

## Conservación *in vitro* de *Notylia barkeri* Lindl.

### *In vitro* conservation of *Notylia barkeri* Lindl.

García-Merino, G. F.<sup>1</sup> , Ramírez-Mosqueda, M. A.<sup>2\*</sup> , Mata-Alejandro, H.<sup>1</sup> ,  
López-Larios, A. V.<sup>2</sup>, López-Aguilar, R.<sup>2</sup>

#### RESUMEN

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Carretera Peñuela-Amatlán de los Reyes Km 1, 94950, Veracruz, México. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Unidad Guerrero Negro. Independencia y Paseo Eucalipto s/n, 23940, Guerrero Negro, Baja California Sur. México

La relevancia ornamental de las especies de orquídeas radica en sus características morfológicas. *Notylia barkeri* Lindl. está catalogada en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Por tanto, resulta imperativo instituir métodos de preservación para salvaguardar su viabilidad a largo plazo. El objetivo fue establecer un protocolo de conservación *in vitro* de *N. barkeri*. Se evaluaron diferentes concentraciones de ácido abscísico (0.1 y 2 mg•L<sup>-1</sup>) y ancimídol (0.1 y 2 mg•L<sup>-1</sup>) en medio Murashige y Skoog. Después de 180 días se evaluó el porcentaje de supervivencia, número y longitud de brotes, número de hojas, número y longitud de raíces. El mayor porcentaje de supervivencia (85.71 %) se observó en tratamiento testigo. Mientras que en 1 mg•L<sup>-1</sup> de ácido abscísico se observó 57.14 %. Los menores porcentajes se observaron en ancimídol. Se observó que en 1 mg•L<sup>-1</sup> de ácido abscísico se reduce la longitud de brotes sin afectar su supervivencia a diferencia de cuando se utilizó ancimídol. Además, en 1 mg•L<sup>-1</sup> de ácido abscísico se redujo el número y longitud de raíces. Nuestros resultados pueden contribuir a la conservación de esta especie con interés ornamental.



Please cite this article as/Como citar este artículo: García-Merino, G. F., Ramírez-Mosqueda, M. A., Mata-Alejandro, H., López-Larios, A. V., López-Aguilar, R. (2024). *In vitro* conservation of *Notylia barkeri* Lindl. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1633. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1633>

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: January 18<sup>th</sup> 2024.

Accepted/Aceptado: March 20<sup>th</sup> 2024.

Available on line/Publicado: April 12<sup>th</sup> 2024.

**PALABRAS CLAVE:** Preservación del germoplasma, orquídea, ornamental, ácido abscísico, ancimídol.

#### \*Corresponding Author:

**Marco A. Ramírez-Mosqueda.** Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Unidad Guerrero Negro. Independencia y Paseo Eucalipto s/n, 23940, Guerrero Negro, Baja California Sur. México. Teléfono: +52 615 157 1750 ext. 4105 E-mail: [marcomosqueda02@hotmail.com](mailto:marcomosqueda02@hotmail.com)

---

## ABSTRACT

---

The ornamental significance of orchid species lies in their morphological characteristics. *Notylia barkeri* Lindl. is listed in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Therefore, it is imperative to institute preservation methods to safeguard its long-term viability. The objective was to establish an *in vitro* conservation protocol for *N. barkeri*. Different concentrations of abscisic acid (0.1 and 2 mg•L<sup>-1</sup>) and ancymidol (0.1 and 2 mg•L<sup>-1</sup>) were evaluated in the Murashige and Skoog medium. After 180 days, the survival percentage, number and length of shoots, number of leaves, and number and length of roots were evaluated. The highest survival percentage (85.71 %) was observed in control treatment. While in 1 mg•L<sup>-1</sup> of abscisic acid, 57.14 % was observed. The lowest percentages were observed in ancymidol. It was observed that at 1 mg•L<sup>-1</sup> of abscisic acid, the shoot length was reduced without affecting survival, as opposed to when ancymidol was used. Additionally, 1 mg•L<sup>-1</sup> of abscisic acid reduced the number and length of roots. Obtained data may contribute to the conservation of this species of ornamental interest.

