

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Desarrollo de un protocolo para obtención de células en metafase en orquídeas

Development of a protocol for obtaining metaphase cells in orchids

Authors/Autores: Marrufo-Trujillo, M.F., Ballesteros-Rodríguez, E., Escalante-Erosa, F., Chan Balam, R.H., Sánchez Teyer, L.F., García-Castillo, M.J.

ID: e2109

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e2109>

Received/Fecha de recepción: November 24th 2025

Accepted /Fecha de aceptación: July 03th 2026

Available online/Fecha de publicación: September 03th 2026

Please cite this article as/Como citar este artículo: Marrufo-Trujillo, M.F., Ballesteros-Rodríguez, E., Escalante-Erosa, F., Chan Balam, R.H., Sánchez Teyer, L.F., García-Castillo, M.J. (2026). Development of a protocol for obtaining metaphase cells in orchids. *Revista Bio Ciencias*, 13, e2109. <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e2109>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Reporte técnico / Technical report

Desarrollo de un protocolo para obtención de células en metafase en orquídeas

Development of a protocol for obtaining metaphase cells in orchids

Protocolo para la obtención de células en orquídeas /

Protocol obtaining cells in orchids

Marrufo-Trujillo, M.F.¹ (ID), Ballesteros-Rodríguez, E.² (ID), Escalante Erosa, F.² (ID), Raúl Humberto Chan Balam² (ID), Sánchez Teyer, L.F.² (ID), García-Castillo, M.J.*² (ID)

¹Unidad de Biotecnología, Universidad Anahuac Mayab. Km 15.5, Carr. Mérida - Progreso, C.P 97302, Mérida, Yucatán, México.

²Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo; CP 97205, Mérida, Yucatán, México.

***Corresponding Author:**

María José García Castillo. Unidad de Biotecnología. Centro de investigación científica de Yucatán A.C. Calle 43, No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo. C.P 97205, Mérida, Yucatán, México. Teléfono: 01-(52) 999 942 83 30. E-mail: fish.gish@cicy.mx, mjgc.2589@gmail.com

RESUMEN

Las orquídeas son un grupo de plantas muy diverso y de gran importancia ornamental, ecológica y económica; comprender su biología es esencial para su conservación y mejoramiento. Este estudio desarrolló un protocolo eficiente para obtener y teñir células en metafase en tres especies de orquídeas, utilizando técnicas citogenéticas clásicas como el pretratamiento de raíces, fijación y tinción para visualizar cromosomas. Los resultados mostraron células con cromosomas bien dispersos y contrastados, permitiendo identificar diferencias en número y morfología entre especies. El protocolo optimizado resulta útil para estudios cromosómicos y para apoyar programas de reproducción y mejoramiento genético.

PALABRAS CLAVE:

Orquídeas, Citogenética, Cromosomas.

ABSTRACT

Orchids are a highly diverse group of plants with significant ornamental, ecological, and economic importance; understanding their biology is essential for their conservation and improvement. This study developed an efficient protocol to obtain and stain metaphase cells in three orchid species, using classical cytogenetic techniques such as root pretreatment, fixation, and staining to visualize chromosomes. The results showed cells with well-

dispersed and contrasted chromosomes, allowing the identification of differences in number and morphology between species. The optimized protocol is useful for chromosomal studies and to support breeding and genetic improvement programs.

KEY WORDS:

Orchids, Cytogenetics, Chromosomes.

Introducción

Las orquídeas, pertenecen al orden asparagales y a la familia Orchidacea. Constituye uno de los grupos de angiospermas más diversos, caracterizándose por sus adaptaciones evolutivas, diversidad floral y diversidad morfológica. Esta familia se divide en 5 subfamilias Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Orchidoideae y Epidendroideae, la última siendo la más extensa y diversa especialmente en regiones tropicales (Chase et al., 2015).

