



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Cultivo *in vitro* de *Laelia gouldiana* Rchb. f.
(Orchidaceae), especie endémica de México,
extinta en la naturaleza.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

HORACIO ALÁN GÓMEZ MARTÍNEZ

TUTOR:

DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

2009



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, DEL JARDÍN BOTÁNICO,
INSTITUTO DE BIOLOGÍA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL
DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios


ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente


Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:


Cultivo in vitro de Laelia gouldiana Rchb.f. (Orchidaceae), especie endémica de México, extinta en la naturaleza

realizado por Gómez Martínez Horacio Alán con número de cuenta 3-0222284-1 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Guillermo Laguna Hernández 

Propietario M. en C. María de los Ángeles Aída Téllez Velasco 

Propietario Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila 
Tutor

Suplente M. en C. Guitele Dalía Goldhaber Pasillas 

Suplente Biól. Laura Patricia Olgún Santos 

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 03 de septiembre de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*nlm.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por sus bendiciones y por estar siempre conmigo en el camino de la vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Ciencias y el Jardín Botánico por ser mi segunda casa y base de mi formación profesional.

A mis padres Ma. Magdalena y Horacio, por darme la vida, por ser mi orgullo, por que siempre me han apoyado y brindado su amor, sabiduría, tiempo en todo momento. Por tener ese gran corazón para dar todo sin recibir nada a cambio, muchas gracias, los quiero mucho.

A mi hermana Hirai, por ser mi orgullo, por su cariño, por el tiempo que hemos compartido, por las risas, las discusiones y sobre todo por mostrarme mis errores, gracias, esta vida sería bastante aburrida sin ti.

A mi tutor el Dr. Víctor M. Chávez Ávila, por brindarme toda su colaboración, su apoyo dirigiendo y enriqueciendo de manera significativa esta tesis, por su confianza y amistad, muchas gracias.

*Un agradecimiento especial al Dr. Ernesto Aguirre, por haber donado las plantas para la elaboración del presente estudio y por sus consejos e información muy valiosa con respecto de *Laelia gouldiana*.*

A Bárbara, por sus aportaciones al laboratorio, la convivencia, confianza y por que me apoyo y siempre está dispuesta a ayudar a los demás, muchas gracias.

A Dalía, por sus aportes en la realización y revisión de esta tesis, además de ser una buena amiga, gracias.

A todos los Profesores que me han formado como estudiante a lo largo de mi vida y por darme las herramientas para seguir superándome, muchas gracias.

Sin lugar a dudas a mis excelentes amigos Anet, Arturo, Felipe y Avelino, por compartir muchas experiencias juntos y sobre todo por su amistad.

Un agradecimiento muy especial a una persona muy valiosa en mi vida, que compartió muchos momentos muy felices conmigo, por haber estado en las buenas y en las malas, Karla en verdad muchas gracias.

A Ariana muchas gracias, por toda su ayuda que me brindó y por presionarme a titularme.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales que estuvieron conmigo a lo largo de mi estancia en el mismo y de quienes aprendí mucho: Vicente, Joaquín, Miguel (Kikináceos), Jesús, Fernando, Nancy, Octavio, Wendy, Paulina, German, Maricela, Guadalupe, Sandra, Claudia, Mabel, Luis, Rosa, Mónica, Nery, Chicas de Prepa. 3, Laura Tlaxcala, Laura, Felipe, a todos y cada uno de ustedes gracias.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINAS
Figuras	I
Tablas	V
Abreviaturas	VII
Resumen	VIII
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Biodiversidad	3
Biodiversidad en México	3
Destrucción de la Biodiversidad	4
Estrategias para la conservación de la biodiversidad	4
Conservación <i>in situ</i>	5
Ejemplo de conservación <i>in situ</i> : RBBM	6
Problemática ecológica de la RBBM	7
Estrategias para evitar la pérdida de biodiversidad en la RBBM	7
Conservación <i>ex situ</i>	8
2.2 Generalidades de la familia Orchidaceae	9
Formas de vida	9
Características biológicas y morfológicas de las orquídeas	10
Morfología de la raíz	11
Morfología de las hojas	11
Morfología del tallo	12
Características ecológicas de las orquídeas	12
Diversidad y distribución de las orquídeas en México	13
Género <i>Laelia</i>	14
Usos tradicionales de <i>Laelia</i> y otros géneros	14
Descripción Botánica de <i>Laelia gouldiana</i> (Soto, 2002)	15
Clasificación taxonómica de <i>Laelia gouldiana</i>	18

Distribución geográfica de <i>Laelia gouldiana</i>	18
Destrucción y consecuencias por la pérdida de la biodiversidad de las orquídeas	19
Conservación de las orquídeas en México	20
Conservación del género <i>Laelia</i> en México	21
Conservación de <i>Laelia gouldiana</i>	22
2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	23
Regeneración vía organogénesis	25
Regeneración vía embriogénesis somática	26
Factores que intervienen en el cultivo <i>in vitro</i>	29
Tipo de explante	29
Reguladores de crecimiento vegetal	33
Auxinas	33
Citocininas	34
Interacción Auxinas/Citocininas	35
Etileno	36
Complejos naturales	38
Atmósfera <i>in vitro</i> y el tipo de recipiente empleado	40
Aclimatización de plantas propagadas <i>in vitro</i> a condiciones <i>ex vitro</i>	41
Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas	43
3. Justificación	47
4. Objetivos	48
Objetivo general	48
Objetivos particulares	48
5. Materiales y métodos	49
Material biológico	50
Fase de inducción (75 días)	50
Ápices de raíz	51
Segmentos de hoja	52
Segmentos de tallo	52
Fase de crecimiento y desarrollo (105 días)	53
Agua de coco	54

Aclimatización	55
6. Resultados y Discusión	56
Cultivo de ápice de raíz	56
Cultivo de segmentos de hoja	64
Cultivo de segmentos de tallo	78
Cultivo de hoja con agua de coco	97
Cultivo de tallo con agua de coco	102
Contaminación	107
Influencia del recipiente en el cultivo <i>in vitro</i>	108
Aclimatización	110
Duración total del cultivo <i>in vitro</i> y de la producción de plántulas de <i>Laelia gouldiana</i>	115
7. Conclusiones	117
Cultivos de raíz	117
Cultivos de hoja	117
Cultivos de tallo	117
Cultivos de hoja con agua de coco	118
Cultivos de tallo con agua de coco	118
Aclimatización	118
8. Apéndices	120
9. Literatura citada	122

Figuras		Páginas
Figura 1	Lámina de <i>Laelia gouldiana</i>	17
Figura 2	a) Planta madura de <i>Laelia gouldiana</i> , b) inflorescencia de <i>L. gouldiana</i> .	19
Figura 3	Distribución de <i>L. gouldiana</i> , especie endémica de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo.	19
Figura 4	Metodología general para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>L. gouldiana</i> a partir de segmentos de ápice de raíz, segmentos de tallo y hoja.	49
Figura 5	Determinación de la porción que se seccionó de tallo, en donde se observan yemas laterales.	53
Figura 6	a) Estado de coloración de los ápices de raíz al momento de la siembra, y b) estado de oxidación a los 45 días de inducción, en caja Petri.	60
Figura 7	Estado de coloración de los ápices de raíz a) al momento de la siembra; b) a los 10 días de inducción; c) a los 30 días de inducción, iniciando la elongación, y d) explantes oxidados a los 75 días de inducción en frascos Gerber®.	60
Figura 8	Elongación del ápice de raíz a los 75 días de inducción. a) Explante con crecimiento vertical, sembrado en medio MS 50% adicionado con 0.5/0.5, alcanzó 5 cm, y b) explante elongado con una coloración verde.	61
Figura 9	Cultivos de ápice de raíz. a) Explantes oxidados y sin oxidar después de 105 días de cultivo y b) explantes elongados con una longitud máxima de 11.5 cm en el tratamiento libre de reguladores, después de 180 días de cultivo.	61
Figura 10	Segmentos de hoja cultivados en medio MS 50 %, a) al momento del cultivo; b) inicio en la formación de brotes a los 45 días de cultivo e indicios de oxidación; c) formación de plántulas a partir de vestigios de tallo. Explante oxidado, y d) formación de plántulas después de 75 días de inducción.	65
Figura 11	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hojas de <i>L. gouldiana</i> en medio MS, sembradas en cajas Petri.	65
Figura 12	Cultivos de hojas en medio basal MS 50 %. a) Brotes formados a partir de explantes oxidados y nuevos brotes formados a partir de yemas laterales de brotes previamente formados, después de 105 días de cultivo. b) Incremento en talla y en el número de plántulas después de 180 días de cultivo	69
Figura 13	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hojas en medio MS, sembradas en cajas Petri, durante 105 días de multiplicación.	69
Figura 14	a) Formación de brote en parte central a 30 días (0.5/1); b) formación de brotes a	72

	75 días de cultivo; c) explante y brote oxidado (0.1/1) a 75 días de cultivo; d) desarrollo de plántula de 3 cm a 75 días de cultivo; e) PLB's (0.5/1) a 60 días de cultivo, y f) brotes provenientes de PLB's, a 75 días.	
Figura 15	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hojas en medio MS, sembradas en frascos Gerber®, durante 75 días de cultivo en inducción.	72
Figura 16	Cultivos de hoja en frascos Gerber®. a) Explantes con oxidación a 105 días; b) regeneración de brote en explantes con pocos pigmentos verdes (0.5 ANA) a 105 días; c) regeneración de 4 brotes (0.1/0.5) a 105 días, y d) plántula de 7 cm de longitud después de 180 días de cultivo.	74
Figura 17	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hojas en medio MS, sembradas en frascos Gerber®, durante 180 días de cultivo.	74
Figura 18	Segmentos de tallo cultivados en caja Petri, a) después de 10 días de cultivo, mostrando inicios de oxidación; b) formación de brotes a 45 días de cultivo en explante vitrificado; c) oxidación de brotes y explante a 45 días de cultivo; d) formación de masa de PLB's en tratamiento 0.5 BA, y f) formación de masa de PLB's en tratamiento 0.1 ANA.	79
Figura 19	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS, sembrados en cajas Petri. Resultados a los 75 días de iniciados los cultivos.	79
Figura 20	Cultivos de tallo después de 180 días de cultivo. a) Plántulas de 14 cm de longitud; b) formación de brotes a partir de brote oxidado; c) plántulas provenientes de PLB's (0.1 ANA); d) brotes provenientes de PLB's (0.5 BA).	82
Figura 21	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS, sembrados en cajas Petri. Resultados a 180 días de iniciados los cultivos.	82
Figura 22	Formación de brotes a los 10 días de cultivo en medio de inducción. a) Yema lateral; b) yemas laterales y brote en la base; c) desarrollo de brotes surgiendo de la base del tallo; d) brotación múltiple, y e) Formación de brotes surgiendo de base y nudos.	88
Figura 23	Cultivos después de 30 días. a) Explantes y yemas oxidadas; b) explante vitrificado con brote en base; c) Explante vitrificado y emergencia de hojas a partir de parte superior; d) Formación de PLB's (0.5 ANA); e) brote de 1.3 cm de longitud, y f) desarrollo de plántulas.	88
Figura 24	Cultivo de tallo después de 75 días de cultivo. a) Explantes, yemas y brote oxidados; b) incremento de talla y número de PLB's del tratamiento 0.5 ANA; c) formación de PLB's en tratamiento adicionado con 0.1 ANA surgiendo entre	89