---

**KEY WORDS** : Germplasm preservation, orchid, ornamental, abscisic acid, ancymidol.

---

## Introducción

La fragmentación del hábitat, consecuencia del cambio en el uso del suelo inducido por actividades antropogénicas, tiene un impacto sustancial en las poblaciones silvestres de orquídeas (Mafakheri *et al.*, 2022). La pérdida directa de hábitats naturales utilizados por las poblaciones silvestres de orquídeas para su supervivencia y reproducción ha generado amenazas de extinción (Baidar & Florens, 2021). Así como la extracción ilegal y en algunas ocasiones el uso tradicional de estas especies (Castillo-Pérez *et al.*, 2022). Estos fenómenos desencadenan efectos negativos en la ecología y acervo genético de miembros de la familia Orchidaceae (Boucher *et al.*, 2017). Todo esto contribuye a que diversas orquídeas figuren en listas nacionales e internacionales de especies en peligro y/o amenaza de extinción.

*Notylia barkeri* Lindl. se encuentra catalogada en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). En dicho apéndice se incorporan especies que no necesariamente están en riesgo de extinción, pero cuyo potencial de uso precisa regulación para prevenir prácticas incompatibles con sus mecanismos de supervivencia. Esta orquídea es epífita de pequeñas dimensiones, tiene flores amarillas en inflorescencias que cuentan con 50-100 flores cada una (Damon & Valle-Mora, 2008; Hernández-Orta, 2019). Esta especie tiene una fragancia conformada por 20 compuestos químicos, siendo

b-bisaboleno con 40.61 % (con propiedad anticancerígena) y 1,8-cineol con 29.35 % (utilizado en perfumes) los más predominantes (Cancino & Damon, 2007), aunado a esto *N. barkeri* tiene potencial para ser participe del comercio ornamental de orquídeas. El comercio de orquídeas ha ido aumentando de manera exponencial en la última década (Tiwari et al., 2024).

Esta especie se encuentra en diferentes regiones tropicales y subtropicales de América, particularmente en bosques tropicales (Valen, 2016). En México cuenta con una distribución desde Jalisco y Tamaulipas hasta el sur, incluidos Chiapas, Tabasco y Quintana Roo (Hernández-Orta et al., 2019). Sin embargo, se cree que debido a la deforestación por el cambio de uso de suelo esta especie puede enfrentar una reducción de sus poblaciones naturales y entrar a alguna de las categorías de amenaza.

La conservación efectiva de orquídeas requiere estrategias *in situ* y *ex situ* efectivas, dentro de estas últimas destaca la propagación artificial a través del cultivo de tejidos vegetales (PTC) (Wraith et al., 2020). La conservación *in vitro* salvaguarda germoplasma de gran interés a partir del uso de un medio artificial y condiciones de incubación controladas (Chauhan et al., 2019). La literatura existente sobre la conservación *in vitro* de orquídeas revela un interés creciente en la aplicación de inhibidores de crecimiento vegetal para mejorar la eficacia de los protocolos de conservación (Zhou et al., 2021; Targu et al., 2023). Estudios previos han explorado diversos inhibidores resultados prometedores en términos de la supresión del crecimiento excesivo de tejido y la preservación de la viabilidad a largo plazo, sin embargo, se observa una variabilidad significativa en la respuesta de diferentes especies de orquídeas a estos inhibidores. Esta técnica ha permitido la conservación *in vitro* de diferentes especies de orquídeas como laelia (*Laelia anceps*) (Ramírez-Mosqueda et al., 2019), *Stanhopea tigrina* (Cruz-Cruz et al., 2022) y vainilla (*Vanilla planifolia*) (Bautista-Aguilar et al., 2021).

La conservación *in vitro* por mínimo crecimiento implica estrategias específicas centradas en la reducción de nutrientes en el medio de cultivo y la aplicación de inhibidores del crecimiento (Chauhan et al., 2019). Entre estos inhibidores se incluyen sustancias como el ácido abscísico (ABA), ancimidol (ANC), paclobutrazol (PBZ), polietilenoglicol (PEG) y otros osmorreguladores como sorbitol y manitol, modificando (Mancilla-Álvarez et al., 2019; Pujasatria et al., 2020).