México cuenta con alrededor de 1200 especies de orquídeas registradas y aproximadamente el 51 % son endémicas (Sosa & De-Nova, 2012). Esta notable diversidad se explica por la amplia heterogeneidad geográfica y climática presente en el país. Las orquídeas poseen una gran relevancia económica debido a su valor ornamental, su uso en la medicina tradicional y la obtención de productos derivados. Un ejemplo destacado es *Vainilla planifolia*, originaria de México, y cuya vaina produce la vainilla, un compuesto aromático de alta demanda en las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica (Rojas et al., 2020). Además de su valor comercial directo, las orquídeas sintetizan una amplia variedad de metabolitos secundarios con aplicaciones industriales, entre ellos alcaloides, flavonoides, terpenoides y compuestos fenólicos. En especies del género *Dendrobium* se han identificado metabolitos como la denbinobina, la cual ha sido estudiada por su actividad antiinflamatoria y antitumoral (Song et al., 2012).

Uno de los géneros de orquídeas más populares es la *Cattleya* y su importancia ornamental radica en su diversidad de formas, colores, tamaño y fragancias, lo que explica su alta demanda en el comercio mundial de la floricultura (Pant et al., 2020). El conocimiento del comportamiento cromosómico ha sido fundamental para el mejoramiento genético como en cactus, trigo, cebada, plantas ornamentales con flores, incluidas las orquídeas (Ali et al., 2024; Gutiérrez-Flores et al., 2018; Jauhar, 2006), ya que el éxito en la hibridación depende en gran medida de la compatibilidad cromosómica entre las especies. Las diferencias en el número o la estructura de los cromosomas, así como en los niveles de ploidía (2x, 3x, 4x, etc.), pueden afectar este proceso complejo de compatibilidad. En este sentido, muchas orquídeas presentan poliploidía, condición que influye en su desarrollo, tamaño y fertilidad (Félix & Guerra, 2000; 2005) y puede dificultar la formación de embriones viables o generar descendencia estéril (Kiihl et al., 2011). En este contexto, los estudios citogenéticos resultan esenciales ya que proporcionan información clave para diseñar estrategias de reproducción (Lin et al., 2001) y cruzamientos controlados. Asimismo, conocer el número cromosómico de las especies involucradas facilita la realización de cruzamientos más efectivos, la evaluación de la necesidad de técnicas como la duplicación cromosómica y la selección de combinaciones capaces de producir híbridos fértiles (Germanà, 2012).

Sin embargo, los estudios citogenéticos en orquídeas aún son limitados, ya que solo se han realizado en aproximadamente el 10 % de las especies conocidas, debido a la

complejidad de su tamaño genómico que va de $1C = 0,33$ pg hasta 55,4 pg (Leitch *et al.*, 2009) y a la gran variabilidad cromosómica (Sharma & Mukai, 2015). Ampliar estos estudios, en conjunto con otras herramientas genómicas, es crucial para comprender la composición genética del grupo y desarrollar programas de mejoramiento más eficientes (Jauhar, 2006). Las especies *Cattleya lueddemanniana*, *Dendrobium* 'Aridang Green', *Dendrobium* 'Burana Jade Yellow', fueron seleccionadas debido a la variación cromosómica previamente reportada en los géneros *Dendrobium* y *Cattleya*, así como la ausencia de estudios citogenéticos en ejemplares cultivados en el vivero experimental del Centro de investigación científica de Yucatán. En este contexto, la caracterización citogenética de dichas especies resulta relevante para generar información básica que contribuya al conocimiento de su organización cromosómica. Por lo anterior el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar y optimizar un protocolo eficiente para la obtención y tinción de células en metafase en estas especies de orquídeas, estableciendo una metodología reproducible que facilite futuros análisis citogenéticos, así como programas de reproducción y mejoramiento genético.