	explante base de plántula, y d) formación de grupo de PLB's a partir de base de plántulas.	
Figura 25	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS, sembrados en frascos Gerber®, durante 75 días de iniciados los cultivos.	89
Figura 26	Cultivos de tallo después de 105 días. a) PLB's formados en explante oxidado (0.5 BA); b) PLB's alrededor de yema lateral (1 BA); c) PLB's generados a partir de brote (0.1/1); d) PLB's surgiendo en parte superior de explante (0.5/1); e) PLB's y brotes surgiendo en base de plántula (0.5 ANA); f) explante hiperhidratado con 4 brotes en la parte superior (libre de reguladores); g) brotes formados a partir de PLB's (0.1 y 0.5 ANA), y h) plántulas formadas a partir de PLB's (0.1 y 0.5 ANA).	92
Figura 27	a) Después de 135 días de cultivo comenzaron a alongarse los primordios de hoja de los PLB's; b) se formaron 5 nuevos PLB's (1 BA), y c) después de 180 días de cultivo se incrementó el número de plántulas con un \bar{X} de longitud de 5.1 cm.	93
Figura 28	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS, sembrados en frascos Gerber®, durante 105 días de iniciados los cultivos.	93
Figura 29	a) Brote hiperhidratado (0.1/10% ANA/coco, 30 días de cultivo); b) plántula de 1.5 cm (0.1/10% ANA/coco, 60 días de cultivo), c) brote con masa de PLB's (0.1/10% ANA/coco, 75 días de cultivo); d) masa de PLB's en tratamiento control y e) formación de brotes (10 % coco).	98
Figura 30	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hoja en medio MS con agua de coco, durante 75 días de iniciados los cultivos.	98
Figura 31	Cultivo de hoja después de 105 días. a) Grupo de PLB's con incremento de volumen (tratamiento control); b) PLB's diferenciándose en brotes (0.1/10 % ANA/coco). c) Grupo de PLB's brotando después de 135 días de cultivo; d) formación de plántulas provenientes de PLB's (0.1/10 % ANA/coco), y e) brotes y plántulas después de 180 días de cultivo.	100
Figura 32	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hoja en medio MS con agua de coco, durante 180 días de iniciados los cultivos.	100
Figura 33	a) Explante al momento de la siembra; b) formación de brotes después de 10 días; c) explante vitrificado; d) Diferenciación de plántulas después de 30 días de cultivo; e) formación de masa de PLB's (0.1 ANA y 10 % de coco), y f) brote de 2.2 cm de longitud (\bar{X} de longitud en todos los tratamientos).	103

Figura 34	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS con agua de coco, durante 75 días de iniciados los cultivos.	103
Figura 35	Después de 105 días de cultivo, a) brotes y plántulas a partir de PLB's; b) PLB's (0.1 ANA); c) masa de PLB's (T. control); d) grupo de PLB's después de 135 días (T. control); e) desarrollo de plántulas a partir de PLB's (T. control, después de 180 días), y f) plántulas con longitud \bar{X} de 6.7 cm.	105
Figura 36	\bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS basal con agua de coco, durante 180 días de iniciados los cultivos.	105
Figura 37	Contaminación fúngica: a) colonias blanco-grisáceas; b) verde-azules. Contaminación bacteriana: color naranja, y d) rosa.	108
Figura 38	Porcentaje de sobrevivencia adicionando los brotes nuevos en las tres combinaciones de sustratos a lo largo de 150 días de aclimatización.	113
Figura 39	a) Plántula <i>ex vitro</i> . Mezclas de sustratos al inicio de la aclimatización, b) peat moss/agrolita; c) fibra de coco/peat moss/agrolita; d) fibra de coco/agrolita; e) formación de brotes a partir de yemas laterales, después de 30 días de aclimatización, y f) plántula con raíces contaminadas por hongos.	114
Figura 40	Cronograma del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Laelia gouldiana</i> .	116

Tablas		Páginas
Tabla 1	Especies endémicas de la R.B.B.M. y amenazadas de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001.	6
Tabla 2	Especies y condiciones de cultivo <i>in vitro</i> para inducir organogénesis.	26
Tabla 3	Especies y condiciones de cultivo <i>in vitro</i> para inducir embriogénesis.	28
Tabla 4	Explantos empleados en cultivo <i>in vitro</i> de diferentes especies vegetales.	30
Tabla 5	Complejos naturales más utilizados para el cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas..	39
Tabla 6	Medios de cultivo y tipos de explantes usados en la micropropagación de orquídeas.	45
Tabla 7	Tratamientos utilizados para inducir respuestas morfogénicas, a partir de explantes de ápice de raíz, segmentos de tallo y hoja de plántulas de <i>Laelia gouldiana</i> , cultivadas en medio MS 50 %, en dos envases de cultivo diferentes, durante 75 días.	51
Tabla 8	Combinaciones de endospermo líquido de coco y regulador del crecimiento, para evaluar la respuesta morfogénica, a partir de explantes de segmentos de tallo y hoja de <i>Laelia gouldiana</i> , cultivadas en medio MS 50 %, en dos envases de cultivo diferentes, durante 75 días.	54
Tabla 9	Número de regenerantes del período de inducción (75 días) y al final del período de multiplicación (180 días), para los cultivos en frascos Gerber® y cajas Petri.	56
Tabla 10	Total y porcentaje de explantes de ápice de raíz oxidados en cada tratamiento al final del período de inducción (75 días), en frascos Gerber® y cajas Petri.	59
Tabla 11	Elongación de ápices de raíz en frascos Gerber®, después de 75 días de cultivo.	61
Tabla 12	Elongación de ápices de raíz en frascos Gerber®, después de 180 días de cultivo.	62
Tabla 13	Brotos generados a partir de segmentos de hoja de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en cajas Petri. Resultados a los 75 días de cultivo.	66
Tabla 14	Brotos generados a partir de segmentos de hoja de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en cajas Petri. Resultados a los 180 días de cultivo.	69
Tabla 15	Brotos generados a partir de segmentos de hoja de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en frascos Gerber®. Resultados a los 75 días de cultivo.	73
Tabla 16	Brotos generados a partir de segmentos de hoja de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en frascos Gerber®. Resultados a los 180 días de cultivo.	75
Tabla 17	Brotos generados a partir de segmentos de tallo de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS	80

	en cajas Petri. Resultados a los 75 días de cultivo.	
Tabla 18	Total de explantes oxidados en cada tratamiento al final del período de inducción (75 días), para los cultivos en frascos Gerber® y cajas Petri.	80
Tabla 19	Brotes generados a partir de segmentos de tallo de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en cajas Petri. Resultados a los 180 días de cultivo.	83
Tabla 20	Brotes generados a partir de segmentos de tallo de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en frascos Gerber®. Resultados a los 75 días de cultivo.	90
Tabla 21	Brotes generados a partir de segmentos de tallo de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en frascos Gerber®. Resultados a los 180 días de cultivo.	91
Tabla 22	Brotes generados a partir de segmentos de hoja de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en cajas Petri, con agua de coco. Resultados a los 75 días de cultivo.	99
Tabla 23	Brotes generados a partir de segmentos de hoja de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en cajas Petri, con agua de coco. Resultados a los 180 días de cultivo.	101
Tabla 24	Brotes generados a partir de segmentos de tallo de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en frascos Gerber®, con agua de coco. Resultados a los 75 días de cultivo.	104
Tabla 25	Brotes generados a partir de segmentos de tallo de <i>L. gouldiana</i> , en medio MS en frascos Gerber®, con agua de coco. Resultados a los 180 días de cultivo.	106
Tabla 26	Resumen de resultados al final del período de inducción (75 días) y al final del período de multiplicación (105 días), para los diferentes explantes cultivados en frascos Gerber® y cajas Petri.	109
Tabla 27	Combinación de mezclas y número de plántulas al inicio de la aclimatización.	111
Tabla 28	Porcentaje de sobrevivencia de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>L. gouldiana</i> en tres sustratos diferentes, después de 150 días de aclimatización.	113

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	N6 dimetil alil aminopurina
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido α -naftalenacético
ANP	Áreas Naturales Protegidas
AVG	Aminoetoxivinilglicina
BA	Benciladenina
CEPA	Ácido 2-cloroetilfosfórico
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
FESI	Facultad de Estudios Superiores de Iztacala
GA ₃	Ácido giberélico
HCl	Ácido clorhídrico
KC	Medio Knudson C (1946)
Kin	Kinetina
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
NOM	Norma Oficial Mexicana
PLB's	Protocorm like bodies (Cuerpos parecidos a protocormos)
Ppm	Partes por millón
RBBM	Reserva de la Biosfera de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo
TDZ	Tidiazuron
VW	Medio Vacin y Went (1949)
\bar{X}	Promedio

Resumen

Laelia gouldiana, especie endémica de Metztlán, Hidalgo, está considerada como extinta en la naturaleza. Su valor biológico y ecológico debe ser acompañado de acciones en colaboración que procuren su estudio y conservación. La producción de semillas fértiles es limitada o no ocurre, la propagación vegetativa convencional es lenta, por lo que su propagación mediante el cultivo de tejidos es una alternativa que genere un procedimiento efectivo para su multiplicación y conservación. A partir de cultivos *in vitro* de plántulas, se disectaron ápices de raíz, segmentos de tallo y de hojas. Se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS) 50 % sólido, con sacarosa 30 g/L, con combinaciones de Ácido α -naftalenacético (ANA) (0, 0.1 y 0.5 mg/L) y Benciladenina (BA) (0, 0.5 y 1.0 mg/L), en dos tipos de recipientes: cajas Petri y frascos Gerber®. En un segundo ensayo se cultivaron segmentos de tallo y hoja en MS 50 % adicionados con ANA (0 y 0.1 mg/L) y agua de coco (0 %, 10 % y 20 %). Los cultivos se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 16/8 horas de luz y oscuridad respectivamente. Cultivos en frascos Gerber® de ápice de raíz presentaron elongación. De tallo y hojas se regeneraron brotes individuales y grupos de PLB's; ambos se desarrollaron hasta plántulas completas. El mayor número de regenerantes se logró a partir de tallo, con 0.1 mg/L ANA, en frascos Gerber®, con un \bar{X} de brotes por explante de 4.4 y en 20% agua de coco 3.3 brotes por explante, mientras que de hoja se obtuvo con 0.5/1 mg/L ANA/BA 0.56 brotes por explante en frascos Gerber®, todos después de 75 días de cultivo. La respuesta morfogénica no estuvo asociada a la presencia de reguladores, sin embargo la estimularon mediante la formación de brotes y PLB's. No fueron requeridos tratamientos para inducir en los brotes la formación de raíces. Brotes y plántulas regenerados, se subcultivaron en medio libre de reguladores, para continuar su desarrollo, hasta su aclimatización en charolas de plástico con tres combinaciones de sustratos (peat moss/agrolita 3:1, fibra de coco/agrolita 3:1 y peat moss/fibra de coco/agrolita 3:3:1). La mejor combinación fue peat moss/agrolita, con sobrevivencia de 98 %, después de 150 días. Los resultados hacen vislumbrar una opción para la conservación de ésta y otras orquídeas mexicanas en peligro de extinción.

1. Introducción

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae (Dressler, 1981; Dressler, 1993), compuesta de 25 a 30 mil especies y es reconocida como la más numerosa del reino vegetal (Arditti, 1992; Dressler, 1981). Éstas tienen un amplio rango de distribución y se encuentran principalmente en zonas templadas y tropicales en todo el mundo (Wright, 1958). En México la mayoría se distribuye en las regiones situadas al sur y sureste del Trópico de Cáncer (Wright, 1958; Barba *et al.*, 2002; Padrón, 2006). Sin embargo, pese a su amplia distribución, las orquídeas son uno de los taxa más vulnerables en México, debido principalmente a su belleza, lo que eleva su valor hortícola y comercial. Debido a esto son generalmente extraídas de su ambiente natural para el comercio ilegal. Otros de los factores que las hacen vulnerables son la destrucción, la fragmentación y la transformación de sus hábitats (la mayoría crece en bosques tropicales) (Soto y Hágsater, 1990; Sierra, 2006; Ávila y Oyama, 2007), donde por lo general también lo hacen las comunidades humanas más pobres (Soto y Hágsater, 1990); lo anterior, ha ocasionado que en nuestro país la biodiversidad de orquídeas esté en serio peligro de desaparecer.