La conservación de *N. barkeri*, reviste una importancia crucial en la preservación de la biodiversidad y la protección de especies amenazadas. Esta orquídea, específicamente, posee características únicas que demandan un enfoque especializado para su conservación a largo plazo. El establecimiento de un protocolo de conservación *in vitro* mediante el uso de inhibidores de crecimiento vegetal representa una vía innovadora y eficaz para garantizar su supervivencia. A pesar de los avances en este campo, existen limitaciones que deben abordarse, como la diversidad de inhibidores, cantidad de aplicación de inhibidores y tiempo de conservación. No obstante, el alcance de esta investigación se extiende a la generación de pautas prácticas y aplicables. Por tanto, el enfoque metodológico se centra en la evaluación rigurosa de diferentes inhibidores, con el objetivo de desarrollar un protocolo efectivo y reproducible que pueda ser implementado en la conservación de *N. barkeri* y potencialmente extrapolarlo a otras especies vegetales amenazadas.

## Material y Métodos

### Material vegetal

Se utilizaron plantas de *N. barkeri* previamente establecidas *in vitro*, estas provinieron de la germinación asimbiótica de semillas de esta orquídea. La cápsula fue colectada de plantaciones de café de la Localidad de La Palma, Córdoba, Veracruz, México. Para la germinación, se utilizó medio MS (Murasnige & Skoog, 1962) suplementado con 30 g•L<sup>-1</sup> de sacarosa y sin reguladores del crecimiento vegetal (RCVs). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 ± 0.2, se agregaron 2.5 g•L<sup>-1</sup> de Phytigel® como agente gelificante y se dosificaron 20 mL de medio en frascos tipo "G". Los frascos con medio de cultivo se esterilizaron en autoclave a 1.5 kg•cm<sup>-2</sup> y 121 °C durante 15 min. Los cultivos fueron incubados a 24 ± 2 °C, bajo irradiación artificial con luces LEDs a 50 μmol•m<sup>-2</sup>•s<sup>-1</sup> en un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Sigma Aldrich.

### Conservación *in vitro* de *Notylia barkeri* Lindl

Brotos individuales de 0.5-1.0 cm de longitud fueron transferidos a tubos de ensayo (22 × 220 mm) que contenían 15 mL de medio de cultivo MS suplementado con 30 g•L<sup>-1</sup> de sacarosa. Se analizó el efecto de los inhibidores del crecimiento ácido abscísico (ABA) y ancimídol (ANC) a diferentes concentraciones (0, 1 y 2 mg•L<sup>-1</sup>). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 ± 0.2, se agregaron 2.5 g•L<sup>-1</sup> de Phytigel® como agente gelificante. Los tubos de ensayo se esterilizaron en autoclave a 1.5 kg•cm<sup>-2</sup> y 121 °C durante 15 min. Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C bajo una irradiación de 50 μmol•m<sup>-2</sup>•s<sup>-1</sup> proporcionada por LEDs en un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Después de 180 días, se registró la tasa de supervivencia, el número brotes, longitud de brotes, el número de hojas y número raíces por explante.

### Regeneración *in vitro* y aclimatización

Después de 180 días en conservación, brotes individuales de 1.0-2.0 cm de longitud obtenidos del tratamiento 1 mg•L<sup>-1</sup> de ABA fueron transferidos a medio MS descrito anteriormente suplementado con 2 mg•L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina. El pH, la esterilización de los medios de cultivo y la incubación fueron como se describe anteriormente en el apartado de conservación *in vitro*. Después de 30 días de cultivo se evaluó el número de brotes por explante.

Posteriormente para la aclimatización, se tomaron brotes con una altura entre 3 y 5 cm y con óptimo desarrollo radicular se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente, los brotes se plantaron en turba estéril + agrolita (1:1 v/v) utilizando bandejas de 60 cavidades (5 × 5 × 8 cm). Las plantas se mantuvieron en las bandejas cerradas por 14 días, posteriormente se mantuvieron en condiciones de invernadero (bajo irradiación de luz natural de 130 μmol•m<sup>-2</sup>•s<sup>-1</sup>, 30 ± 2 °C y 60 ± 5 % RH. Se aplicó fertilizante foliar Gro-green® (20-30-10 NPK) (1 mg•L<sup>-1</sup>) una vez cada 7 días. Se estableció un riego por día y después de 60 días de crecimiento, se determinó el porcentaje de supervivencia.