Material y Métodos

Se evaluaron tres especies; *Cattleya lueddemanniana*, *Dendrobium* 'Aridang Green', *Dendrobium* 'Burana Jade Yellow', en el orquideario experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Las condiciones de cultivo se mantuvieron en casa sombra, a temperatura ambiente. El sustrato consistió en una mezcla de tezontle rojo, tezontle negro, carbón, corteza de pino y piedra pómez, contenida en maceta. La colecta se realizó en estado de desarrollo adulto, tomando 20 raíces por planta con tres réplicas biológicas. Asimismo, la colecta se efectuó en horarios específicos para cada especie, previamente establecidos dentro del intervalo de 7:00 a 11:00 horas. *Cattleya lueddemanniana* a las 08:00 h, *Dendrobium* 'Aridang Green' a las 08:30 h y *Dendrobium* 'Burana Jade Yellow' a las 10:00 h. Las puntas de raíz de 1.5–2 cm de longitud, se lavaron por inmersión en agua destilada para eliminar restos de sustrato y posteriormente se incubaron en una solución saturada de paradichlorobenceno (PDB, 40 mg/L; Sigma-Aldrich) durante 3 h. Tras el tratamiento, las muestras se enjuagaron en agua destilada durante 5 min, se fijaron en etanol al 70 % durante 24 h a temperatura ambiente y se almacenaron en refrigeración hasta su procesamiento.

Para la digestión de la pared celular, previamente se realizó una incisión longitudinal en la raíz con bisturí para facilitar la penetración del reactivo. Las raíces se incubaron en HCl 2 N (J.T. Baker®) durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente a 60 °C por un tiempo dependiendo de la especie: 50 min en *Cattleya lueddemanniana*, 45 min en *Dendrobium* 'Aridang Green' y 60 min en *Dendrobium* 'Burana Jade Yellow', después de la hidrólisis ácida, las muestras se transfirieron a buffer de citratos 1x (preparado a partir de una solución stock 10x compuesta por ácido cítrico 100 mM (Sigma-Aldrich) y citrato trisódico 60 mM (J.T.Baker®), pH 4.8) durante 30 min.

Para la obtención de cromosomas en metafase, los portaobjetos se limpiaron con etanol y paños libres de polvo. La región meristemática de la punta de raíz se disecciona con pinzas y el tejido interno se separó finamente para generar una suspensión celular, la cual se distribuyó sobre dos portaobjetos. Se añadieron 100 µL de azul de toluidina (Sigma-Aldrich) preparado en buffer de acetato de sodio 0.2 M (pH 4.6) y se incubó durante 30 min; en caso de evaporación del colorante, se agregaron 10–20 µL adicionales. Posteriormente,

se colocó el cubreobjetos evitando la formación de burbujas y se aplicó presión uniforme sobre una superficie plana para realizar la técnica de squash y dispersar adecuadamente el material celular.

Las preparaciones se observaron en un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse E100) utilizando objetivos de 40x y 100x; para este último se empleó aceite de inmersión con el fin de mejorar la resolución. Cada tratamiento se repitió al menos cinco veces y se analizaron un mínimo de diez células en metafase por especie. Las imágenes fueron procesadas por medio de adobe photoshop 2026, el conteo cromosómico se realizó utilizando imágenes digitales analizadas con ImageJ/Fiji.

Resultados y Discusión

Los estudios citogenéticos en orquídeas ofrecen notables ventajas para la mejora genética y la conservación de esta familia tan diversa. La determinación del número cromosómico y el análisis de los cariotipos permiten identificar con precisión los niveles de ploidía, la presencia de reordenamientos cromosómicos y la estabilidad meiótica de híbridos o especies silvestres. Por ejemplo, en *Phalaenopsis* se demostró que cultivar híbridos triploides con juegos cromosómicos asimétricos conduce a esterilidad parcial o total, lo que impacta directamente en la viabilidad de los programas de hibridación (Sevilleno *et al.*, 2023a). Esta información citogenética permite a los mejoradores seleccionar progenitores con mayor probabilidad de producir gametos funcionales, reducir pérdidas por cruces fallidos y optimizar estrategias de hibridación, particularmente en familias con alta incidencia de poliploidía como la Orchidaceae (Lee *et al.*, 2020; Sevilleno *et al.*, 2023b).

La preparación de muestras en portaobjetos con cromosomas es necesario para estudios de cariotipo, hibridación genómica *in situ*, hibridación fluorescente *in situ*, ya que permite visualizar la forma, tamaño, número, estructura de cromosomas y con técnicas de hibridación permite localizar regiones de interés en cromosomas específicos o en todos los cromosomas (Younis *et al.*, 2015).