La Norma Oficial Mexicana-059-Ecología-2001 (NOM-059-ECOL-2001), señala que solamente hay 181 especies de orquídeas catalogadas en algún estatus de amenaza, de las cuales solo una especie está considerada como extinta en la naturaleza (SEMARNAT, 2002). Esta orquídea es *Laelia gouldiana*, que era endémica de la parte baja de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo (Soto y Hágsater, 1990; Soto, 2002). Por su belleza, sus flores se ocupaban en el día de Muertos (Hágsater *et al.*, 2005). Se ha notado que la transformación de su hábitat en campos de cultivo y la sobrecolecta, perjudicaron de manera determinante a la especie (Soto y Hágsater, 1990). Hoy de esta especie sobreviven escasos individuos en casas de Metztitlán, en algunos Jardines Botánicos y colecciones privadas (E. Aguirre, com. pers, 2007).

Una de las prioridades es implementar estrategias para la conservación *ex situ* de *L. gouldiana*, que serviría como modelo para ser aplicadas a otras especies de la familia Orchidaceae. Una forma es a través del cultivo de tejidos, mediante el cual se puede lograr el almacenamiento y la propagación masiva por medio de distintos segmentos de una planta (Navarro y Vera, 1987; Rubluo *et al.*, 1989; Pierik, 1990). El cultivo de tejidos ha demostrado ser una herramienta biotecnológica de gran utilidad para el estudio, conservación y

propagación rápida y masiva de diversas especies de plantas (orquídeas, cactáceas, cícadas, coníferas y agaves, entre otras) como una alternativa de manejo sostenible (Pierik, 1990; Suárez, 2006).

Por lo anterior, en la presente investigación se exploró el potencial regenerativo de la raíz, la hoja y el tallo de plántulas de *Laelia guoldiana*, para establecer un protocolo de regeneración y propagación, además de establecer condiciones para su aclimatización en invernadero. Lo cual ayudará a mantener una base de plantas para su estudio, conservación y en un futuro sirvan para la reintroducción a su hábitat, previamente estudios de campo. Por otra parte, pueden constituir una fuente de recursos económicos por medio de su venta en jardines botánicos, lo que podría disminuir una parte de la demanda comercial y con esto posiblemente ayude a reducir la sobrecolecta de otras poblaciones silvestres de individuos del género *Laelia*.

2. Marco Teórico

2.1 Biodiversidad

La biodiversidad abarca toda la riqueza y variedad de formas vivientes que existen en la biosfera, es decir todas las especies de plantas, animales, y microorganismos, así como los ecosistemas (incluyendo los procesos de los ecosistemas) a los que pertenecen. Se contemplan tres niveles: la diversidad genética, diversidad de especies y diversidad de ecosistemas. Todo esto da por resultado una compleja red de interacciones entre el componente biótico y abiótico de los ecosistemas (McNeely, 1990; Possiel *et al.*, 1995). Ésta es resultado de la evolución biológica que ha ocurrido en el tiempo, irreplicable en las mismas condiciones, que se manifiesta en la existencia de diferentes formas de vida (Tinoco, 2006).

Se piensa que en la Tierra hay alrededor de 10 millones de especies de todos los reinos, que sobre todo se distribuyen en bosques tropicales. Se calcula que del 50 al 80 % de la diversidad biológica del planeta está concentrada en 6 y 12 países.. Estos países son denominados megadiversos, entre ellos está México, en cuarto lugar por su biodiversidad (Toledo y Ordóñez, 1998; CONABIO, 1998).

Biodiversidad en México

Se calcula que México alberga entre el 10 y el 12% del total de la biota del mundo. Esto se debe a que presenta una topografía accidentada y una variedad de climas que crean condiciones ambientales diversas (Flores y Gerez, 1994; CONABIO, 1998).

Debido a lo anterior, en el territorio nacional se encuentran casi todos los tipos de vegetación reconocidos en el mundo. Siendo los más abundantes en cuanto a especies, el bosque templado y el bosque tropical seco (7 mil especies), seguidos del matorral xerófilo y el pastizal (6 mil especies) (Flores y Gerez, 1994).

De las más de 250 mil especies de plantas vasculares en el mundo, México posee alrededor de 21600 a 34 mil especies, de éstas, más del 40% son endémicas de nuestro país (Toledo y Ordóñez, 1998; CONABIO, 1998).

Dentro de las familias más representativas en México están la familia Cactaceae, Asteraceae, Poaceae, Fabaceae y Orchidaceae (Toledo, 1988). De éstas, la familia Orchidaceae ocupa un lugar importante en México por su número de endemismos y por las tradiciones culturales en las que se emplean (Hágsater *et al.*, 2005).

Destrucción de la Biodiversidad

La alteración de los hábitats naturales, se reconoce como la principal amenaza para la biodiversidad. Entre los principales factores de riesgo que afectan a la mayor parte de las plantas se encuentran: la deforestación, que se debe principalmente a la ganadería, la agricultura y la extracción forestal. La pérdida de la biodiversidad reduce la capacidad de los ecosistemas de suministrar los bienes y servicios que generan beneficios ambientales, económicos, agrícolas, culturales y de salud pública (Toledo, 1988).

Los efectos del daño ambiental sobre el suelo, el agua, el aire y la biodiversidad, ocasionado por diferentes causas de origen social, económico y tecnológico requieren respuestas específicas y concretas que se reflejen, en primer lugar, deteniendo el proceso de deterioro en un espacio y tiempo específicos; en segundo lugar mejorando las condiciones de calidad y cantidad de estos recursos ambientales y finalmente estableciendo una interrelación armónica entre los recursos naturales y la sociedad en su conjunto, bajo el contexto del concepto de desarrollo sostenible (CONANP, 2003).

Para esto hay que implementar estrategias que protejan los ecosistemas, es decir que conserven la biodiversidad así como su integridad, lo que permitirá a su vez suministrar los servicios ambientales y sociales que de ellos se deriven (CONANP, 2003).

Estrategias para la conservación de la biodiversidad

Hay que hacer una planificación integral para conservar los recursos naturales. Para esto es necesario integrar todos los recursos tecnológicos, científicos y sociales que se tengan disponibles, con lo cual se podrá tener una mejor manipulación de los recursos naturales, tales como la vegetación, el agua, el suelo, la fauna, los minerales y la atmósfera, además de conservarlos como primera meta (Saunier y Meganck, 1995).

La conservación de la biodiversidad se lleva a cabo mediante una serie de estrategias. En general se puede dividir en dos: conservación *in situ*, que es la conservación de áreas naturales con importancia biológica, ecológica y la conservación *ex situ*, que se enfoca en conservar mediante jardines botánicos, zoológicos, bancos de germoplasma y programas de propagación o reproducción de las especies. La conservación de la biodiversidad y sus recursos naturales es prioritaria, pero debe de combinarse a la par con planes para poder tener un desarrollo como sociedad y así lograr, un desarrollo sostenible (Possiel *et al.*, 1995).

Conservación *in situ*

Se enfoca como se mencionó anteriormente, en conservar las áreas naturales con importancia biológica y ecológica. Estos métodos buscan conservar las poblaciones y ecosistemas naturales, pero el desafío de emplear este tipo de conservación es conocer cuáles deben de ser las áreas naturales que se van a proteger. Por lo que uno de los criterios sería que estas áreas incluyan ecosistemas frágiles, raros, con varias especies endémicas y una elevada abundancia de especies (Possiel *et al.*, 1995).

A pesar de que desde 1993 se acordó en varios países la importancia de las áreas naturales protegidas, todavía son insuficientes, así como los presupuestos designados para esta labor (Possiel *et al.*, 1995).

En México una de las políticas ambientales que el gobierno ha establecido para contribuir con la conservación y manejo de los recursos naturales, es el establecimiento de Áreas Naturales Protegidas (ANP), que están a cargo del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SINAP). Éstas se conforman por ciertas áreas que por su diversidad y características ecológicas son consideradas con especial relevancia en el país y, que se pretende funcionen como verdaderos ejes de conservación y desarrollo sustentable. Las ANP, tienen como objetivos preservar los ambientes naturales representativos de las diferentes regiones biogeográficas y ecológicas del país, así como los ecosistemas más frágiles, para asegurar el equilibrio y continuidad de los procesos evolutivos y ecológicos; asegurar la conservación y el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad en sus tres niveles de organización, en particular de las especies en peligro de extinción, amenazadas, endémicas, raras y las sujetas a protección especial; proporcionar un campo propicio para la investigación científica, el estudio de los ecosistemas, además de divulgar conocimientos que permitan rescatar la biodiversidad nacional (CONABIO, 1998).

Actualmente hay 171 ANP que suman 23,877,976 millones de hectáreas. Algunas de las cuales que cuentan todavía con un importante número de orquídeas son las que cuentan con extensiones de selvas húmedas como la reserva de la biosfera de Chamela-Cuixmala y Calakmul, los bosques comunitarios de la Unión Chinanteco-Zapoteca en el norte de Oaxaca y el Monumento Natural Bonampak, además de los Chimalapas, que es cuidada por los pobladores locales (Hágsater *et al.*, 2005).

Ejemplo de conservación *in situ*: RBBM

Un ejemplo de ANP es la zona denominada Barranca de Metztitlán, en el estado de Hidalgo (Figura 2), la cual fue decretada como ANP con la categoría de Reserva de la Biosfera el 27 de noviembre del 2000, por la SEMARNAT a través de la CONANP. Su variedad de ecosistemas, biodiversidad y el alto nivel de endemismo, aunado a la gran riqueza cultural por la existencia de construcciones históricas, pinturas rupestres y una extensión considerable de 2,090,512 ha, le dieron las características a la Barranca de Metztitlán para declararla como ANP (CONANP, 2003).

En términos generales el lugar es seco y semiseco, cálido en diferentes partes, con una precipitación media anual en la mayor parte de la Reserva de 600 mm. Predomina la vegetación de matorral xerófilo, matorral submontano y su transición al bosque de encino. En estos lugares es frecuente la presencia de plantas epífitas como bromelias, orquídeas y algunas cactáceas (CONANP, 2003). Al respecto de la vegetación en el lugar, se hayan alrededor de 270 géneros de plantas y 445 especies, de las cuales hay varias especies endémicas y/o con algún nivel de amenaza según la NOM-059-ECOL-2001 (Tabla 1).

Tabla 1. Especies endémicas de la RBBM y amenazadas de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001.

Fuente. CONANP, 2003. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán. México.

Nombre científico	Nombre común	Endemismo	Estatus
<i>Astrophytum ornatum</i>	Biznaga liendrilla	B. de Metztitlán	Amenazada
<i>Bouvardia erecta</i>	Garcita		Amenazada
<i>Aporocactus flagelliformis</i>	Cactus junco		Protección especial
<i>Cephalocereus senilis</i>	Viejito	B. de Metztitlán	Amenazada
<i>Dasyliirion longissimum</i>	Sotol		Amenazada
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	Biznaga gigante		Protección especial
<i>Ferocactus histrix</i>	Biznaga de acitrón		Protección especial
<i>Fouquieria fasciculata</i>	Barril		Amenazada
<i>Laelia anceps</i> subs. <i>dawsonii</i>	Flor de muerto		Peligro
<i>Laelia gouldiana</i>	Laelia de Metztitlán	B. de Metztitlán	Extinta en medio silvestre
<i>Laelia speciosa</i>	Flor de mayo		Protección especial
<i>Litsea glaucescens</i>	Laurel		Peligro
<i>Lophopora diffusa</i>	Peyote		Amenazada
<i>Mammillaria longimamma</i>	Biznaga de dedos largos		Amenazada
<i>Mammillaria polythele</i>		B. de Metztitlán	
<i>Mammillaria schiedeana</i>	Biznaga de Metztitlán	B. de Metztitlán	Amenazada
<i>Mammillaria wiesingeri</i>	Biznaga	B. de Metztitlán	Protección especial

Problemática ecológica de la RBBM

El deterioro ocasionado por el pastoreo libre y extensivo por parte de cabras, tanto históricamente como en la actualidad, han contribuido y contribuyen de manera notable a la degradación de los ecosistemas forestales, así como en las laderas de las barrancas. El ganado caprino es el de mayor presencia en la región, también el más destructor y el menos selectivo en cuanto a su alimentación, ya que se alimentan de matorrales y de lo que encuentran a su paso (CONANP, 2003).