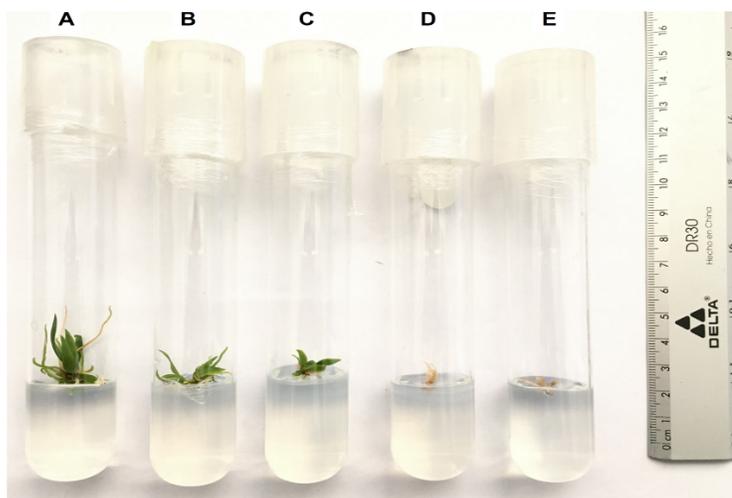
## Análisis estadísticos

En todos los experimentos se utilizó un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente con el software IBM SPSS Statistics (versión 21). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), con el fin de saber si existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Los datos porcentuales se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje para cumplir los supuestos de normalidad e igualdad de varianza.

## Resultados y Discusión

### Conservación *in vitro* de *Notylia barkeri* Lindl

Después de 180 días de conservación *in vitro*, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 1). Se observó en el tratamiento testigo el mayor porcentaje de supervivencia (85.71 %), seguido del tratamiento con  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA (67.14 %) y el tratamiento con  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA con un 28.57 % (Figura 1A, B y C, respectivamente). Los tratamientos que contenían ANC afectaron drásticamente la supervivencia de los brotes de *N. barkeri* (Figura 1D y E). Se observó en el tratamiento con  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANC el porcentaje de supervivencia menor (14.28 %). Para número de brotes no existieron diferencias significativas (Tabla 1). Brotes con 2.64 cm de longitud fueron observados en el tratamiento testigo, seguidos de 1.11 cm en  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA y 1.00 cm en  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA. Existió disminución drástica en longitud de los brotes en los tratamientos que contenían ANC. El número mayor de hojas por explante (5.42) se obtuvo en el tratamiento control, mientras que la incorporación de ABA al medio de cultivo disminuyó significativamente la formación de hojas. Por otro lado, la adición de ANC, en cualquiera de las concentraciones evaluadas, produjo a una reducción drástica en la formación de hojas. Con relación al número y longitud de raíces, el tratamiento control generó un mayor número y longitud de raíces en comparación con los tratamientos que involucraron la adición de ABA. La adición de ANC no generó la formación de raíces en brotes de *N. barkeri* conservados *in vitro* durante 180 días.



**Figura 1. Conservación *in vitro* de *Notylia barkeri* Lindl después de 180 días de cultivo. A) Testigo, B) 1 mg·L<sup>-1</sup> de ABA, C) 2 mg·L<sup>-1</sup> de ABA, D) 1 mg·L<sup>-1</sup> de ANC y E) 2 mg·L<sup>-1</sup> de ANC.**

Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

**Table 1. Efecto de diferentes concentraciones de ABA y ANC sobre la conservación *in vitro* de *Notylia barkeri* Lindl.**

Tratamiento (ABA/ANC)	Supervivencia	Número de brotes	Longitud de brotes	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíces
0 mg·L <sup>-1</sup>	85.71 ± 0.41 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.42 ± 1.50 <sup>a</sup>	6.42 ± 0.84 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.11 <sup>a</sup>
1 mg·L <sup>-1</sup> ABA	67.14 ± 0.29 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.07 <sup>b</sup>	3.28 ± 0.42 <sup>ab</sup>	3.14 ± 0.59 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.16 <sup>a</sup>
2 mg·L <sup>-1</sup> ABA	28.57 ± 0.48 <sup>c</sup>	1.14 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.42 ± 0.42 <sup>ab</sup>	2.42 ± 0.36 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.05 <sup>b</sup>
1 mg·L <sup>-1</sup> ANC	14.28 ± 0.26 <sup>d</sup>	0.85 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.85 ± 0.34 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
2 mg·L <sup>-1</sup> ANC	28.57 ± 0.26 <sup>c</sup>	0.71 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.71 ± 0.47 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>

