

## Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación *ex situ*\*

### Analysis seeds *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) for *ex situ* conservation

Aguilar-Morales, M. A.<sup>1</sup>, Laguna-Cerda, A.<sup>1§</sup>, Vences-Contreras, C.<sup>1</sup> y Lee-Espinosa, H. E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México Campus "El Cerrillo"-Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales-Facultad de Ciencias Agrícolas. El Cerrillo Piedras Blancas C. P. 50200. Toluca, Estado de México. <sup>2</sup>Universidad Veracruzana-Laboratorio de Micropropagación Vegetal-Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Campus Córdoba. <sup>§</sup>Autor de correspondencia: alagunac@uaemex.mx.

#### Resumen

Semillas de Trompillo (*Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. Orchidaceae), procedentes de cápsulas maduras de una población, fueron analizadas respecto a: tamaño, estructura, peso, número de semillas por gramo y la viabilidad mediante prueba de Tetrazolio con y sin pretratamiento de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  y Twenn, la prueba de germinación asimbiótica en condiciones *in vitro* para comparar la viabilidad de las mismas. La germinación, se evaluó en porcentaje y días a germinación en tres medios semisólidos de cultivo (MS+CV; MS+extracto de plátano; MS+agua de coco). El tamaño de la semilla fue de  $0.56\pm 0.08$  mm de largo por  $0.09\pm 0.01$  mm de ancho, cubriendo un área de  $3.25\pm 0.5$  mm<sup>2</sup>, con un peso aproximado de  $1.6\pm 0.08$  µg, registrando 63 500 semillas por gramo. El porcentaje de viabilidad mediante la prueba de Tetrazolio presentó diferencias estadísticas significativas ( $p\leq 0.05$ ) entre los tratamientos, sobresaliendo los tratamientos de Tetrazolio al 1% con y sin Twenn con 50.3 y 48.2% respectivamente, el pretratamiento con  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  afectó directamente la viabilidad de las semillas. En la germinación asimbiótica se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p\leq 0.05$ ) entre los tratamientos, destacando MS + CV con 56.9% de germinación a los 30 días, seguidos de medio MS + agua de coco con 31.4% de germinación a los 55.7 días, por último el medio MS + extracto de plátano con 23% a los 59.1 días.

#### Abstract

Seeds Trompillo (*Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. Orchidaceae) from mature capsules of a population, were analyzed for: size, structure, weight, number of seeds per gram and viability by tetrazolium test with without pretreatment of  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  and Tween, asymbiotic test germination conditions *in vitro* to compare the viability of them. Germination was evaluated in germination percentage and days in three semi-solid culture media (MS + CV; MS + banana extract; MS + coconut water). The seed size was  $0.56\pm 0.08$  mm long by  $0.09\pm 0.01$  mm wide, covering an area of  $3.25\pm 0.5$  mm<sup>2</sup>, with an approximate weight of  $1.6\pm 0.08$  µg, registering 63 500 seeds per gram. The percentage of viability by tetrazolium test showed statistically significant differences ( $p\leq 0.05$ ) between treatments, excelling treatments Tetrazolium 1% with and without Tween with 50.3 and 48.2% respectively, pretreatment with  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  affected directly the viability of the seeds. In asymbiotic germination were significant statistical differences ( $p\leq 0.05$ ) between treatments, highlighting MS + CV with 56.9% germination at 30 days, followed by medium MS + coconut water with 31.4% germination to 55.7 days, finally medium MS + banana extract with 23% to 59.1 days.

**Keywords:** coconut water, banana extract, germination, mature capsules, trompillo.

\* Recibido: mayo de 2016  
Aceptado: junio de 2016

**Palabras clave:** agua de coco, cápsulas maduras, extracto de plátano, germinación, trompillo.

Trompillo, angelitos o encyclia conejo (*Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr), es una orquídea endémica de México distribuida en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán, México, Guerrero y Oaxaca. En el estado de México se encuentra en los municipios de Temascaltepec, Tejupilco y Valle de Bravo (Ruiz *et al.*, 2008; Szeszko, 2011; Téllez, 2011), es una de las 188 especies enlistadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) en la categoría "Amenazada". Debido a sus llamativas flores (inflorescencias de 60 cm a un metro de largo, con 10 a 35 flores) y a su agradable fragancia de medio día, la especie ha sido sobrecolectada provocando involuntariamente la disminución considerable de sus poblaciones naturales (Ruiz *et al.*, 2008; Szeszko, 2011), sumando, el cambio climático y los desastres forestales que está sufriendo su ecosistema. Es importante conservar la especie tanto en condiciones *in situ* como en *ex situ*, una estrategia fundamental de esta última, es la implementación de bancos de germoplasma (Lascuráin *et al.* 2009; Sánchez y Jiménez, 2010).

