Nature Singapore. 391–408. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5841-0_16
- Chauhan, R., Singh, V., & Quraishi, A. (2019). *In vitro* conservation through slow-growth storage. En: S. T. Sukumaran & T. R. Keerthi (Eds.), *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects* (pp. 397–416). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_19
- Chen, K., Li, G., Bressan, R. A., Song, C., Zhu, J., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jipb.12899>
- CITES. (2023). *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*. 2012-2023. Appendices I, II and III. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>
- Coutiño-Cortés, A. G., Bertolini, V., Morales, F. A., Valle-Mora, J., Iracheta-Donjuan, L., García-Bautista, M., & Ruiz-Montoya, L. (2018). El uso ornamental de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae), en Chiapas y Guatemala, determina parcialmente su diversidad y estructura genética. *Acta Botánica Mexicana*, 124, 32–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.21829/abm124.2018.1303>
- Cruz-Cruz, C. A., González-Arno, M. T., Bautista-Aguilar, J. R., & Ramírez-Mosqueda, M. A. (2022). *In vitro* short-term storage of *Stanhopea tigrina* Bateman ex Lind. *South African Journal of Botany*, 151, 334–338. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.014>
- Desta, B., & Amare, G. (2021). Paclobutrazol as a plant growth regulator. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40538-020-00199-z>
- Gutiérrez-Rodríguez, B. E. (2022). The orchids of MegaMéxico and their interactions with pollinators. *Agro Productividad*, 15(5), 133–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.32854/agrop.v15i5.2187>
- Hernández-Ramírez, F., Iracheta-Donjuan, L., Damon, A. A., Fernández-Pavía, S. P., & Guillén-Navarro, K. (2023). Efecto del medio de cultivo y escotoperiodo en la germinación de semillas y crecimiento *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & WE Higgins (Orchidaceae). *Polibotánica*, 56, 151–170. <https://doi.org/https://doi.org/10.18387/polibotanica.56.8>
- Kamińska, M., Kęsy, J., & Trejgell, A. (2021). Abscisic acid in preservation of *Taraxacum pieninicum* in the form of synthetic seeds in slow growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144, 295–312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11240-020-01924-0>
- Leyva-Ovalle, O. R., Bello-Bello, J. J., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, R., & Ramírez-Mosqueda, M. A. (2020). Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et WE Higgings in temporary immersion systems. *3 Biotech*, 10, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13205-019-2010-3>
- López-Puc, G., & Herrera-Cool, G. J. (2022). Asymbiotic germination, *in vitro* conservation and regeneration of *Catasetum integerrimum* Hook. *Polibotánica*, 53, 135–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.18387/polibotanica.53.9>

Recibido:
3/noviembre/2023

Aceptado:
18/junio/2024

- Mackenzie, S., & Yates, D. (2016). Collectors on illicit collecting: Higher loyalties and other techniques of neutralization in the unlawful collecting of rare and precious orchids and antiquities. *Theoretical Criminology*, 20(3), 340–357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/1362480615607625>
- Molina-Luna, N. G., Arellanes-Cancino, Y., & Martínez y-Ojeda Enrique. (2015). El papel de la comercialización orquídeas y bromelias de mercados de los valles centrales de Oaxaca, México, en la subsistencia campesina. *Observatorio de La Economía Latinoamericana*, 210. <https://ideas.repec.org/a/erv/observ/y2015i21031.html>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nausch, H., & Buyel, J. F. (2021). Cryopreservation of plant cell cultures—Diverse practices and protocols. *New Biotechnology*, 62, 86–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.02.002>
- Orozco-Meléndez, L. R., Hernández-Rodríguez, O. A., Cruz-Álvarez, O., Robles-Hernández, L., Ávila-Quezada, G. D., Chávez, E. S., Porrás-Flores, D. A., & Ojeda-Barrios, D. L. (2022). Paclobutrazol and its use in fruit production: A review. *Phyton*, 91(1), 1. <https://doi.org/https://doi.org/10.32604/phyton.2022.016908>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Cruz-Cruz, C. A., Atlahua-Temoxtle, J., & Bello-Bello, J. J. (2019). *In vitro* conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. *South African Journal of Botany*, 121, 219–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.010>
- Rathour, R., Yadav, S., Singh, A., Kaushik, S., & Rai, M. K. (2023). A liquid culture system for plantlet conversion and slow growth storage of encapsulated shoot tips of *Justicia adhatoda* L. *Industrial Crops and Products*, 205, 117534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117534>
- Sahu, P. K., Sao, R., Khute, I. K., Baghel, S., Patel, R. R. S., Thada, A., Parte, D., Devi, Y. L., Nair, S., Kumar, V., Mondal, S., Das, B. K., Sharma, D. (2023). Plant genetic resources: conservation, evaluation and utilization in plant breeding. En: *Advanced Crop Improvement, Volume 2: Case Studies of Economically Important Crops*, Raina, A., Wani, M. R., Laskar, R. A., Tomlekova, N., Khan, S., (eds.) (pp. 1-45). Cham: Springer International Publishing 2, 1–45. https://doi.org/10.1007/978-3-031-26669-0_1
- Salgotra, R. K., & Chauhan, B. S. (2023). Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14(1), 14. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/genes14010174>
- Samarina, L. S., Choudhary, R., Kolomiets, T. M., Abilfazova, Y. S., & Saran, P. L. (2014). *In vitro* Conservation Technique for Russian *Citrus limon*. *Agricultural Research*, 3, 279–283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s40003-014-0127-5>
- 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* (Vol. 6). https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019#gsc.tab=0
- Sharma, N., Pandey, R., & Agrawal, A. (2020). Influence of explant types, non-embryogenic synseed and reduced oxygen environment on *in vitro* conservation of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56(6), 851–856. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11627-020-10078-9>
- Sosa-Nishizaki, Ó. (2009). Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna. En: Soberón J., Halffter G., & Llorente-Bousquets J. (Eds.), *Capital natural de México* (Vol. 2, pp. 247–276). Ecosur. <https://biblioteca.ecosur.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=000037477>
- Spinoso-Castillo, J. L., Pérez-Sato, J. A., Schettino-Salomón, S. S., & Bello-Bello, J. J. (2022). An alternative method for medium-term *in vitro* conservation of different plant species through gibberellin inhibitors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 58(4), 606–614. <https://doi.org/10.1007/S11627-022-10263-Y>