La vegetación se encuentra perturbada debido a la intensa práctica agrícola, además que en el lugar se comercializan ilegalmente especies como *Tillandsia ehrenbergiana*, *T. albida*, *T. benthamiana*, *T. mauryana*, *T. juncea* y *T. fasciculata* que tienen valor ornamental, además de otras especies como las orquídeas que son especialmente atractivas, ya sea por sus formas, colorido y/o aroma, entre otros atributos y han sido objeto de recolección desde tiempos muy antiguos (CONANP, 2003).

Incendios inducidos, el establecimiento de poblados en laderas montañosas, ocasionan que este ecosistema tenga en algunas partes signos de deterioro (CONANP, 2003).

Estrategias para evitar la pérdida de biodiversidad en la RBBM

Una estrategia de conservación es a través de educación ambiental, proponiendo sistemas agroforestales, un uso más eficiente de las áreas en que se pudiese permitir una moderada actividad de la ganadería, acorde con la capacidad de carga de las mismas (CONANP, 2003).

El cultivo de especies es una de las mejores formas de utilizar la flora de México y en este caso de la RBBM, ya que de esta manera no se pone en riesgo su existencia. Pero se requiere de una regulación adecuada que permita a los habitantes recibir un beneficio directo por el uso de la vegetación y que por este motivo los mismos lugareños ejerzan acciones que contribuyan a su conservación. Para ésto hay que llevar a cabo acciones tanto de cultivo y comercialización de especies, como de vigilancia en la zona para evitar ilícitos en el ecosistema (CONANP, 2003).

Es un hecho que las especies presentes en la zona tienen gran potencial de aprovechamiento, particularmente desde el punto de vista cultural, alimenticio, ornamental y económico, además de que existe la demanda y el mercado para comercializarlas. Una de las familias que se puede propagar para su comercialización es la de las orquídeas. En el mercado mundial dependiendo de la planta y la forma de cultivo, se venden orquídeas *in vitro* a precios que van de US\$3 a

US\$20 dólares, por un frasco con aproximadamente 20 plántulas. Este mercado es dominado por Tailandia, que en el 2000 exportó plantas de orquídeas con una ganancia de US\$4 millones, colocándose como el mayor exportador de orquídeas (CIMS, 2005).

Conservación *ex situ*

Uno de estos planes o estrategias para proteger la biodiversidad, es la conservación *ex situ*, la cual se desarrolla fuera de su hábitat natural. Mediante esta alternativa es posible preservar parte de la diversidad genética y especies particulares que están en riesgo. Las especies y genes pueden conservarse a través del cultivo de tejidos vegetales, en bancos de germoplasma, en colecciones científicas de organismos vivos como zoológicos y jardines botánicos (CONABIO, 1998; Guerrant *et al.*, 2004).

Entre los objetivos que se deben plantear en este tipo de conservación, están la conservación, la propagación y el mantenimiento de las especies que ya no pueden subsistir en la naturaleza, así como la propagación masiva y subsecuente comercialización de especies de interés ornamental, con la finalidad de reducir y desalentar la colecta de plantas en sus hábitats naturales (Guerrant *et al.*, 2004; Suárez, 2006).

El inconveniente es que la conservación *ex situ* es costosa y presenta problemas complejos, sobre todo al mantener una especie fuera de su hábitat por períodos muy largos, lo que conlleva a ambientar el espacio donde se va a mantener. Con el riesgo de no siempre lograr la aclimatización de los organismos, además de que resulta casi imposible preservar la diversidad genética y la capacidad evolutiva de las especies, por lo que debe ser vista como una estrategia complementaria de la conservación *in situ*. Por lo anterior, deben establecer planes de manejo antes de iniciar alguna colección científica, para saber qué plantas o de cualquier otro taxón, se pueden mantener con los recursos que se dispongan (Hágsater *et al.*, 2005).

Pese a ello es muy importante el papel que juega la conservación *ex situ* a nivel mundial y por ende en nuestro país, que ante la falta de conciencia, vigilancia y estrategias que aseguren la permanencia de las especies amenazadas y en peligro de extinción, además de otros grupos de organismos que sin estar en estas categorías es muy importante su preservación (Cribb *et al.*, 2003). Por ello hay que reconocer que en la actualidad existe un progreso considerable para establecer protocolos para la conservación *ex situ* de varias especies vegetales, tales como *Laelia anceps*, en el cual las plantas de los viveros se consiguen con facilidad y son de tan buena calidad hortícola por ser descendientes de especímenes sobresalientes, generalmente

premiados por asociaciones de cultivadores, que muy pocos aficionados coleccionarían o comprarían una planta silvestre. *Paphiopedilum delenatii*, nativa de Vietnam, ha podido persistir gracias a una propagación y comercialización exitosa y a los cientos de cultivadores particulares que las mantienen en sus colecciones (Hágsater *et al.*, 2005).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una excelente herramienta para el estudio, conservación y aprovechamiento sustentable de especies como las orquídeas que se encuentran tan amenazadas en su hábitat natural. Con el CTV es posible lograr la germinación de semillas y la obtención de un gran número de plantas en tiempos relativamente cortos (Suárez, 2006; Chávez, 2008).

2.2 Generalidades de la familia Orchidaceae

Por la belleza y elegancia de sus formas, por sus deliciosas fragancias y variados colores, la familia Orchidaceae, se encuentra entre las que poseen flores más atractivas del mundo. Desde tiempos muy antiguos, han engalanado palacios, castillos, salones y hasta los más modestos jardines o invernaderos (Ramírez, 1996).

El nombre deriva del griego *orchis*, que significa *testículos*, en alusión a los dos tubérculos subterráneos de ciertas orquídeas terrestres nativas de Grecia (Téllez, 2003).

La familia está compuesta de aproximadamente 25 a 30 mil especies, con 700 a 900 géneros, por lo que es reconocida como la más numerosa del reino vegetal (Arditti, 1992; Dressler, 1981), de hecho se estima que una de cada 10 especies de plantas con flor es una orquídea (Hágsater *et al.*, 2005).

Éstas tienen un amplio rango de distribución y se encuentran principalmente en zonas templadas y tropicales en todo el mundo entre 68° de latitud norte y 56° latitud sur, con las mayores concentraciones en las montañas, a 20° del ecuador, cuya atmósfera es más o menos húmeda (Wright, 1958), a excepción de las zonas de hielo y de desierto (Barba *et al.*, 2002; Padrón, 2006).

Formas de vida

Debido a su especialización y afinidad, a las orquídeas se les puede encontrar viviendo en diferentes sustratos, ya que ellas simplemente crecen donde pueden encontrar apoyo y nutrientes, como adheridas a los troncos y ramas de los árboles, a este tipo de crecimiento se le denomina epífita, que viene del griego "*epi*" que significa "*encima o sobre*" y "*phyton*" que

significa "*planta o vegetal*", esto es común en muchas orquídeas tropicales. Por ejemplo *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium* (Arditti, 1992). También hay otras que preferentemente habitan en sustratos rocosos, sobre laderas rocosas, y se les denomina litófitas, que significa que crecen en las rocas. Algunos ejemplos son *Myrmecophila tibicinis*, *Cyrtopodium macrobulbon*, *Brassavola nodosa*, *Bletia* (Arditti, 1992; Rojas, 2007; Chávez, 2008). Hay orquídeas que prefieren el clima templado, que son las orquídeas terrestres, es decir las que crecen en la tierra (Ramírez, 1996), por ejemplo *Dichromanthus aurantiacus*, *Orchis*, *Spiranthes*, *Govenia capitata* (Hágsater *et al.*, 2005; Rojas, 2007). Cabe mencionar que hay unas pocas orquídeas que habitan entre la materia en descomposición en el suelo o sobre las hojas muertas del suelo, es decir son saprófitas, por ejemplo, *Sarcoglottis sceptrodes* (Suárez, 2006) y *Rhizanthella gardneri*, que vive bajo tierra en Australia y sólo llega a emerger ligeramente cuando ocurre la floración (Arditti, 1992).

Características biológicas y morfológicas de las orquídeas

Son una familia muy avanzada evolutivamente y especializada desde el punto de vista ecológico (Chávez, 2008). La flor es la estructura más atractiva de las orquídeas, pero lo más relevante evolutivamente hablando es la fusión de los estambres y el pistilo en la estructura denominada *columna*, lo cual es el resultado de la coevolución que han tenido las flores de las orquídeas con sus polinizadores para facilitar la polinización (Yu y Goh, 2001; De la Cruz, 2006).

Los frutos en orquídeas se denominan *cápsulas*. Sus semillas son muy diminutas, pesan entre 0.3 y 14 μg , miden de 0.25 a 1.2 mm de largo y entre 0.09 y 0.27 mm de ancho (Pierik, 1990). Hay algunas especies que presentan un embrión relativamente diferenciado que incluye un cotiledón rudimentario, como en *Sobralia macrantha* y otras que no tienen embrión diferenciado y carecen de cotiledones o se presenta incipiente y sin endospermo, por lo que las reservas nutritivas se encuentran almacenadas en las células del embrión, además al suspensor se le atribuye parte del papel de la nutrición (Arditti, 1967).

Las orquídeas, como otras monocotiledóneas, presentan haces vasculares dispersos, venación foliar paralela, partes florales en múltiplos de tres y ovario ínfero (Dressler, 1981).

Morfología de la raíz

Las raíces de las orquídeas son órganos que presentan diferentes adaptaciones. Tienen las funciones de absorber agua, nutrientes y fijar la planta al sustrato. En las especies terrestres no hay gran diferencia con las demás monocotiledóneas (De la Cruz, 2006). En orquídeas epífitas encontramos raíces aéreas que permanecen libres o adheridas a troncos, donde captan los nutrientes y agua del ambiente o de materia orgánica acumulada en los troncos. Hay especies como *Catasetum*, donde las raíces son rígidas y delgadas que crecen verticalmente hacia arriba y contribuyen a enriquecer el sustrato de la planta al capturar hojarasca y otros detritos orgánicos (Chávez, 2008). Orquídeas epífitas como *Barkeria scandens* y *Laelia autumnalis*, presentan una cubierta esponjosa de alrededor de una a ocho células muertas que recubre la raíz llamada velamen, la cual le da un color blanquecino. Esta capa facilita la absorción de agua y minerales (Hágsater *et al.*, 2005; De la Cruz, 2006; Chávez, 2008). Las raíces aéreas verdaderas son total o parcialmente verdes o clorofílicas y tienen capacidad fotosintética, y en algunos géneros este carácter es vital para sobrevivir, ya que llegan a carecer por completo de hojas y tallos, además viven en algunas condiciones extremas, por ejemplo en el género *Dendrophylax* y varias especies de *Campylocentrum* (Hágsater *et al.*, 2005; De la Cruz, 2006).

Morfología de las hojas

Las hojas llevan a cabo las funciones de transpiración, el intercambio gaseoso, la producción de nutrientes mediante la fotosíntesis y almacenan agua como en especies de la subtribu Pleuronthallidinae (Chávez, 2008). Son como en la mayoría de las monocotiledóneas, es decir simples, con nervaduras paralelas, alargadas, generalmente persistentes, solitarias, en número de dos o más hojas, lanceoladas, trianguladas o de forma ovalada y de color generalmente verde (De la Cruz, 2006). En algunas especies como las pertenecientes al género *Trichocentrum*, donde los pseudobulbos son diminutos, las hojas cumplen el papel de almacenar agua y de reservas alimenticias (Hágsater *et al.*, 2005; De la Cruz, 2006).

Las hojas suculentas representan una inversión importante de recursos para la planta y por lo general son funcionales durante varios años. Una estrategia alternativa es la producción de hojas delgadas relativamente poco costosas que mueren y caen al finalizar cada temporada de crecimiento. La presencia de poco follaje es más común en orquídeas terrestres, como *Habenaria* y *Platanthera*, aunque hay orquídeas epífitas que también presentan hojas de corta duración, por ejemplo en los géneros de la subtribu Catasetinae (Hágsater *et al.*, 2005).