En México la gran mayoría de los bancos de germoplasma están destinados a conservar especies de interés agroalimentario, aunque existen algunos bancos encargados de coleccionar especies silvestres, prioritarias, con problemas de viabilidad, en alguna categoría de riesgo, etc. (Lascuráin *et al.* 2009). Los esfuerzos realizados por conservar la familia Orchidaceae han sido exhaustivos, mediante la implementación de bancos de germoplasma vegetal en condiciones *in vitro* por método de crecimiento mínimo o lento crecimiento. Sin embargo, al igual que en jardines o colecciones vivas el mantenimiento del germoplasma requiere de instalaciones adecuadas y mantenimiento especializado encareciendo los costos de conservación, la conservación de germoplasma por semillas es una estrategia viable para conservar la mayor variabilidad genética posible con menores costos y en espacios muy reducidos.

Determinar la calidad de las semillas almacenadas es un punto importante para determinar el éxito o fracaso de la conservación en los bancos de germoplasma. En el análisis de semillas se deben estudiar características físicas y biológicas de un lote para asignarles un valor, estas pruebas se deben realizar en dos momentos: el primero, inmediatamente después de la extracción y limpia de semillas; y segundo, antes de ser sembradas o utilizadas para cualquier otro destino y los principales análisis son, peso y tamaño de semillas, viabilidad, pureza, humedad, etc. (Raó *et al.*, 2007).

Trompillo, angels or encyclia rabbit (*Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr) is an endemic orchid of Mexico distributed in the states of Nayarit, Jalisco, Michoacán, Mexico, Guerrero and Oaxaca. In the state of Mexico it is in the municipalities of Temascaltepec, Tejupilco and Valley de Bravo (Ruiz *et al.*, 2008; Szeszko, 2011; Téllez, 2011), is one of the 188 species listed in NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) in the "endangered". Because of its showy flowers (inflorescences 60 cm to a meter long, with 10 to 35 flowers) and its pleasant fragrance noon, the species has been very collected involuntarily causing considerable decrease in natural populations (Ruiz *et al.*, 2008; Szeszko, 2011), adding, climate change and forest disasters is suffering its ecosystem. It is important to conserve the species both *in situ* and *ex situ* conditions, a key strategy of the latter, is the implementation of genebanks (Lascuráin *et al.*, 2009; Sánchez and Jiménez, 2010).

In Mexico the vast majority of genebanks are intended to conserve species of agrifood interest, although some banks responsible for collecting wild, priority species, with viability problems in some category of risk, etc. (Lascuráin *et al.*, 2009). The efforts to preserve the Orchidaceae family have been exhaustive, by implementing plant germplasm banks under *in vitro* conditions by method of minimal growth or slow growth. However, as in gardens or living collections germplasm maintenance requires adequate facilities and specialized maintenance more expensive maintenance costs, conservation of germplasm from seed is a viable strategy to preserve the greatest genetic variability possible with lower costs and very tight spaces.

Determine the quality of stored seeds is an important factor in determining the success or failure of conservation in genebanks point. In the analysis of seeds should study physical and biological a lot to assign a value features, these tests should be performed in two stages: first, immediately after extraction and clean seed; and second, before being planted or used for any other destination and the main analyzes are, weight and size of seeds, viability, purity, moisture, etc (Raó *et al.*, 2007).

Ossenbach *et al.* (2007), they conducted feasibility tests on orchid seeds of 22 accessions of 10 different species and determined that pretreatment with  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  as a desiccant significantly affects the viability of the seeds and tetrazolium test it is a very valid to determine the viability of seeds of orchids method, however, they determined that the accuracy of these studies is affected by the ability of the analyst who interprets them.