Los horarios de colecta en este estudio variaron según la especie, entre 08:30 am a 10:00 am, destacando que el clima de la zona de muestreo es cálido-húmedo.

En el género *Cattleya* se han reportado cariotipos que varían entre $2n = 2x = 40$ a $2n = 2x = 86$ (da Silva *et al.*, 2017; Felix & Guerra, 2010), los resultados obtenidos en este estudio corresponde a $2n = 2x = 92$ cromosomas (Figura 1E). Para *Dendrobium* 'Aridang Green' se han reportado cariotipos que van de $2n = 2x = 30$ hasta $2n = 2x = 114$ cromosomas (Wilfret & Kamemoto, 1971), los resultados en este estudio corresponde con 180 cromosomas (Fig.1F), finalmente para *Dendrobium* 'Burana Jade Yellow' se han reportado números de $2n = 2x = 35, 36, 38$ y $3x = 57$ (Lee *et al.*, 2017), en este estudio se contabilizaron 240 cromosomas (Fig. 1D). En general, las orquídeas presentan una amplia variación en número, poliploidía y estructura cromosómica, que abarca desde $2n = 2x = 12$ hasta $2n = 2x = 240$ (Felix & Guerra, 2010; Moraes *et al.*, 2017). Por ello, en futuros trabajos sería recomendable emplear técnicas como FISH (hibridación fluorescente *in situ*) para confirmar el nivel de ploidía en estas especies.

Asimismo, se ha documentado la presencia de cariotipos bimodales (cromosomas grandes y pequeños) en diversos linajes de Orchidaceae; por ejemplo, en *Phalaenopsis* y

en las subtribus bimodal, Spiranthinae ($2n = 2x = 26$) y Cranichidinae ($2n = 2x = 46$) (Martínez, 1985). Patrón posteriormente confirmado en géneros como *Pelexia*, *Sarcoglottis*, *Thelyschista* y *Sacoila* (Felix & Guerra, 2005). De manera consistente, las especies analizadas en este estudio también presentan un cariotipo bimodal.

En *Paphiopedilum* se ha documentado una considerable variación en el número de cromosomas, que oscila entre $2n = 2x = 26$ y $2n = 2x = 42$, fenómeno que no puede explicarse únicamente por duplicaciones genómicas completas. Esta variación se asocia principalmente a procesos de fusión y fisión cromosómica, así como a otros reordenamientos estructurales del cariotipo, los cuales han desempeñado un papel relevante en la evolución cromosómica del género (Lan & Albert, 2011). En este sentido, la diversidad cromosómica observada en orquídeas en general tampoco puede atribuirse exclusivamente a la poliploidía. Procesos de dispoloidía ascendente y descendente, vinculados a fisiones, fusiones y reorganizaciones estructurales, permiten modificaciones en el número cromosómico sin que ocurra duplicación completa del genoma, lo que explica la presencia de series numéricas que no corresponden estrictamente a múltiplos del número básico dentro de un mismo linaje (Schubert & Lysak, 2011). En conjunto, la evidencia disponible sugiere que la evolución cromosómica en Orchidaceae resulta de la interacción entre poliploidía, dispoloidía y reordenamientos estructurales, procesos que han contribuido significativamente a la diversificación del grupo y a su notable plasticidad cariotípica (Felix & Guerra, 2010; Moraes et al., 2017)

Aunque los estudios cromosómicos tradicionales aportan información crucial sobre la variabilidad genética intra e interespecífica, el análisis citogenético en orquídeas aún permanece limitado, debido a diversas dificultades asociadas en la preparación de las muestras para el conteo de cromosomas (Sharma & Mukai, 2015). Las raíces de las orquídeas están rodeadas por una capa protectora y esponjosa compuesta por varias capas epidérmicas del tejido de velamen (Sosilawaty, 2020) y que dificulta su degradación. En este estudio se estandarizó la hora de colecta para cada especie, además de optimizar el tiempo de incubación con el HCl, para lograr una hidrólisis ácida efectiva en las raíces. A partir de modificaciones de distintos protocolos, fue posible observar cromosomas en metafase en las tres especies analizadas, aunque la eficiencia dependió de la hora de colecta y del tiempo de hidrólisis con HCl.