Morfología del tallo

Los tallos de las orquídeas son comparables a una caña o carrizo. Pueden ser caulescentes o acaules. Las orquídeas con tallo caulescente por lo general presentan pseudobulbo, los cuales son tallos aéreos notablemente engrosados, presentes en muchas orquídeas epífitas y algunas terrestres o rupícolas, como en el género *Cyrtopodium*. Están formados por segmentos o entrenudos delimitados por nudos o anillos cicatrizales donde originalmente se insertaban hojas, vainas o escamas foliares; son de distintas formas y grosores, donde se almacena alimento. Las orquídeas con tallos delgados y erectos es quizá la condición ancestral en la familia, como lo sugiere la presencia en las orquídeas apostasioides (*Apostasia* y *Neuwiedia*), algunas cypripedioides (*Cypripedium* y *Selenipedium*) y varios grupos epidendroides “primitivos”, como *Corymborkis*, *Palmorchis*, *Sobralia* y *Tropidia* (Hágsater *et al.*, 2005).

Las orquídeas acaules, presentan un tallo corto, como en muchas orquídeas terrestres que presentan tubérculos o cormos característicos en varios grupos de orquídeas epidendroides terrestres como *Bletia*, *Govenia*, *Liparis* y *Malaxis* (De la Cruz, 2006).

Ambos tipos de tallos engrosados constituyen almacenes de agua y sustancias de reserva, como almidón, que son utilizados al menos en parte para sustentar la producción de flores y frutos y el desarrollo de nuevos vástagos (Hágsater *et al.*, 2005).

También se pueden dividir por sus dos formas de crecimiento, monopodial o simpodial. Las monopodiales tienen un tallo simple con crecimiento vertical en el ápice e indefinido, como en *Vanda* y *Vanilla*. Mientras que en las simpodiales se distinguen dos ejes: un rizoma o tallo rastrero a partir del cual se originan a diversos intervalos tallos carnosos o pseudobulbos de crecimiento definido, esto es, completo a cada fin de estación de la base del cual tras un periodo de reposo nace un nuevo tallo, como en *Laelia* y *Oncidium* (De la Cruz, 2006; Padrón, 2006; Chávez, 2008).

Características ecológicas de las orquídeas

La reproducción es uno de los rasgos más importantes de las orquídeas, ya que a lo largo del tiempo han coevolucionado con animales, principalmente insectos, entre los cuales están abejas, avispas, moscas, mariposas diurnas y nocturnas, pero también aves como colibríes (Téllez, 2003), para lograr su éxito de polinización. Esto se debe a que las flores de las orquídeas presentan varios atributos para atraer y guiar la polinización, tales como la forma y el color de las flores, fragancias, feromonas y néctar (Hágsater *et al.*, 2005). Pero cuando empieza la temporada reproductiva, es decir, la floración, hay un esfuerzo que incrementa los riesgos y costos entre sobrevivir y reproducirse, lo que implica un gasto energético elevado para la planta, además se ha visto que la floración hace que algunos individuos sean más susceptibles a la depredación por herbivoría (Shefferson *et al.*, 2003).

Sumado a los costos que implica la floración, se adicionan los factores ambientales como la disponibilidad de recursos, que determinan en primera instancia si la planta florece, sobrevive, brota o entra en dormancia, lo cual se ha estudiado en orquídeas como *Cypripedium calceolus* ssp. *parviflorum* y en *Spiranthes spiranthes*, en la que hay una tendencia de entrar en estado vegetativo después de una temporada de floración. Esto es una disyuntiva, donde se evalúan los costos y los beneficios para cada caso (Shefferson *et al.*, 2003).

Las orquídeas establecen una asociación entre los embriones de las semillas y un hongo micorrízico, como los del género *Rhizoctonia* o *Tulasnella*, para así poder germinar de forma natural, ya que al carecer la mayoría de las semillas de reservas nutritivas o simplemente no poder utilizar sus propias reservas de lípidos, debido a que no pueden degradarlas para así continuar con la germinación, tienen que establecer esta simbiosis que se denominó germinación simbiótica. Esto lo observó por primera vez Bernard en *Neotia nidus-avis* y subsecuentemente en otras orquídeas incluidas *Phalaenopsis* (Arditti, 1992). La asociación es específica, es decir, con la especie apropiada de hongo micorrízico. En esta relación las semillas son micoheterótrofas obligadas, ya que los hongos micorrízicos le proveen de nutrientes, tales como carbohidratos, polisacáridos (almidón) y minerales, mientras que los hongos obtienen por parte de la planta vitaminas y reguladores de crecimiento (Arditti, 1992; Hágsater *et al.*, 2005).

Una de las características ecológicas más notorias en las orquídeas es su lento desarrollo y crecimiento. Esto se aprecia en las orquídeas epífitas, las cuales tienen por lo general ciclos de

vida largos, como por ejemplo los individuos de la subtribu Oncidiinae, donde llegar a la madurez reproductiva les toma más de 5 años (Chase *et al.*, 2005).

Diversidad y distribución de las orquídeas en México

En México se conocen alrededor de 1200 a 1400 especies y subespecies, en 159 géneros, de las cuales 444 son endémicas, lo que corresponde a un 40% del total nacional (Hágsater *et al.*, 2005). Esta característica convierte a la orquideoflora mexicana, en una de las más ricas en endemismos de América, quizá sólo superada por Brasil. El número de especies mexicanas es menor al de otros países de América como Colombia, Brasil, Ecuador y Perú, sin embargo México cuenta con un conocimiento taxonómico más avanzado de sus especies (Ramírez, 1996).

En nuestro país las orquídeas se distribuyen principalmente en las regiones situadas al sur y sureste del Trópico de Cáncer, por las costas del Pacífico a las del Golfo de México, en estados como Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas, además de los estados de Morelos, México, Hidalgo, Puebla y San Luis Potosí a una altitud desde el nivel del mar, pasando por 1000 msnm, hasta los 4000 msnm, aunque todas las entidades de México cuentan por lo menos con una especie (Wright, 1958; Ramírez, 1996; Barba *et al.*, 2002; Padrón, 2006).

Uno de los géneros más emblemáticos de orquídeas en nuestro país, es el género *Laelia*, el cual ocupa un lugar privilegiado en nuestra cultura, ya que sus flores se emplean en varias celebraciones (Hágsater *et al.*, 2005).

Género *Laelia*

El género *Laelia* fue descrito por Lindley en 1831. Es uno de los géneros más grandes del continente Americano, extendiéndose desde Cuba y México hasta Brasil y Argentina (Wiard, 1987). Es muy semejante al de *Cattleya*, ya que botánicamente no se diferencian mucho, siendo el número de polinios la característica discrepante entre ambos. El género *Laelia* cuenta con ocho polinios en dos series, en tanto que *Cattleya* sólo presenta cuatro, esto fue observado por primera vez por Bentham y Hooker (Williams, 1973).

La mayoría de las especies del género *Laelia* se encuentran sobre árboles hospederos de especies de encino, que forman bosques abiertos caducifolios y crecen desde los 100 a los

2700 msnm. La época de floración de las distintas especies se extiende prácticamente durante todo el año con la mayoría de ellas floreciendo en otoño (Sierra, 2006).

Usos tradicionales de *Laelia* y otros géneros

El género *Laelia* evoca el clásico concepto popular de orquídea, es decir resalta por su belleza, forma y colorido. No es sorprendente que en México sean las orquídeas por antonomasia y ocupen un lugar privilegiado en la cultura. En estados como Hidalgo, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Morelos, Estado de México y Chiapas son conocidas con nombres populares que aluden a la época en que florecen (Ramírez, 1996). Son las flores de las principales celebraciones religiosas, de los bautizos, de las bodas, se ofrecen a los difuntos como en el día de Muertos y en las celebraciones de la Candelaria el 2 de febrero. Para la de San Sebastián en Chiapas, se emplean las flores de *L. superbiens* y *Guarianthe skinneri* (Hágsater *et al.*, 2005).

Con la flor de mayo o de corpus (*L. speciosa*) se hacen guirnaldas para decorar las yuntas el 15 de mayo durante la fiesta de San Isidro Labrador, patrono de los agricultores, festividad con la que se celebra en México la llegada de las lluvias y con sus flores se confeccionan *corsages* y arreglos en el día de las madres (Hágsater *et al.*, 2005).

En Oaxaca, la flor de tatanache (*L. albida*), la huichila o lirio de san Francisco (*L. furfuracea*), además de otras orquídeas como *Rhynchostele cervantesii* subsp. *membranacea* y la ita sama cuim (*Artorima erubescens*), son un adorno común en las tumbas, altares y también en los nacimientos de la época navideña. Por otra parte, *L. eyermaniana* se emplea en los pueblos serranos de Durango para la fiesta de San Miguel el 29 de septiembre, de donde proviene su nombre vernáculo, flor de San Miguel (Hágsater *et al.*, 2005).

El 2 de noviembre el cementerio del pueblo de Chilapa, Guerrero es todo un espectáculo: las tumbas cubiertas por flores de cempasúchil y las cruces con ramos de “calaveritas” (*L. anceps* subsp. *dawsonii* f. *chilapensis*) y *Barkeria scandens* son espléndidas (Hágsater *et al.*, 2005).

La flor de los muertos o de Todos los Santos (*L. autumnalis*), son utilizadas para adornar las iglesias durante la misma temporada, sobre todo en Michoacán, Morelos y la zona de Ocuilan y Amecameca, en el Estado de México. De igual forma en Metztitlán, Hidalgo se utiliza en estas festividades a la monjita (*L. gouldiana*), que anteriormente llamaban *sanctorum*, en referencia a su uso y que ha sido muy importante en la cultura de la gente de la localidad, además es una especie muy atractiva en cuanto a sus flores, por lo que es muy apreciada en la horticultura (Hágsater *et al.*, 2005).

Descripción Botánica de *Laelia gouldiana* (Soto, 2002)

Laelia gouldiana es una hierba epífita, de 30-100 cm de alto (a); raíces de 1.5-3 mm de grosor. Rizoma evidente 2-3 cm de largo, 7-15 mm de grosor; pseudobulbo elipsoide, algo comprimido, 54-88 mm de alto, 18.5-32 mm de ancho. Por lo general dos hojas, agudas, conspicuamente erectas, coriáceas-carnosas, rígidas, 16.5-25 x 2.3-3 cm. Inflorescencia erecta, 40-75 cm de largo, pedúnculo de 3.5-5 mm de grosor, con 3-9 flores. Flores muy vistosas, de 6.5-7.5 cm de diámetro (b), tépalos púrpura-magenta oscuro, brillantes; labelo (c) con los lóbulos laterales blancos con los márgenes apicales magenta, garganta crema-amarillento, fuertemente marcada con líneas púrpura-magenta; lóbulo medio púrpura-magenta intenso con la base crema-amarillento, columna blanco-verdosa con muchas hileras de puntos púrpura, fragancia intensa, floral-aromática. Ovario 32-48 mm de largo, 2-4 mm de grosor. Sépalos extendidos, ligeramente convexos, márgenes algo reflexos; los pétalos extendidos, planos a convexos, rómbicos, agudos. El labelo es trilobado, más bien recto (c). Columna (d) arqueada, sin alas, con un nectario seco en la base. Polinario de 2.7 x 3 mm, formado por 8 polinios, comprimidos (e). Cápsula elipsoide con 6 quillas conspicuas. Número cromosómico $2n = 40$ (Figura 1 y 2).

Laelia gouldiana recibe varios nombres comunes, entre los que destacan “Sanctorum”, “Flor de Muerto” y “Monjita” (Soto, 2002; Hágsater *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que durante algún tiempo se pensó que *L. gouldiana* era un híbrido natural, esto en parte a que no se ha colectado en estado silvestre y que no se ha detectado variación morfológica, pero lo anterior no es evidencia de que sea un híbrido entre *L. autumnalis* y *L. anceps*, como era sugerido por algunos autores. Incluso el cruzamiento entre ambas especies, no tiene nada que ver con *L. gouldiana* (Soto, 2002; Jezek, 2005; E. Aguirre, com.pers., 2007).