Ossenbach *et al.*, (2007), realizaron pruebas de viabilidad en semillas de orquídeas de 22 accesiones de 10 especies diferentes y determinaron que un pretratamiento con  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  como desecante afecta significativamente la viabilidad de las semillas y la prueba de Tetrazolio es un método muy válido para determinar la viabilidad de semillas de orquídeas, sin embargo, ellos determinaron que la precisión de estos estudios se ve afectada por la capacidad del analista que los interpreta.

Existen diversos trabajos que evalúan la germinación de semillas de orquídeas; sin embargo, su principal objetivo es evaluar porcentajes de germinación y velocidad de germinación en diferentes medios con la finalidad de establecer el protocolo de propagación *in vitro* de cada una de las especies, solo Salazar-Mercado (2012), realizó pruebas de germinación comparando las de tetrazolio para demostrar viabilidad de semillas tropicales colombianas.

El objetivo del presente estudio fue analizar la calidad física y fisiológica de semillas de *Encyclia adenocaula* como especie modelo y prioritaria en el Estado de México, para su conservación en un banco de germoplasma de semillas.

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos y en el Invernadero 5 que alberga la colección de orquídeas de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Se utilizaron semillas de cápsulas maduras de una población de *E. adenocaula* polinizadas en el año 2012 y colectadas en mayo del 2013 procedentes de plantas de la comunidad denominada "El Peñón" en el municipio de Temascaltepec, México, localizado UTM 14Q 381736 y 2106024 con 1789 msnm; en el laboratorio se procedió a retirar los remanentes de las flores y se colocó en sobre de papel hasta su dehiscencia a temperatura ambiente, una vez abiertas la cápsulas se procedieron a abrir por completo siguiendo las líneas longitudinales sobre una superficie de vidrio. Una vez extraídas todas las semillas, se procedió a retirar partículas extrañas o restos de las cápsulas con ayuda de unas pinzas para su posterior almacenamiento en frasco ámbar en refrigeración (10 °C) hasta su utilización.

En el análisis de semillas de *E. adenocaula* se tomaron en cuenta aspectos como tamaño, peso y estructura de la semilla y la viabilidad de la misma. Para tamaño y estructura de la semilla se tomó una muestra que fue colocada en tres portaobjetos, con ayuda de un microscopio óptico (Leica Microsystems Ltd. Leica Application Suite V4) y el paquete

There are several studies that evaluate the germination of orchid seeds, however, its main objective is to evaluate germination rates and germination rate in different media in order to set the protocol *in vitro* of each of the species propagation, only Salazar-Mercado (2012), tested for germination tetrazolium comparing to demonstrate feasibility of Colombian tropical seeds.

The aim of this study was to analyze the physical and physiological quality of *Encyclia adenocaula* as model and priority species in the State of Mexico, for their conservation in a genebank seed.

The study was conducted at the laboratory of tissue culture and greenhouse 5 which houses the collection of orchids of the Faculty of Agricultural Sciences at the Autonomous University of the State of Mexico. The mature seeds capsules were used in a population of *E. adenocaula* pollinated in 2012 and collected in May 2013 from plants of the community called "El Peñón" in the town of Temascaltepec, Mexico, located UTM 14Q 381736 and 2106024 with 1789 masl; in the laboratory he proceeded to remove the remnants of flowers and placed in paper envelope until dehiscence at room temperature, once you open the capsules proceeded to completely open along the longitudinal lines on a glass surface. Once extracted all the seeds, we proceeded to remove foreign particles or debris capsule with forceps for further storage in amber bottle under refrigeration (10 °C) until use.

In the analysis of *E. adenocaula* seeds were taken into account aspects such as size, weight and structure of the seed and the viability of it. For size and structure of the seed sample that was placed on three slides using a light microscope (Leica Microsystems Ltd. Leica Application Suite V4) and the software package Image Tool 3.00 (UTHSCSA) took 300 seeds they were measured species data taking as long and wide seed and coverage areas structures seeds. To determine the weight, 0.0001 g of seed were taken in triplicate and counted, by rule of three weight and number of seeds per gram was obtained.