La mayoría de las células de orquídeas presentan baja tasa de división celular y suelen estar en fases muy tempranas o tardías del proceso de la mitosis, lo que dificulta su observación cromosómica. El uso de paradichlorobenceno en *Lens esculenta* demostró que tiene un alto potencial como agente químico en la obtención de células en metafase, sin ser tóxico para la planta (Sarbhoy, 1980), hasta nuestro conocimiento este es el primer estudio donde se emplea el PDB, para obtención de células en metafase en la familia Orchidaceae.

La tinción es un paso crucial en estudios citológicos y citogenéticos, el empleo de azul de toluidina se ha usado mayormente para tinción en estudios de biología celular y tejidos en plantas (Vidal & Mello, 2019) sin embargo, este estudio constituye, hasta nuestro conocimiento el primer reporte del uso de esta tinción para células en metafase en la familia Orchidaceae.

Diversos métodos han sido utilizados previamente en estudios citogenéticos de orquídeas, evidenciando una amplia variabilidad en los procedimientos de detención del ciclo celular, digestión enzimática e identificación cromosómica. da Silva et al. (2017)

obtuvieron metafases en *Cattleya* mediante el uso de trifluralina como agente antimitótico, digestión enzimática con pepsina Sigma® y tinción con Giemsa al 5 %. [Lee et al. \(2017\)](#) emplearon digestión con celulasa y pectinasa, mientras que [Grabiele et al. \(2009\)](#) , [Hartati & Cahyono \(2024\)](#) utilizaron 8-hidroxiquinoleína, (0.02 M), hidrólisis ácida con HCl 1N, tinción con reactivo de Schiff y la técnica de squash con aceto orceína al 2 %. De manera similar, [De Oliveira et al. \(2014\)](#) utilizaron un método similar, pero sin aceto orceína, y con tinción en Giemsa al 2 %, siguiendo lo descrito por [Guerra \(1983\)](#). Recientemente, [Turco et al. \(2024\)](#) trataron las raíces con colchicina 0.3 %, seguida de hidrólisis con HCl 5.5 N y tinción Feulgen.

En conjunto, los enfoques tradicionales presentan diferencias importantes en la eficacia de la detención mitótica, la integridad cromosómica y la calidad de la tinción. Estas variaciones pueden dificultar la obtención consistente de metafases bien definidas entre distintas especies y condiciones de cultivo. Además, varios protocolos implican combinaciones complejas de pretratamientos antimitóticos, digestiones enzimáticas prolongadas o el uso de colorantes diferenciales altamente sensibles a las condiciones experimentales, lo que incrementa la variabilidad técnica y reduce su reproducibilidad.

En este contexto, el protocolo propuesto en el presente estudio adquiere relevancia, ya que optimiza de manera integrada las etapas críticas del proceso y permite obtener de forma reproducible células en metafase con adecuada dispersión y contraste cromosómico en las especies evaluadas. Esta mejora metodológica no solo facilita la caracterización citogenética, sino que también proporciona una base técnica confiable para futuros estudios relacionados con la sistemática, la evolución, los programas de reproducción y mejoramiento genético en orquídeas.

Adicionalmente, este trabajo constituye el primer reporte del uso de PDB como agente para la detención del ciclo celular en combinación con hidrólisis ácida para el tratamiento de raíces y tinción con azul de toluidina para la visualización cromosómica en orquídeas. La integración de estos métodos representa una aproximación metodológica que amplía las alternativas disponibles para la obtención de metafases de alta calidad en este grupo vegetal y aporta una herramienta potencialmente útil para investigaciones citogenéticas posteriores.