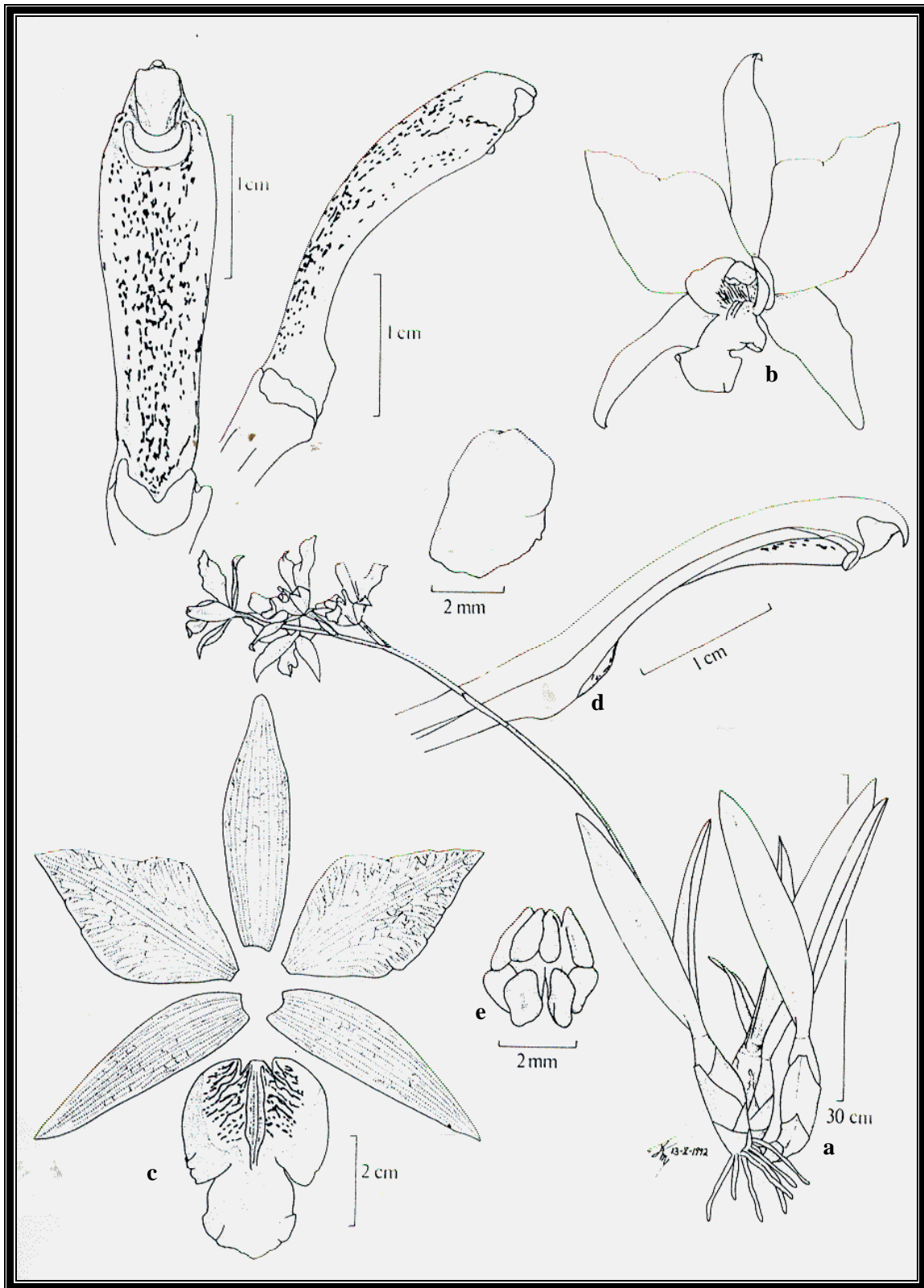


Figura 1. Lámina de *Laelia gouldiana*
(Soto, 2002).

Clasificación taxonómica de *Laelia gouldiana* (Cronquist, 1981; Dressler, 1993).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu. Epidendreae

Subtribu: Laeliinae

Género: *Laelia* Lindl.

Especie: *Laelia gouldiana* Rchb.f.

Distribución geográfica de *Laelia gouldiana*

Su distribución se reporta que se restringía de manera natural a la parte baja de la Barranca de Metztitlán, Hgo. (Figura 3), es decir en la vega del río de Metztitlán (Soto y Hágsater, 1990; Hágsater *et al.*, 2005).

Por lo general crecía en un área semiárida con vegetación de matorral xerófilo principalmente en árboles de *Prosopis* spp., incluso como a *L. autumnalis*, también a *L. gouldiana* se le veía crecer sobre ciertos cactus arborescentes y en grandes nogaleras que crecen en el fondo de la barranca (Hágsater *et al.*, 2005), lo que no es muy usual en las orquídeas (Wright, 1958). Además es probable que creciera en la transición del matorral submontano al bosque de encino, donde es frecuente la presencia de plantas epífitas como bromelias y orquídeas (CONANP, 2003).

Crece a una altitud de 1200 a 1600 msnm. Sus adaptaciones al clima seco como hojas coriáceas y pseudobulbos alargados sugieren que vivía bien en estas áreas (Soto, 2002). Su floración se llevaba a cabo entre el otoño y el invierno (Jezek, 2005).

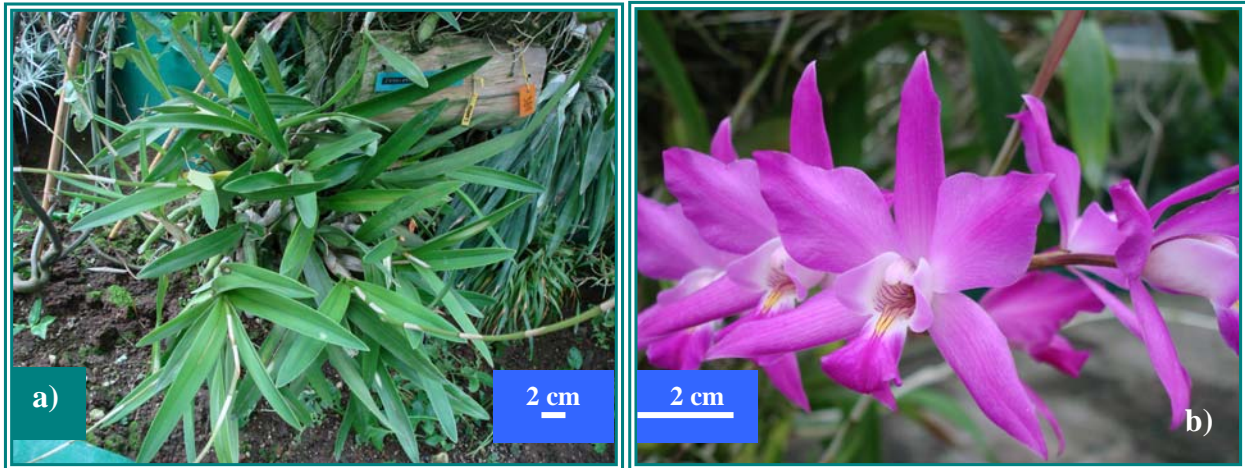


Figura 2. a) Planta madura de *L. gouldiana*, b) inflorescencia de *L. gouldiana*.

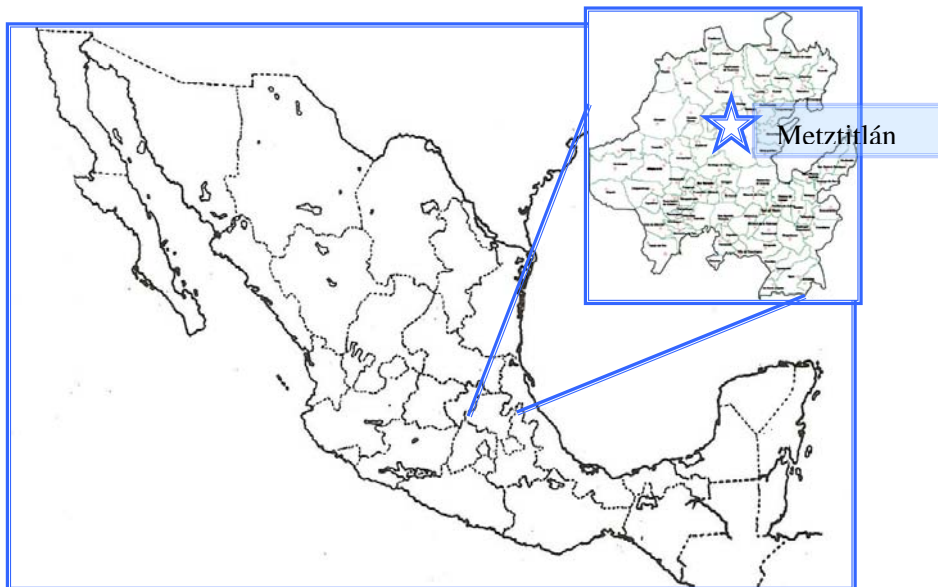


Figura 3. Distribución de *L. gouldiana*, especie endémica de la Barranca de Metztlán, Hidalgo.

Destrucción y consecuencias por la pérdida de la biodiversidad de las orquídeas

Debido al lento desarrollo de las orquídeas, que presentan bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos, escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales, además muchas de ellas crecen en áreas y ambientes muy restringidos, siendo con frecuencia endémicas de una cadena montañosa o de zonas poco extensas, las hace susceptibles a alteraciones en sus ecosistemas. Lo que aunado a factores provocados por los humanos, como son la destrucción, la modificación, la fragmentación de sus ecosistemas y la

extracción ilegal de ejemplares, son las causantes o los responsables de que actualmente en México se encuentren más del 10 % de las orquídeas en estatus crítico de extinguirse (CONANP, 2003; Suárez, 2006). La familia Orchidaceae, es un buen ejemplo en el cual las especies han sido llevadas a la extinción resultado de las actividades humanas (Ávila y Oyama, 2007). Esto ha provocado o puede provocar un desequilibrio de carácter ecológico, lo cual biológicamente hablando, significa la desaparición irreversible de genotipos que son el resultado de un proceso evolutivo desarrollado durante millones de años, e implica también una reducción en las probabilidades de utilización de la variabilidad vegetal (Álvarez, 1993). Un ejemplo particular y crítico es el de *Laelia speciosa*, conocida como “flor de mayo”, considerada como amenazada según la NOM-059-ECOL-2001, ya que se recolecta durante la Semana Santa y en otras fiestas religiosas que coinciden con su floración, para adornar iglesias (SEMARNAT, 2002; CONANP, 2003). *Laelia autumnalis* y *L. gouldiana*, florecen alrededor del día de muertos, por lo que también se les recolecta durante esta temporada (Soto y Hágsater, 1990).

Muchas especies endémicas de México y otras que se distribuyen en nuestro país, como las especies *L. speciosa*, *Encyclia adenocaula*, *Oncidium tigrinum*, *Stanhopea tigrina* y *Barkeria scandens*, se colectan ilegalmente en miles de ejemplares, para su venta en varios mercados de ciudades mexicanas, principalmente en la Ciudad de México (Ávila y Oyama, 2007; Chávez, 2008), a precios por lo general muy bajos (Halbinger y Soto, 1997; Hágsater *et al.*, 2005), éste puede llegar a ser de \$ 10 por una planta con tres pseudobulbos.

La disminución de las poblaciones de muchas especies de orquídeas, es muy significativa y si persiste, se continuará perdiendo una parte importante de su variación genética y con ello, la capacidad de supervivencia de las especies (Hágsater *et al.*, 2005). Por esta razón y aunado a la destrucción, transformación de su hábitat, se hace necesario establecer planes para su protección y conservación (Ramírez, 1996).

Conservación de las orquídeas en México

Lo que distingue el pasado de las orquídeas mexicanas de todas las demás del mundo, es el hecho de que mucho tiempo antes de que los españoles llegaran a México y antes de Linneo, algunas especies ya eran cultivadas para adornar con sus flores los palacios y residencias de los gobernantes indígenas, en Tenochtitlán, como por ejemplo *Stanhopea hernandezii*, era

cultivada en el siglo XVI y había plantas de vainilla en el jardín botánico de Moctezuma en Oaxtepec (Wright, 1958).