The seed viability was determined by two techniques: 1) Tetrazolium test (TDZ) is a rapid test and germination. In the first methodology followed Bohm (1996), cited in Ossenbach *et al.*, 2007. A 0.0001 g was established design completely random with three replications, where four treatments, which consisted of immersing filter paper packages were evaluated seeds: T1) 24 h imbibition in distilled water, was then replaced by solution of  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  for two hours and subsequently 24 h in solution TDZ; T2) 24

computacional Image Tool 3.00 (UTHSCSA) se midieron 300 semillas de la especie tomando como dato largo y ancho de la semilla y áreas de cobertura de las estructuras de las semillas. Para determinar el peso, se tomaron 0.0001 g de semilla por triplicado y se contabilizaron, por regla de tres se obtuvo el peso y número de semillas por gramo.

La viabilidad de las semillas se determinó mediante dos técnicas: 1) la prueba de Tetrazolio (TDZ) que es una prueba rápida y la de germinación. En la primera se siguió la metodología de Bohm (1996), citada en Ossenbach *et al.*, 2007. Se estableció un diseño completamente al azar con tres repeticiones, donde se evaluaron cuatro tratamientos, que consistió en sumergir paquetes de papel filtro con 0.0001 g semillas en: T1) 24 h de imbibición en agua destilada, después se reemplazó por solución de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  por dos horas y posteriormente 24 h en solución de TDZ; T2) 24 horas de imbibición en agua destilada y 24 h en solución de TDZ; T3) 24 h de imbibición en agua destilada, después se sustituyó por solución de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  por dos horas y posteriormente 24 h en solución de TDZ más dos gotas de Tween 80 y T4) 24 horas de imbibición en agua destilada y 24 h en solución de Tetrazolio más dos gotas de Tween 80. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de Tukey al 5% con ayuda del programa estadístico The SAS System for Windows 9.0.; y 2) La prueba de germinación se utilizó un diseño completamente al azar con diez repeticiones mediante la técnica de siembra *in vitro*. El medio de cultivo fue Murashige y Skoog (MS) (1962) como medio basal, complementado con glicina ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) tiamina HCl ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), piridoxina ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa  $30 \text{ mg L}^{-1}$  adicionados como tratamientos:  $1 \text{ g L}^{-1}$  Carbón vegetal (MS+CA); 10% de extracto de plátano (MS+P); 10% de agua de coco (MS+AC); se ajustó pH a  $5.7 \pm 1$  con  $6 \text{ g L}^{-1}$  de agar. Los cultivos fueron incubados a  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , 18/6 h de fotoperiodo a una intensidad luminosa de  $27 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Se consideró como germinación la etapa fenológica denominada protocormo inicial, esto porque es una etapa visualmente fácil de detectar. Con ayuda de un microscopio estereoscópico, una cámara fotográfica y el paquete computacional Image Tool 3.00 (UTHSCSA) se obtuvieron imágenes de un campo por repetición. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de Tukey al 5% con ayuda del programa estadístico The SAS System for Windows 9.0.

Después de los estudios realizados se pudo determinar que *E. adenocaula* presenta semillas filiformes y largamente elongadas, con una longitud de  $0.56 \pm 0.08 \text{ mm}$  y un ancho de  $0.09 \pm 0.01 \text{ mm}$ , cubriendo un área de  $3.25 \pm 0.5 \text{ mm}^2$ , estos datos

hours in distilled water imbibition and 24 h in solution TDZ; T3) 24 h imbibition in distilled water, then was replaced with solution of  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  for two hours and subsequently 24 h in solution TDZ plus two drops of Tween 80 and T4) 24 hours of soaking in distilled water and 24 h Tetrazolium solution plus two drops of Tween 80. An analysis of variance and Tukey 5% was made using the statistical program SAS System for Windows 9.0; and 2) the germination test was used a completely randomized design with ten repetitions using the technique sowing of *in vitro*. The culture medium was Murashige and Skoog (MS) (1962) basal medium supplemented with glycine ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), myo-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), thiamine HCl ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), pyridoxine ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), nicotinic acid ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), sucrose  $30 \text{ mg L}^{-1}$  added as treatments:  $1 \text{ g L}^{-1}$  charcoal (MS+CA); 10% of banana extract (MS+P); 10% coconut water (MS+AC); pH was adjusted to  $5.7 \pm 1$  with  $6 \text{ g L}^{-1}$  agar. The cultures were incubated at  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , 18/6 h photoperiod at a light intensity of  $27 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Germination was considered phenological stage called initial protocorm, this because it is easy to detect visually stage. Using a stereoscopic microscope, a camera and software package Image Tool 3.00 (UTHSCSA) images of a field repetition were obtained. An analysis of variance and Tukey test at 5% was performed with the help of The SAS System for Windows 9.0 statistical software.