Se representa la media ± error estándar. Letras diferentes expresan diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

En este estudio se logró conservar germoplasma *in vitro* de *N. barkeri* por 180 días bajo mínimo crecimiento, así como regenerar y climatizar con éxito este material vegetal proveniente del programa de conservación. La conservación del germoplasma vegetal tiene como objetivo preservar la variabilidad genética tanto intraespecífica como interespecífica que albergan los individuos pertenecientes a una misma especie (Priyanka *et al.*, 2021). No obstante, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales ofrecen una alternativa eficaz al posibilitar la preservación de plántulas en bancos de germoplasma *in vitro*; garantizando plantas libres de patógenos, conservadas en espacios reducidos, con bajos costos y proporcionando ambientes controlados para la manipulación eficiente, tanto a corto como a mediano plazo, del material vegetal (Shahzad *et al.*, 2017).

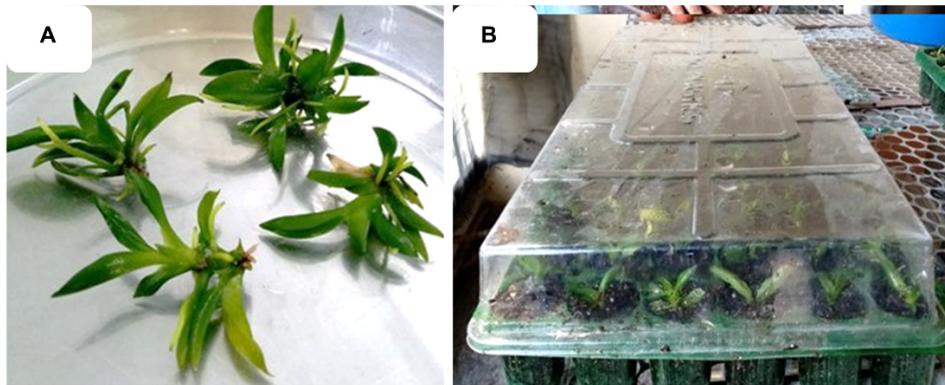
El ácido abscísico (ABA) es regulador del crecimiento vegetal (PGR), que entre las diversas funciones que regula esta el ser un inhibidor del crecimiento (Chen *et al.*, 2020). En este estudio se observó que la adición de ABA al medio de cultivo, generó la reducción en la longitud de los brotes, número de hojas, número y longitud de raíces. Sin embargo, afectó el porcentaje de supervivencia. La eficiencia del ABA en la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal ha sido reportada en diversas especies de orquídeas. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2019) observaron que fue necesario utilizar  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ABA en la conservación *in vitro* de *Laelia anceps*. Mientras que Cruz-Cruz *et al.* (2022) agregaron  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ABA en la conservación *in vitro* de *Stanhopea tigrina*. Sin embargo, en este estudio se observó que  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de ABA redujo la supervivencia de brotes de *N. barkeri*.

El uso de ancimidol ocasionó una drástica reducción en la supervivencia de los brotes de *N. barkeri* conservados *in vitro*. Esto contrasta con Mancilla-Álvarez *et al.* (2019), quienes reportaron que  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANC es efectivo en la conservación *in vitro* de malanga, reduciendo drásticamente variables de crecimiento como la longitud de los brotes; número de brotes, hojas y raíces; y longitud de la raíz, si afectar la supervivencia de los brotes. Este compuesto produce diversos efectos sobre la fisiología vegetal, principalmente la inhibición de giberelinas, reduciendo el crecimiento y desarrollo de plantas conservadas *in vitro* (Al-Ajlouni *et al.*, 2023).

En los últimos años, el ABA al igual que el ANC son dos inhibidores del crecimiento empleados con frecuencia en protocolo de conservación *in vitro* del germoplasma vegetal (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019; Mancilla-Álvarez *et al.*, 2019; Cruz-Cruz *et al.*, 2022). Sin embargo, es necesario tener en cuenta la susceptibilidad de las diferentes especies vegetales a estos compuestos, al momento de someterlas a estrategias de conservación como el mínimo crecimiento. Este hallazgo puede tener implicaciones importantes en la planificación de estrategias de conservación, ya que la presencia de ANC podría representar una amenaza potencial para el desarrollo y crecimiento de esta especie.