Además de su importancia ornamental, antiguamente se aprovechaban las cualidades adhesivas del mucílago de algunas orquídeas como *Laelia speciosa*, *L. autumnalis*, *Bletia campanulata* y *B. coccinea*, el cual se extraía para emplearse en el arte plumario prehispánico, para adornar mantos reales, abanicos y escudos ceremoniales, por lo que se propagaban de forma convencional o vegetativa (Martínez, 1970; Téllez, 2003), es decir separaban los pseudobulbos a partir del rizoma de plantas adultas (Sierra, 2006).

El cultivo convencional o vegetativo de las orquídeas no se ha perdido del todo, ya que en zonas indígenas de los estados de Oaxaca, Guerrero, Puebla, Michoacán, Hidalgo y Chiapas se propagan aunque a un ritmo muy lento. Plantas del género *Laelia*, se cultivan por el valor que tienen en la cultura mexicana (Hágsater *et al.*, 2005). Pero no resulta suficiente, ya que las colectas ilegales por parte de los traficantes, es uno de los problemas con los que se enfrentan todos los días las poblaciones naturales de orquídeas (Chávez, 2008).

Conservación del género *Laelia* en México

El cultivo convencional por parte de los lugareños, que en su mayoría son campesinos del estado de Hidalgo, permitió la obtención de ejemplares de tres especies de orquídeas que no se han encontrado actualmente en la naturaleza: la *monjita* (*Laelia gouldiana*) y la *calaverita* (*L. anceps* subsp. *dawsonii* f. *chilapensis*). Otra especie cultivada convencionalmente y casi extinta en la naturaleza es *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* f. *dawsonii*, una de las orquídeas mexicanas más apreciadas en la horticultura mundial. Esto les ha permitido obtener algunos ingresos, ya que son comercializadas en sus localidades de origen (Hágsater *et al.*, 2005).

A pesar que se han conservado ejemplares de estas especies fuera de su hábitat, ésta resulta insuficiente, para satisfacer la demanda de orquídeas que hay en el mercado debido a que el cultivo convencional es muy lento, por lo que se siguen depredando poblaciones naturales de otras orquídeas del género *Laelia*, lo que provoca que desaparezcan las poblaciones y lamentablemente lleguen a extinguirse (Hágsater *et al.*, 2005). El cultivo convencional de orquídeas es sólo una opción y debe de regularse para que no se obtengan las plantas de poblaciones silvestres, por lo que se deben desarrollar estrategias para la conservación *ex situ* de orquídeas y otras plantas. En la práctica existen barreras a la exportación de especies nativas propagadas en viveros, lo cual acaba con cualquier iniciativa de comunidades y

viveristas dispuestos a dedicarse al cultivo de orquídeas. Lejos de imponer limitaciones legales al cultivo de especies en peligro de extinción, el gobierno debe fomentar la propagación y el cultivo por métodos apropiados y legales, para obtener el mayor número de plantas, siendo una de las mejores alternativas el cultivo de tejidos. México debe aprovechar sus recursos y climas óptimos, para colocarse en este mercado, que en el ámbito global es muy grande (Hágsater *et al.*, 2005).

No obstante la conservación fuera del hábitat, debe ser vista como una estrategia complementaria de la conservación *in situ* y debe llevarse a cabo como una última opción cuando no existen posibilidades de permanencia de una especie en su hábitat natural (Hágsater *et al.*, 2005). Una de la especies que pueden conservarse de manera *ex situ*, es *Laelia gouldiana*, que esta considerada como extinta en la naturaleza (SEMARNAT, 2002) y es una de las orquídeas más importantes en la cultura mexicana, debido al uso que ha recibido durante siglos en festividades del día de muertos en Metztitlán, Hidalgo, además que no se conoce mucho sobre su biología y posibles usos etnobotánicos, como en otras especies del género que tienen cualidades farmacéuticas y adhesivas (Téllez, 2003), por lo que *L. gouldiana* debe de conservarse y propagarse.

Conservación de *Laelia gouldiana*

Se ha visto que en los mezquites de las casas de la vega del río de la Barranca de Metztitlán se cultivan tres especies del género *Laelia*: *Laelia anceps*, *L. gouldiana* y *L. speciosa*, conocidas localmente con el nombre de monjitas. *Laelia anceps* y *L. speciosa* se han localizado en forma silvestre en la parte alta de la barranca, en el encinar, pero *L. gouldiana* sólo se conoce por su estado de semicultivo (CONANP, 2003; Hágsater *et al.*, 2005).

Mediante el cultivo convencional fue posible la conservación *ex situ*, de *Laelia gouldiana* por parte de los lugareños de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo, durante siglos, debido al alto valor que se le atribuye a las flores como parte de las festividades de Día de Muertos, además de ser una fuente de ingresos ocasional. Esta es una de las razones por la que todavía se encuentran ejemplares en México y en el extranjero (Soto, 2002; Hágsater *et al.*, 2005).

Actualmente *L. gouldiana* se encuentra catalogada como extinta en la naturaleza (SEMARNAT, 2002). Por lo mismo es necesario establecer estrategias para su conservación. Una de las alternativas, como ya se mencionó, es la conservación *ex situ*, mediante el cultivo *in vitro*, la cual empleó el Dr. Ernesto Aguirre, quien superó las restricciones reproductivas de

la especie para lograr semillas y generó cultivos *in vitro* de plántulas (E. Aguirre, com. pers., 2007). A través del cultivo de tejidos, se han conservado con éxito otras especies de orquídeas como *Euchile mariae* (Suárez, 2006) y *Vanilla planifolia* (Rojas, 2007).

2.3 Cultivo *in vitro*

El Cultivo de Tejidos Vegetales, es una rama de la Biología, que se basa en la totipotencialidad que tienen las células vegetales, para que a partir del cultivo *in vitro* de tejidos, órganos y células vegetales, en medios nutritivos y en forma aséptica, se induzca una respuesta morfogénica o biosintética (Hurtado y Merino, 1987; Razdan, 2003).

La totipotencialidad celular, habla de la capacidad potencial que presentan las células vegetales vivas de regenerar un organismo completo (Thorpe, 1998). Por lo mismo hay que reprogramar o recapitular las secuencias del desarrollo hacia cualquier tejido, órgano o estructura ordenada, lo cual se logra al modificar el ambiente y la nutrición de los explantes vegetales (Hurtado y Merino, 1987). En esta recapitulación del desarrollo se habla del fenómeno de revertir una célula madura al estadio meristemático y formar un tejido indiferenciado o callo, por un proceso denominado desdiferenciación, mientras que la capacidad de las células desdiferenciadas para formar cualquier órgano o planta es denominado rediferenciación (Razdan, 2003).

En el cultivo *in vitro* se ha explorado la capacidad morfogénica de diversas células y tejidos, tales como protoplastos, células, tejidos y órganos. Ha sido posible estudiar procesos como la citodiferenciación, la formación de órganos y/o embriones somáticos (Hurtado y Merino, 1987; Thorpe, 1998). La morfogénesis puede ser estudiada en forma descriptiva, fisiológica, bioquímica o molecular (Thorpe, 1998). Esta capacidad para la formación de órganos, tejidos y embriones regenerados *de novo*, puede ser aprovechada para regenerar nuevas plantas en forma clonal (Thorpe, 1998).

El desarrollo del cultivo de tejidos vegetales, se remonta al descubrimiento de la célula y la teoría celular. A lo largo de este tiempo se realizaron una serie de experimentos que sentaron las bases para desarrollar esta ciencia. Algunos ensayos se realizaron en 1853, cuando Trécul observó la formación de callo en árboles podados, sugiriendo que aparte del cámbium, la médula, floema y xilema inmaduro también contribuían como fuentes para el desarrollo del tejido o el cultivo de tejidos. Wiesner en 1884 (Razdan, 2003), propuso una teoría que sugería la existencia de sustancias que se encuentran en pequeños fragmentos en las plantas que

podrían ser un factor determinante en el potencial de diferenciación hacia órganos. Rechinger en 1893 (Razdan, 2003), colocó fragmentos de diferentes tamaños de brotes, raíces y tallos aislados en una superficie de arena humedecida, observó que fragmentos de 20 mm tenían la capacidad de producir brotes y plántulas. En 1902, G. Haberlandt un botánico alemán, fue el primero en cultivar células aisladas de diferentes tejidos y especies vegetales en un medio nutritivo. En sus cultivos libres de contaminación, las células fueron capaces de sintetizar almidón así como de sobrevivir durante varias semanas, pero no tuvo mucho éxito en inducir división celular. Pese a esto mencionó varios de los requerimientos para que pueda ocurrir la división celular bajo condiciones experimentales, decía que si las células vegetales son totipotentes sería posible modificar su ambiente y nutrición después de aislarlas para recapitular las secuencias del desarrollo (Hurtado y Merino, 1987; Razdan, 2003).

Uno de los grandes avances ocurrió con el cultivo de meristemos, que formalmente comienza en 1946, con Ball que cultivó meristemos de *Nasturtium (Tropaeolium majus)* y obtuvo plantas con raíces. En 1952, Morel y Martin, retomando las ideas de Limaste y Cornuet de 1949, de que los virus no se distribuyen en toda la planta y no se detectan en los meristemos apicales, experimentaron con *Dahlia spp.* y postularon la hipótesis de que podría ser posible obtener plantas libres de virus por cultivo de meristemos apicales aislados. Subsecuentemente confirmaron esta hipótesis con la obtención de cultivos de papa empleando meristemos apicales en 1955 (Thorpe, 1998).

También en 1955, Skoog identificó la 6-furfurilaminopurina, que inducía la proliferación celular y la formación de callo de un gran número de especies vegetales. Después, Skoog y Miller en 1957, usaron combinaciones de auxinas y citocininas, y controlaron con más precisión la formación de brotes y raíces en el cultivo de callos de tabaco (Hurtado y Merino, 1987). Murashige y Skoog, en 1962, desarrollaron un medio nutritivo más activo en el crecimiento que otros medios, que contiene una alta concentración de sales minerales y de nitrógeno en forma de amonio y nitrato, con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En la actualidad es uno de los más usados por el amplio intervalo de especies vegetales que crecen adecuadamente en él (Hurtado y Merino 1987; Razdan, 2003).

George y Sherrington (1984), mencionaron que existen dos vías diferentes para lograr la regeneración de plantas *in vitro*: la organogénesis y la embriogénesis somática. Éstas pueden ocurrir de manera directa a partir del explante inicial o bien indirectamente mediante la formación de callo que es un tejido parenquimatoso, indiferenciado, sin estructura, y

posteriormente se puede diferenciar hacia una estructura organizada (Thorpe, 1998). Ambas vías pueden ocurrir en una misma especie y/o en diferentes partes de una planta, sin embargo es relativamente raro que sucedan ambos fenómenos y usualmente uno u otro modelo de reorganización es el que domina. Se dice que hay una tendencia a que la organogénesis o embriogénesis ocurran según la especie empleada. Los reguladores del crecimiento vegetal juegan un papel muy importante en estos procesos (Thorpe, 1998).

Regeneración vía organogénesis

Es el proceso por el cual las células y tejidos tienen cambios que conducen a la producción de una estructura unipolar, la cual puede ser un primordio de raíz o de brote con el sistema vascular conectado al tejido parental (Thorpe, 1998). Hay sustancias involucradas en el crecimiento vegetal, como los reguladores del crecimiento y otro tipo de compuestos, se han incluido en el medio de cultivo para manipular la organogénesis *in vitro* (Thorpe, 1998), donde un gran número de plantas han respondido a un balance adecuado de auxina/citocinina para formar brotes y raíces. Evans en 1981 (Thorpe, 1998) encontró que el 75 % de las especies vegetales formaban brotes sí se empleaba kin o BA en un rango de concentración de 0.05-46 μM y de 0.06-27 μM para las auxinas AIA y ANA. Se ha reportado que especies de gramíneas requieren concentraciones más bajas de citocinina para la formación de brotes que otras especies. En la formación de raíces las auxinas más empleadas son AIB y ANA. En algunos casos auxinas o citocininas exógenas son suficientes para conducir la organogénesis, donde sólo se requiere citocinina para la formación de brotes (Thorpe, 1998).