After studies it was determined *E. adenocaula* presents filiform and long elongated seeds, with a length of  $0.56 \pm 0.08 \text{ mm}$  and a width of  $0.09 \pm 0.01 \text{ mm}$ , covering an area of  $3.25 \pm 0.5 \text{ mm}^2$ , these data were taken from whole seeds (embryo and testa) (Figure 1), results consistent with those reported for other species of orchids since 1992 by Arditti as well as Hagsater *et al.* (2005); Verdugo *et al.* (2007); Tellez (2011) and Aguilar and López (2013), reporting seed sizes from 0.25 to 1.2 mm long and 0.09 to 0.27 mm wide.

The seed presented the two basic structures of seeds corresponding to the Orchidaceae family; an embryo lacking endosperm (reserve nutrients) with an approximate area of  $0.01 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ . The approximate weight of a seed was  $1.6 \pm 0.08 \text{ g}$ , equivalent to approximately 63 500 seeds per gram. The viability of seeds to determine whether a seed is alive and has the ability to germinate (Ruiz, 2009). According to feasibility testing, testing TDZ, called rapid test, statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between treatments were recorded, showing no significant difference T2 (50.3%) and T4 (48.2%) treatments; i.e. that pretreatment with  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  directly affected the viability of the seeds, where this solution is used the percentages were lower corresponding to T1 and

se tomaron de semillas completas (embrión y testa) (Figura 1), resultados que concuerdan con lo reportado para otras especies de orquídeas desde 1992 por Arditti así como Hágsater *et al.* (2005), Verdugo *et al.* (2007), Téllez (2011) y Aguilar y López (2013), reportando tamaños de semillas de 0.25 a 1.2 mm de largo y 0.09 a 0.27 mm de ancho.

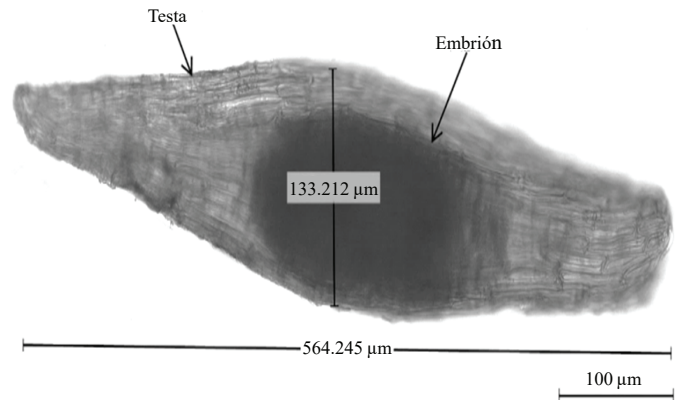
La semilla presentó las dos estructuras básicas de las semillas correspondientes a la familia Orchidaceae; un embrión carente de endospermo (reserva de nutrientes) con un área aproximada de  $0.01 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ . El peso aproximado de una semilla fue  $1.6 \pm 0.08 \text{ } \mu\text{g}$ , lo que equivale a 63 500 semillas por gramo aproximadamente.

La viabilidad de las semillas permite determinar si una semilla está viva y tiene la capacidad de germinar (Ruiz, 2009). De acuerdo a las pruebas de viabilidad, la prueba de TDZ, denominada prueba rápida, se registraron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos, no presentando diferencias significativas los tratamientos T2 (50.3 %) y T4 (48.2%); es decir, que el pretratamiento con  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  afectó directamente la viabilidad de las semillas, en donde se utilizó esta solución los porcentajes fueron más bajos correspondientes a los tratamientos T1 y T3 con 24.1 % y 48.2 % respectivamente, resultados que concuerdan con Ossenbach *et al.* (2007) para cinco especies de orquídeas entre ellas *Encyclia ochracea* donde obtuvo el 95% de viabilidad sin pretratamiento con  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  y 85% con pretratamiento.