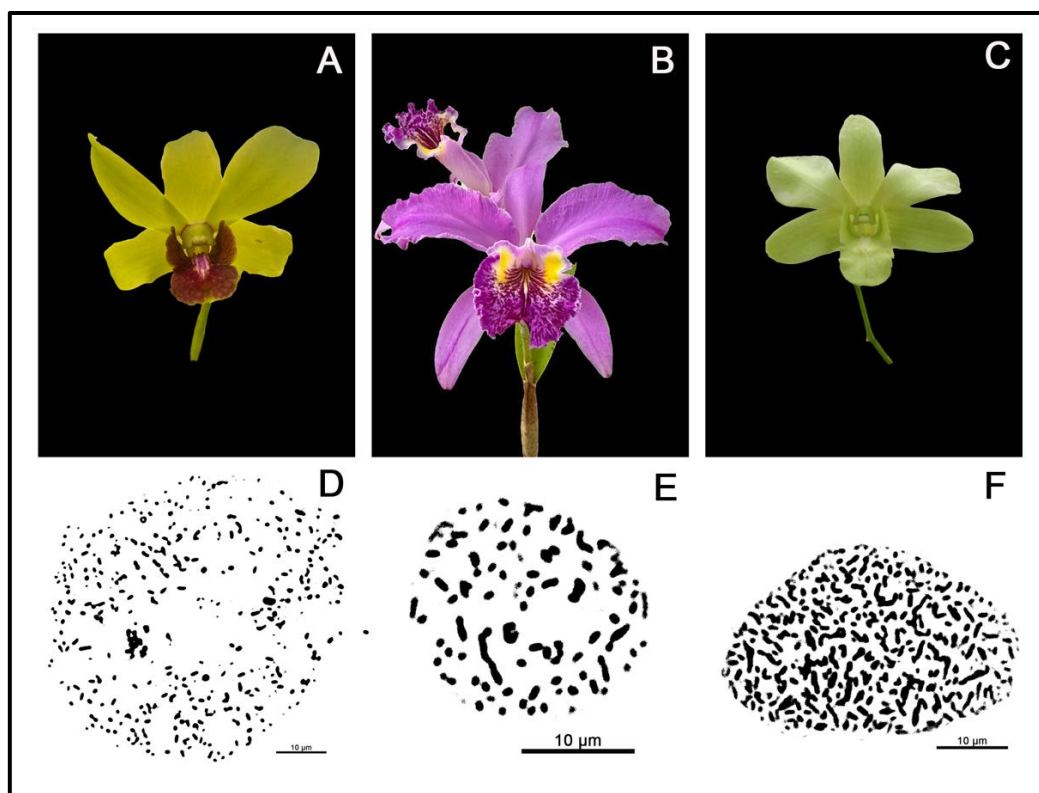


Figura 1. Representación comparativa de flores de orquídeas y sus cromosomas metafásicos. A) flores de *Dendrobium* 'Burana Jade Tong', B) flores de *Cattleya lueddemanniana*, C) flores de *Dendrobium* 'Aridang Green', D) cromosomas en metafase de *Dendrobium* 'Burana Jade Yellow', E) cromosomas en metafase de *Cattleya lueddemanniana* y F) cromosomas en metafase de *Dendrobium* 'Aridang Green'. La barra de escala corresponde a 10 µm. Elaboración propia por medio de photoshop 2025

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, MFMT, LFST y MJGC; desarrollo de la metodología, MFMT, EBR, MJGC; manejo de software, EBR, FEE, RHCB; validación experimental, FEE, RHCB, LFST, MJGC análisis de resultados, MFMT, EBR FEE, RHCB; Manejo de datos, MFMT, EBR, RHCB; escritura y preparación del manuscrito, MFMT, LFST, MJGC; redacción, revisión y edición, MFMT, EBR, FEE, LFST, MJGC; administrador de proyectos, LFST, MJGC.