### **Regeneración *in vitro* y aclimatización**

Después de 30 días de cultivo, se obtuvo la regeneración de 3.4 brotes por explante en un medio de cultivo suplementado con  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP (Figura 2A). Después de sesenta días en el proceso de aclimatización, se observó un 82 % de supervivencia en las plantas de *N. barkeri* (Figura 2B).



**Figura 2. Regeneración *in vitro* y aclimatización del germoplasma conservado de *N. barkeri*. A) Proliferación de brotes en medio MS con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP, B) Plantas aclimatizadas después de ocho semanas de cultivo.**

Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

Por último, el éxito de un protocolo de conservación *in vitro* se basa en la capacidad de regeneración y aclimatización de plantas a partir del germoplasma preservado (Murthy *et al.*, 2018; Mancilla-Álvarez *et al.*, 2019). El BAP es un regulador del crecimiento vegetal sintético que se emplea con frecuencia durante la fase de proliferación de brotes *in vitro* en diversas orquídeas como *Catasetum integerrimum* (Castillo-Pérez *et al.*, 2022), *Dryadella zebrina* (dos Santos Anjos *et al.*, 2021) y *Phalaenopsis philippinensis* (Khorshidi, 2023). Lo cual concuerda con nuestro estudio, al permitir la regeneración de brotes a partir del material conservado de *N. barkeri* en ABA por 180 días. No obstante, se podría hacer uso de innovaciones en el PTC como los sistemas de inmersión temporal si se requieren grandes cantidades de plantas a partir del germoplasma conservado (Vendrame *et al.*, 2023). Mientras que en nuestro estudio los altos porcentajes de aclimatización obtenidos garantizan el éxito del protocolo descrito.

## Conclusiones

Se logró establecer un método efectivo de conservación y regeneración *in vitro* de *N. barkeri* con el uso de ABA. Además, se demostró que el uso de ANC no es viable ya que debido a su impacto negativo en el crecimiento y supervivencia no se recomienda en la conservación *in vitro* de esta especie. Los resultados obtenidos en este trabajo podrán ser utilizados en futuros programas de conservación de esta especie de orquídea, a través del establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro*.

## Contribución de los autores

García-Merino: Investigación, Metodología, Redacción-Borrador Original. Ramírez-Mosqueda: Conceptualización del trabajo, Redacción-Revisión y Edición, Visualización. Mata-Alejandro: Conceptualización, Revisión y Edición, Visualización. López-Larios: Conceptualización, Metodología, Revisión y Edición, Visualización. López-Aguilar: Conceptualización y Revisión.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

## Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento externo

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias

- Al-Ajlouni, M. G., Othman, Y. A., Tala, S., & Ayad, J. Y. (2023). Liliun morphology, physiology, anatomy and postharvest flower quality in response to plant growth regulators. *South African Journal of Botany*, 156, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.03.004>
- Baider, C., & Florens, F. V. (2021). Diversity, Ecology, and Conservation of Mauritius Orchids. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture: Fundamentals and Applications*, 1-27 [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11257-8\\_29-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11257-8_29-1)
- 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/10.21273/HORTSCI16118-21>
- Boucher, F. C., Verboom, G. A., Musker, S., & Ellis, A. G. (2017). Plant size: a key determinant of diversification?. *New Phytologist*, 216(1), 24-31. <https://doi.org/10.1111/nph.14697>
- Cancino, A. D. M., & Damon, A. (2007). Fragrance analysis of euglossine bee pollinated orchids from Soconusco, south-east Mexico. *Plant Species Biol*, 22(2), 127-132. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2007.00185.x>
- Castillo-Pérez, L. J., Alonso-Castro, A. J., Fortanelli-Martínez, J., & Carranza-Álvarez, C. (2022). Micropropagation of *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae) through seed germination and direct shoot regeneration from pseudobulbs and roots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58(2), 279-289. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10248-3>
- Chauhan, R., Singh, V., & Quraishi, A. (2019). In vitro conservation through slow-growth storage. *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*, 397-416. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1111-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1111-1_17)