Lallana y García (2013) reportan una viabilidad de 90 y 85% en semillas de *Trichocentrum jonesianum*, Salazar-Mercado (2012), en semillas de *Cattleya mendelii* con 93% de viabilidad y Salazar y Cancino (2012) reportan 87.2 y 80.6% de viabilidad en semillas de *P. vespa* y *S. klotzcheana* respectivamente con el mismo método. De acuerdo al análisis estadístico no existió ningún efecto significativo en la adición de gotas de Tween 80 con respecto a la pérdida de viabilidad, sin embargo, con la adición de este producto se logró una mejor observación en la coloración del embrión.

La evaluación del porcentaje de viabilidad mediante la técnica de germinación *in vitro*, mostró diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos resultando como mejor tratamiento *MS+CA* con una germinación del 56.9% a los 30 días, seguido del medio *MS+AC* con 31.4% de germinación a los 55.7 días, por último el medio *MS+P* con 23% a los 59.1 días. Resultados que concuerdan con lo reportado en Ruiz *et al.* (2008) para la misma especie 62.4% de germinación a los 27

T3 with 24.1% and 48.2% respectively, results that agree with Ossenbach *et al.* (2007) for five species of orchids including *Encyclia ochracea* obtained where 95% viability without pretreatment with  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  and 85% with pretreatment.



**Figura 1. Estructura y dimensiones de semilla típica de *Encyclia adenocaula*.** Microfotografía.

**Figure 1. Structure and dimensions of typical seed *Encyclia adenocaula*.** Microphotography.

Lallana and Garcia (2013) report a viability of 90 and 85% in *Trichocentrum jonesianum* seeds, Salazar-Mercado (2012), in *Cattleya mendelii* seeds with 93% viability and Salazar and Cancino (2012) reported 87.2 and 80.6% seeds feasibility of *P. vespa* y *S. klotzcheana* respectively with the same method. According to statistical analysis there was no any significant effect on the addition of drops of Tween 80 with respect to the loss of viability, however, with the addition of this product was achieved better observation on the coloration of the embryo.

The percentage viability assessment by the technique of *in vitro* germination, showed statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between treatments as better treatment resulting *MS+CA* with 56.9% germination at 30 days, followed by medium *MS+AC* with 31.4% germination to 55.7 days, finally the *MS+P* medium with 23% to 59.1 days. Results consistent with those reported in Ruiz *et al.* (2008) for the same species 62.4% germination at 27 days, although the difference in percentages can be given mainly by the origin of the material established in experiments. However, it is noteworthy that germination in the work can be considered from the imbibition of seeds as they consider various authors to the presence of first leaves, this must be due perhaps to the objective of the work.

However, in the same treatment the seeds germinated asynchronously; i.e. in the same condition after two months of establishing the different stages of germination and growth *in vitro* of the species were observed: imbibition,

días, aunque la diferencia en porcentajes puede estar dada principalmente por la procedencia del material establecido en los experimentos. Sin embargo es de hacer notar que la germinación en los trabajos puede ser considerada desde la imbibición de las semillas como lo consideran varios autores hasta la presencia de primeras hojas, esto debe deberse tal vez al objetivo de los trabajos.