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

Financiamiento

"Esta investigación no recibió financiamiento externo"

Agradecimientos

Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e innovación (SECIHTI) por la beca posdoctoral otorgada a MJGC y EBR, al maestro Felipe Barredo Pool por el apoyo técnico.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Ali, M., Polgári, D., Seps, A., Kontra, L., Dalmadi, Á., Havelda, Z., Sági, L., & Kis, A. (2024). Rapid and cost-effective molecular karyotyping in wheat, barley, and their cross-progeny by chromosome-specific multiplex PCR. *Plant Methods*, 20, 37. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01162-x>
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., van den Berg, C., & Schuitman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Phytotaxa*, 247(2), 93–137. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.247.2.1>
- da Silva, G. M., Varella, T. L., Karsburg, I. V., Santana, T. N., de Carvalho, I. F., da Silva Añez, R. B., & da Silva, M. L. (2017). Cytogenetic characterization of species and hybrids of orchids of *Cattleya* genus. *Cytologia*, 82(2), 137–140. <https://doi.org/10.1508/cytologia.82.137>
- De Oliveira, V. M., De Barros, F., & Forni-Martins, E. R. (2014). Chromosome numbers and karyotypes of *Catasetus* species (Orchidaceae). *Plant Biosystems*, 148(3), 499–507. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.788093>
- Felix, L. P., & Guerra, M. (2000). Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of cymbidioid orchids. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 957–978. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400041>
- Felix, L. P., & Guerra, M. (2005). Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. *Plant Systematics and Evolution*, 254(3), 131–148. <https://doi.org/10.1007/s00606-004-0200-9>
- Felix, L. P., & Guerra, M. (2010). Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163(2), 234–278. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01059.x>
- Germanà, M. A. (2012). Use of irradiated pollen to induce parthenogenesis and haploid production in fruit crops. In Q. Y. Shu, B. P. Forster, & H. Nakagawa (Eds.), *Plant mutation breeding and biotechnology* (pp. 411–421). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780640853.0411>
- Grabiele, M., Honfi, A. I., Debat, H. J., & Daviña, J. R. (2009). Caracterización morfológica y cromosómica de *Commelina benghalensis* L. (Commelinaceae) de Argentina. *Gayana Botánica*, 66(1), 18–27. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432009000100003>
- Guerra, M. (1983). O uso do Giemsa na citogenética vegetal: Comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura*, 35, 190–193. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571980074172680576>
- Gutiérrez-Flores, C., León-de la Luz, J. L., García-De León, F. J., & Cota-Sánchez, J. H. (2018). Variation in chromosome number and breeding systems: Implications for diversification in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Comparative Cytogenetics*, 12(1), 61–75. <https://doi.org/10.3897/CompCytoGen.v12i1.21554>
- Hartati, S., Samanhudi, & Cahyono, O. (2024). Chromosome and karyotype analysis of *Dendrobium* spp. *International Journal of Agricultural Technology*, 20(5), 1917–1930. <https://li04.tci-thaijo.org/index.php/IJAT/article/view/56781>