- [doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_19)
- Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of integrative plant biology*, 62(1), 25-54. <https://doi.org/10.1111/jipb.12899>
- 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/10.1016/j.sajb.2022.10.014>
- Damon, A., & Valle-Mora, J. (2008). Retrospective spatial analysis of the pollination of two miniature epiphytic orchids with different pollination strategies in a coffee plantation in Soconusco, Chiapas, Mexico. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158(3), 448-459. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00857.x>
- dos Santos Anjos, J., Alves Stefanello, C., do Nascimento Vieira, L., Giacomolli Polesi, L., Guerra, M. P., & Pacheco de Freitas Fraga, H. (2021). The cytokinin 6-benzylaminopurine improves the formation and development of *Dryadella zebrina* (Orchidaceae) in vitro shoots. *Brazilian Journal of Botany*, 44, 811-819. <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00753-5>
- Hernández-Orta, C. A., Aguilar-Dorantes, K. M., Morales-Linares, J., & Bertolini, V. (2019). New records of Orchidaceae Juss for the state from Hidalgo, Mexico. *Check List - the journal of biodiversity data*, 15(5). <https://doi.org/10.15560/15.5.827>
- Khorshidi, M. (2023). The effect of some growth regulators on the micro propagation of orchid (*Phalaenopsis philippinensis*) by flowering stem buds. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 68(4), 24-36. <https://doi.org/10.30495/iper.2022.688801>
- Mafakheri, M., Bakhshipour, M., Omrani, M., Gholizadeh, H., Rahimi, N., Mobaraki, A., & Rahimi, M. (2022). The impact of environmental and climatic variables on genetic diversity and plant functional traits of the endangered tuberous orchid (*Orchis mascula* L.). *Scientific Reports*, 12(1), 19765. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19864-4>
- Mancilla-Álvarez, E., Ramírez-Mosqueda, M. A., Arano-Avalos, S., Núñez-Pastrana, R., & Bello-Bello, J. J. (2019). In vitro techniques to the conservation and plant regeneration of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott). *HortScience*, 54(3), 514-518.) <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13835-18>
- Murasnige, T. & Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with to bacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murthy, H. N., Paek, K. Y. & Park, S. Y. (2018). Micropropagation of orchids by using bioreactor technology. *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols*, 195-208. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_9)
- Priyanka, V., Kumar, R., Dhaliwal, I., & Kaushik, P. (2021). Germplasm conservation: Instrumental in agricultural biodiversity-A review. *Sustainability*, 13(12), 6743. <https://doi.org/10.3390/su13126743>
- Pujasatria, G. C., Miura, C., & Kaminaka, H. (2020). In vitro symbiotic germination: a revitalized heuristic approach for orchid species conservation. *Plants*, 9(12), 1742. <https://doi.org/10.3390/plants9121742>
- 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/10.1016/j.sajb.2018.11.010>

- Shahzad, A., Parveen, S., Sharma, S., Shaheen, A., Saeed, T., Yadav, V., & Upadhyay, A. (2017). Plant tissue culture: applications in plant improvement and conservation. *Plant Biotechnology: principles and applications*, 37-72. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5_2)
- Targu, M., Debnath, S., & Kumaria, S. (2023). Biotechnological approaches for in vitro propagation, conservation and secondary metabolites production in *Bulbophyllum*, an endangered orchid genus: a review. *3 Biotech*, 13(10), 330. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03750-5>
- Tiwari, P., Sharma, A., Bose, S. K., & Park, K. I. (2024). Advances in Orchid Biology: Biotechnological Achievements, Translational Success, and Commercial Outcomes. *Horticulturae*, 10(2), 152. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10020152>
- Valen, D. (2016). On the horticultural origins of Victorian glasshouse culture. *Journal of the Society of Architectural Historians*, 75(4), 403-423. <https://doi.org/10.1525/jsah.2016.75.4.403>
- Vendrame, W. A., Xu, J., & Beleski, D. G. (2023). Micropropagation of *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. using SETIS™ bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 153(1), 67-76. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02441y>
- Wraith, J., Norman, P., & Pickering, C. (2020). Orchid conservation and research: An analysis of gaps and priorities for globally Red Listed species. *A Journal of Environment and Society*, 49, 1601-1611. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01306-7>
- Zhou, Z., Shi, R., Zhang, Y., Xing, X., & Jin, X. (2021). Orchid conservation in China from 2000 to 2020: Achievements and perspectives. *Plant Diversity*, 43(5), 343-349. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2021.06.003>