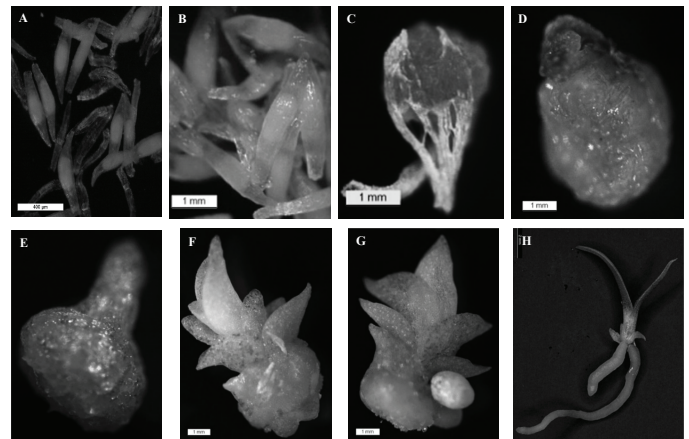
Sin embargo, en un mismo tratamiento las semillas germinaron de manera asincrónica; es decir, en igual condición después de dos meses de su establecimiento se observaron las diferentes etapas de germinación y desarrollo *in vitro* de las especie: Imbibición, presentando un hinchamiento y el embrión tomó una coloración verde pálido ocasionado por la absorción de agua (Figura 2A); semilla verde, las semillas presentaron un coloración verde acentuada y el embrión comienza a aumentar de tamaño entre los 15 días después de la siembra (Figura 2B); germinación, a los 30 días el embrión rompe la testa (Figura 2C), Protocormo inicial; a los 36 días se formó un complejo de células de color verde muy tenue, apareciendo el primordio foliar (Figura 2D); protocormo tardío, el protocormo siguió su crecimiento, naciendo en el ápice un primordio foliar a los 40 días después del establecimiento (Figura 2E); desarrollo de hojas; el primordio foliar continuó creciendo, el cuerpo del protocormo comenzó a disminuir y a diferenciarse las hojas a los 47 días aproximadamente (Figura 2F); desarrollo de raíces, se presentó a los 57 días aproximadamente, el primordio de la raíz se desarrolló cerca de la base de las hojas de color blanco (Figura 2G); plántula completa, se distinguieron raíces y hojas perfectamente (Figura 2H); as etapas que se observaron coincidieron con lo reportado con Flores *et al.* (2008), Salazar y Cancino (2012), Aguilar y López (2013) en algunas especies de orquídea.

## Conclusiones

El presente trabajo permitió determinar algunas características físicas de las semillas de *Encyclia adenocaula* como: la estructura, las dimensiones y el número de semillas por gramo ( $0.56 \pm 0.08$  mm de largo por  $0.09 \pm 0.01$  mm de ancho, y 63 500 semillas por gramo aproximadamente).

En cuanto a la calidad fisiológica se verificó para *E. adenocaula* que la viabilidad mediante la prueba de Tetrazolio al 1%, es fácil y rápida (en tres días alcanzó 50.3%) comparada con los resultados obtenidos mediante la germinación *in vitro* en medio MS adicionado con carbón

presenting swelling and embryo took a pale green caused by water absorption (Figure 2A); green seed, the seeds showed a pronounced green coloration and the embryo begins to increase in size within 15 days after sowing (Figure 2B); germination, at 30 days the embryo breaks testa (Figure 2C), initial protocorm; 36 days cell complex very faint green formed, the leaf primordium (Figure 2D) appearing; protocorm late, the protocorm continued growth, being born at the apex a foliar primordium 40 days after the establishment (Figure 2E); leaf development; the leaf primordium continued to grow, protocorm body began to decrease and to differentiate the leaves to about 47 days (Figure 2F); root development, was presented to the 57 days or so, the root primordia developed near the base of the leaves white (Figure 2G); full seedling, roots and leaves perfectly (Figure 2H) distinguished; They were seen as stages coincided with that reported with Flores *et al.* (2008), Salazar and Cancino (2012), Aguilar and López (2013) in some species of orchid.



**Figura 2. Germinación y desarrollo *in vitro* de *Encyclia adenocaula*. A. Imbibición a los  $\pm 7$  días después de la siembra, barra de escala 400  $\mu\text{m}$ . B. Semillas verdes,  $\pm 15$  días. Barra de escala 1 mm. C. Germinación,  $\pm 30$  días, barra de escala 1 mm. D. Protocormo inicial,  $\pm 36$  días, barra de escala 1 mm. E. Protocormo tardío,  $\pm 40$  días, barra de escala 1 mm. F. Desarrollo de hojas,  $\pm 47$  días, barra de escala 1 mm. G. Desarrollo de raíz,  $\pm 57$  días, barra de escala 1 mm. H. Plántula completa, barra de escala 2 mm. Microfotografías.**

**Figure 2. Germination and *in vitro* development of *Encyclia adenocaula*. A. imbibition to  $\pm 7$  days after sowing, scale bar 400  $\mu\text{m}$ . B. Green seeds,  $\pm 15$  days. Scale bar 1 mm. C. Germination,  $\pm 30$  days, 1 mm, scale bar. D. initial protocorm,  $\pm 36$  days, 1 mm, scale bar. E. protocorm late,  $\pm 40$  days, scale bar 1 mm. F. Development of leaves,  $\pm 47$  days, scale bar 1 mm. G. root development,  $\pm 57$  days, 1 mm, scale bar. H. Full seedling, scale bar 2 mm. Photomicrographs.**

activado a los 30 días (alcanzó un 56.9%). Se observó que el pretratamiento con  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  (desecante) disminuye la viabilidad de semillas.