- Jauhar, P. P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges. *Crop Science*, 46(5), 1841–1859. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.07-0223>
- Kiihl, P. R. P., Pereira, A. R. A., Godoy, S. M. D., Stenzel, N. M. C., & Risso-Pascotto, C. (2011). Chromosome stickiness during meiotic behavior analysis of *Passiflora serrato-digitata* L. (Passifloraceae). *Ciência Rural*, 41, 1018–1023. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000076>
- Lan, T., & Albert, V. A. (2011). Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in *Paphiopedilum*, a lady's slipper orchid. *BMC Plant Biology*, 11, 126. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-126>
- Lee, Y. I., Chung, M. C., Sydara, K., Souliya, O., & Aphay, S. L. (2017). Taxonomic placement of *Paphiopedilum rungsuriyanum* based on morphological, cytological and molecular analyses. *Botanical Studies*, 58(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0170-1>
- Leitch, I. J., Kahandawala, I., Suda, J., Hanson, L., Ingrouille, M. J., Chase, M. W., & Fay, M. F. (2009). Genome size diversity in orchids: Consequences and evolution. *Annals of Botany*, 104(3), 469–481. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp003>
- Lin, S., Lee, H. C., Chen, W. H., Chen, C. C., Kao, Y. Y., Fu, Y. M., Chen, Y. H., & Lin, T. Y. (2001). Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 195–199. <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.2.195>
- Martínez, A. (1985). The chromosomes of orchids VIII. Spiranthinae and Cranichidinae. *Kew Bulletin*, 40(1), 139–147. <https://doi.org/10.2307/4108491>
- Moraes, A. P., Koehler, S., Cabral, J. S., Gomes, S. S. L., Viccini, L. F., Barros, F., Felix, L. P., Guerra, M., & Martins, E. R. F. (2017). Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. *Plant Biology*, 19, 298–308. <https://doi.org/10.1111/plb.12527>
- Pant, M., Negi, A., Singh, A., Gautam, A., & Rawat, M. (2020). Cattleya orchids: A mini review. *Journal of Critical Reviews*, 7(12), 4592–4598. <https://doi.org/10.31838/jcr.07.12.651>
- Rojas, L. S., Ramírez-Valverde, B., Díaz-Bautista, M., Pizano-Calderón, J., & Rodríguez-López, C. (2020). La producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) en México: Análisis y pronóstico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(1), 175–187. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i1.2065>
- Sánchez-Duffhues, G., Calzado, M. A., de Vinuesa, A. G., Appendino, G., Fiebich, B. L., Loock, U., Lefarth-Risse, A., Krohn, K., & Muñoz, E. (2009). Denbinobin inhibits nuclear factor-κB and induces apoptosis via reactive oxygen species generation in human leukemic cells. *Biochemical Pharmacology*, 77(8), 1401–1409. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.01.004>
- Sarbhoy, R. K. (1980). Effect of paradichlorobenzene on the somatic chromosomes and mitosis of *Lens esculenta* (L.) Moench. *Cytologia*, 45(3), 381–388. <https://doi.org/10.1508/cytologia.45.381>
- Schubert, I., & Lysak, M. A. (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.004>
- Sevilleno, S. S., An, H. R., Cabahug-Braza, R. A. M., Ahn, Y. J., & Hwang, Y. J. (2023a). Cytogenetic study and pollen viability of *Phalaenopsis* Queen Beer 'Mantefon'. *Plants*, 12(15), 2828. <https://doi.org/10.3390/plants12152828>
- Sevilleno, S. S., Cabahug-Braza, R. A., An, H. R., Lim, K. B., & Hwang, Y. J. (2023b). The role of cytogenetic tools in orchid breeding. *Korean Journal of Agricultural Science*, 50, 193–206. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20230015>
- Sharma, S. K., & Mukai, Y. (2015). Chromosome research in orchids: Current status and future prospects with special emphasis from molecular and epigenetic perspective. *Nucleus*, 58, 173–184. <https://doi.org/10.1007/s13237-015-0152-1>

- Song, J. I., Kang, Y. J., Yong, H., Kim, Y. C., & Moon, A. (2012). Denbinobin, a phenanthrene from *Dendrobium nobile*, inhibits invasion and induces apoptosis in SNU-484 human gastric cancer cells. *Oncology Reports*, 27(3), 813–818. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1551>
- Sosa, V., & De-Nova, J. (2012). Linajes de angiospermas endémicas en México: Zonas de alto endemismo para la conservación. *Acta Botánica Mexicana*, 100, 293–315. <https://doi.org/10.21829/abm100.2012.383>
- Sosilawaty, M. (2020). Identifying the diversity of orchids in the Sebangau National Park in Central Kalimantan. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology*, 11(3), 185–191. <https://ssrn.com/abstract=3565197>
- Turco, A., Wagensommer, R. P., Medagli, P., Albano, A., & D'Emerico, S. (2024). Advances in the study of Orchidinae subtribe species with 40–42 chromosomes in the Mediterranean region. *Diversity*, 16(1), 41. <https://doi.org/10.3390/d16010041>
- Vidal, B. C., & Mello, M. L. S. (2019). Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications. *Acta Histochemica*, 121(2), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.11.005>
- Wilfret, G. J., & Kamemoto, H. (1971). Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae). II. Karyotype relationships. *Cytologia*, 36(4), 604–613. <https://doi.org/10.1508/cytologia.36.604>
- Younis, A., Ramzan, F., Hwang, Y. J., & Lim, K. B. (2015). FISH and GISH: Molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant Cell Reports*, 34(9), 1477–1488. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1828-3>