La germinación *in vitro* de *E. adenocaula* se presentó de manera asincrónica lográndose determinar el proceso de germinación y desarrollo *in vitro* de la especie, desde su imbibición hasta la formación de plántula.

Conservar los recursos en un banco de semillas permite eliminar problemas intrínsecos de la conservación *ex situ*, como la pérdida de viabilidad genética debido al efecto de fundador, analizando la calidad de las semillas podemos almacenarlas con la seguridad de que en un tiempo determinado se logrará su regeneración sin problemas.

## Literatura citada

- Aguilar, M. M. A. y López, E. A. L. 2013. Germinación *in situ* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*. In: Pulido-Flores, G. and Monk, S. (Eds.). Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas. Volumen II, Lincoln, NE: Zea Books.
- Arditti, J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 18-24 pp.
- Flores, E. G.; Legaria, S. J. P.; Gil, V. I. y Colinas, L. M. T. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 14(3):347-353.
- Lallana, V. H. y García, L. F. 2013. Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). Argentina. Investigación Agraria. 15(2):129-132.
- Lascuráin, M.; List, R.; Barraza, L.; Díaz, E. P.; Gual, F.S.; Maunder, M.; Dorantes, J. y Luna, V. E. 2009. Conservación de especies *ex situ*, en capital natural de México. Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México. 517-544 pp.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15(3):473-497.
- Ossenbach, C.; Arce, J. y Warner, J. 2007. Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: II. Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. Tierra Tropical. 3(1):47-59.
- Raó, N. K.; J. Hanson, M. E.; Dulloo, K.; Ghosh, D.; Novell y Larinde M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para bancos de germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia. 165 p.
- Ruiz, B. C.; Laguna, C. A.; Iglesias, A. L. G.; Damon, A.; Marín, H. T. N. J.; Azpíroz, R. H. S. and Moreno, M. J. L. 2008. *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). Rev. Int. Bot. 77:203-215.
- Ruiz, M. A. 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. Estación Experimental Agropecuaria Anguil "Ing. Agr. Guillermo Covas". Argentina. Publicación técnica 17. 20 p.

## Conclusions

This work allowed to determine some physical characteristics of seeds *Encyclia adenocaula* as: the structure, size and number of seeds per gram ( $0.56 \pm 0.08$  mm long by  $0.09 \pm 0.01$  mm wide and 63 500 seeds per gram).

As for the physiological quality was checked for *E. adenocaula* that viability by testing Tetrazolium 1%, it is easy and quick (within three days reached 50.3%) compared with the results obtained by *in vitro* germination on MS medium supplemented with activated coal at 30 days (56.9% reached). It was observed that pretreatment with  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  (desiccant) seed viability decreases.

The *in vitro* germination of *E. adenocaula* was presented asynchronously achieving determine the germination process and development *in vitro* of the species from its imbibition until the formation of seedling.

Conserve resources in a seed bank eliminates intrinsic problems of *ex situ* conservation, such as loss of genetic viability due to founder effect, analyzing the quality of the seeds we can store them with the assurance that at any given time achieve its regeneration smoothly.

End of the English version



- Salazar-Mercado, S. A. 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). Acta Agronómica. 61(1):69-68.
- Salazar, S. A. M and Cancino, G. O. 2012. Evaluation of the effects of two organics supplements on *in vitro* germination of native orchids in the province of Pamplona, Colombia. Rev. Colomb. Biotecnol. 14(1):53-59.
- Sánchez, Ch. N. y Jiménez, V. M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. Agron. Mesoam. 21(1):193-205.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- lista de Especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre. México.
- Szeszko, D. R. F. 2011. La orquideoflora mexiquense. Biblioteca mexiquense del bicentenario, colección mayor del estado de México: patrimonio del pueblo. Consejo Editorial de la Administración Pública Estatal. 362 p.
- Téllez, V. M. A. A. 2011. Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Texcoco, Edo de México. 179 p.