Hay situaciones anormales que se han reportado en cuanto al balance de los reguladores del crecimiento. Walter y colaboradores en 1978, encontraron que altos niveles de 2,4-D y bajos de kin resultaban en la formación de brotes a partir de callos de alfalfa, lo cual por lo general favorece la formación de raíz. A veces ésto se debe a la influencia de los niveles de auxina/citocinina endógenos (Thorpe, 1998).

Una variedad de sustitutos de purinas, piridiminas y ureas han sido usados exitosamente en lugar de citocininas para estimular la organogénesis. Similarmente varios compuestos parecidos a auxinas se pueden emplear en lugar de auxinas. Otros reguladores del crecimiento como giberelinas y ácido abscísico se han adicionado al medio de cultivo, mostrando que pueden jugar un papel importante en la organogénesis. Inclusive el uso de antagonista de

auxinas, se han empleado para estimular la organogénesis, ya que alteran los niveles de los reguladores del crecimiento endógenos (Thorpe, 1998; Razdan, 2003) (Tabla 2).

Tabla 2. Especies y condiciones de cultivo *in vitro* para inducir organogénesis.

Especie	Tipo de explante	Medio y Reguladores	Respuesta	Referencia
<i>Cattleya walkeriana</i>	Plántulas	B5 IBA	Brotos vía directa	Krapiec <i>et al.</i> , 2003
<i>Drosera peltata</i>	Ápices de brotes	MS 50 %	Brotos y tubérculos	Kim y Jang, 2004
<i>Alpinia purpurata</i> var. <i>pink</i>	Puntas de rizoma	MS modificado BA	Brotos vía directa	Pastelín-Solano <i>et al.</i> , 2005
<i>Bupleurum kaoi</i>	Segmentos nodales	MS BA	Brotos vía directa	Chen <i>et al.</i> , 2006b
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	Secciones longitudinales de tallo	MS BA y Kin	Brotos vía indirecta	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003
<i>Mormodes tuxtlensis</i>	Protocormos	MS BA	Brotos vía directa	Mata y Salazar, 2009

Cabe señalar que no se pueden hacer generalizaciones de los efectos de los reguladores del crecimiento en la formación de brotes y raíces, estos dependen de más factores como la especie a estudiar, el estado fisiológico, el genotipo y la orientación del explante (Thorpe, 1998; Razdan, 2003).

Regeneración vía embriogénesis somática

En el proceso se produce una estructura bipolar, es decir que contiene ejes tanto radicular como apical, e independencia en el sistema vascular del explante (Thorpe, 1998).

Parece claro que hay dos componentes que juegan un papel crucial en la manipulación de la embriogénesis: auxinas y nitrógeno. Extensos estudios muestran que normalmente la embriogénesis somática ocurre en dos etapas: primero la inducción de células con competencia embriogénica (como masas embriogénicas, proembriones, tejido proembriogénico y estructuras organizadas como segmentos de tallo) en presencia de altas concentraciones de auxinas, y segundo, el desarrollo de estas masas embriogénicas en la ausencia o en la presencia de bajas concentraciones de auxinas (2,4-D la más usada). En un

estudio de las causas de la embriogénesis somática, Evans y colaboradores en 1981 (Thorpe, 1998), encontraron que el medio MS y sus modificaciones fueron usadas en 70 % de los estudios analizados, y el 2,4-D en concentraciones de 0.5-27.6 μM se empleó en 57 % para la inducción de tejido embriogénico. Mientras que el ANA se usa en el 25 % de las veces, otras auxinas han sido menos usadas. En zanahoria y otras especies los reguladores del crecimiento no son requeridos e incluso pueden inhibir la embriogénesis somática (Thorpe, 1998).

Halperin en 1966, fue el primero en reconocer la importancia del nitrógeno en la forma de NH^{+4} en la embriogénesis somática. Wetherell y Dougall en 1976, mostraron que tan sólo 0.1 mM de cloruro de amonio agregado con nitrato, intensificaba significativamente la embriogénesis en zanahoria, siendo óptima con KNO_3 (40 mM) y NH_4Cl (30 mM). Glutamina y alanina, sirven solas como fuente de nitrógeno. También el estrés osmótico puede potenciar la embriogénesis somática, como se ha observado cuando se adicionan altas concentraciones de carbohidratos al medio (Thorpe, 1998). Cabe mencionar que se conocen pocas especies que producen embriones somáticos (Thorpe, 1998). Algunos ejemplos (Tabla 3) son *Daucus carota*, que no requiere reguladores y es regulada por el pH; *Picea abies*; alfalfa con altas concentraciones de 2,4-D; en *Glycine max*, donde se encontró una interacción entre la concentración de auxina y sacarosa en el medio; *Phaseolus vulgaris*, que fue inducida por 2,4-D; además de *Avena*, *Oryza* y *Panicum*. *Triticum aestivum* produce callo embriogénico 3,6 Ácido dicloroanísico (Dicamba) es a menudo efectivo para inducir la formación de callo embriogénico en monocotiledóneas, como en *Dactylis glomerata* (40 μM); *Musa* (90.5 μM), y arroz (4.5-18.1 μM) (Machakova *et al.*, 2008).

Tabla 3. Especies y condiciones de cultivo *in vitro* para inducir embriogénesis.

Especie	Tipo de explante	Medio y Reguladores	Respuesta	Referencia
<i>Eragrostis tef</i>	Semillas	MS 2,4-D	Embriones somáticos vía indirecta	Kebebew <i>et al.</i> , 1998
<i>Cattleya skinneri</i>	Ápices de brotes laterales	MS ANA, Kin y 15 % v/v agua de coco	PLB's vía directa	Alvarado, 2000
<i>Capsicum annum</i>	Hojas	MS BA y 2,4-D	Embriones somáticos vía indirecta	Kintzios <i>et al.</i> , 2001
<i>Mangifera indica</i>	Nucelas de semillas	B5 y MS 2,4-D	Embriones somáticos	Manzanilla, 2004
<i>Cymbidium Melody Fair</i>	Ápices de tallo	MS modificado	PLB's vía directa	Ogasawara <i>et al.</i> , 1995

En el caso de las orquídeas la embriogénesis somática no ha sido bien documentada (Chen *et al.*, 1999), ya que los factores que inducen y controlan este proceso son pobremente entendidos, por la complejidad de los procesos y la falta de buenos sistemas o modelos experimentales. Morel (1974), comentó que los procesos regenerativos asociados a cuerpos vegetativos correspondían a verdaderos embriones somáticos (Vaz *et al.*, 1998). Estos cuerpos vegetativos en la mayoría de los estudios realizados son masas de tejido esférico o nodular, que surgen ya sea de manera directa o indirecta, semejantes a protocormos, por lo que se les ha denominado PLB's por sus siglas en inglés (Protocorm Like Bodies) o cuerpos parecidos a protocormos (Tisserat y Jones, 1999). Incluso varios investigadores han sugerido que la formación de PLB's en cultivos de orquídeas es una manifestación de la embriogénesis somática o que la embriogenesis somática es una etapa temprana a la formación de PLB's (Chen *et al.*, 1999; Suárez, 2006). Pero para definir a estas estructuras como embriones somáticos, es necesario realizar análisis histológicos para corroborarlo. Esto fue realizado por Suárez (2006), en PLB's obtenidos de secciones apicales y basales de protocormos de *Euchile mariae*. Al realizar cortes de tejidos determinó, por la presencia de un suspensor y células en la porción apical en activa división celular, además de grandes cantidades de almidón, así como proteínas y lípidos en menor cantidad, que estas estructuras correspondían a embriones somáticos verdaderos. Esto también ha sido afirmado con previa formación de callo, en cultivos de rizoma de *Cymbidium ensifolium* var *misericors*, donde se formaron cuerpos globulares que correspondían a embriones, en un medio con TDZ y 2,4-D, y en cultivos de

Phalaenopsis spp., donde se regeneraron PLB's en medio suplementado con agua de coco (Chen *et al.*, 1999). Además Chen y cols. (1999), a partir de cultivos de hoja en el híbrido *Oncidium* Gower Ramsey, regeneraron embriones somáticos de manera directa, lo que fue corroborado con análisis histológicos. En este estudio observaron que se formaban primero embriones, los cuales parecían una masa compacta y globular, de coloración blanca, que posteriormente germinaban y después de sucesivas etapas en su desarrollo culminaban en PLB's.

Por estos antecedentes se puede sugerir que la formación de PLB's, corresponde a embriones somáticos y los PLB's diferenciarán en brotes que a su vez formarán plántulas.

Factores que intervienen en el cultivo *in vitro*

Existen varios factores que intervienen en el cultivo *in vitro*, éstos tienen efecto en la organización y desarrollo del tejido cultivado, dentro de los cuales se pueden mencionar la elección del inóculo o explante, la adecuada elección del medio de cultivo, incluidas las sustancias y activadores del crecimiento que se adicionan, y el control en los factores físicos que influyen el medio ambiente *in vitro*, y éstos a su vez tienen más variantes que juegan o desempeñan un papel importante en el cultivo de tejidos vegetales (Thorpe, 1998).

Tipo de explante

El explante es el órgano o segmento de tejido vegetal que presenta células vivas, que va a ser utilizado para iniciar el cultivo (Hurtado y Merino, 1987; Pérez *et al.*, 1999). Este incluye segmentos y ápice de tallo, secciones de raíz, partes de hoja, pecíolo, secciones de inflorescencia, o partes florales, tejido del ovario, partes de semilla como cotiledones, hipocótilos, y embrión de la semilla (Thorpe, 1998). Además en algunas especies se han usado epidermis y células subepidérmicas (Constabel y Shyluk, 1998; Pérez *et al.*, 1999) (Tabla 4).

Tabla 4. Explantes empleados en cultivo *in vitro* de diferentes especies vegetales.

Especie	Tipo de explante	Medio	Respuesta	Referencia
<i>Solanum tuberosum</i>	Discos de tubérculo	White's modificado zeatina y AIA	Brotos	Kikuta y Okazawa, 1984
<i>Astrophytum sp,</i> <i>Cephalocereus sp,</i> <i>Coryphantha sp,</i> <i>Echinocactus sp,</i> <i>Echinofossulocactus sp,</i> <i>Ferocactus sp,</i> <i>Mammillaria sp,</i> <i>Nyctocereus sp</i> y <i>Stenocactus sp</i>	Segmentos de tallo y plántulas	MS BA y ANA	Brotos	Balch <i>et al.</i> , 1998
<i>Prunus domestica</i>	Segmentos de hoja	MS modificado TDZ y 2,4-D	Brotos vía indirecta	Nowak <i>et al.</i> , 2004
<i>Aloe barbadensis</i>	Ápices de tallo	MS BA y ANA	Brotos	Baksha <i>et al.</i> , 2005
<i>Ricinus communis</i>	Eje de embriones y ápices de tallo	MS Adenina, BA, Kin, TDZ y zeatina	Brotos	Sujatha y Reddy, 1998
<i>Picea sitchensis</i>	Cotiledones	MS BA	Brotos	Drake <i>et al.</i> , 1997
<i>Sinningia speciosa</i>	Segmentos de sépalos	MS modificado GA ₃ y BA	Formación de cuerpos florales y cuerpos vegetativos	Pang <i>et al.</i> , 2006
<i>Mangifera indica</i>	Nucelas de semillas	B5 y MS 2,4-D	Embriones somáticos	Manzanilla, 2004

La elección del tipo de explante depende de los objetivos en el cultivo de tejidos, es decir, si se quiere tener una rápida propagación clonal, producción de callo o producción de cultivos en suspensión (Arditti y Ernst, 1993). Además del tipo de explante que se elija también intervienen otros factores en torno a éste, tales como la fisiología y edad del órgano, la temporada del año en la cual se colectó el explante, la edad de la planta y el genotipo (Thorpe, 1998). También hay que tomar en cuenta que no todas las plantas responden de la misma manera, incluso dentro de la misma familia, unas especies responden al cultivo *in vitro* más activamente que otras (Constabel y Shyluk, 1998). Cabe recalcar que el tipo de explante que se elija será determinante en la obtención de la respuesta deseada, ya que cada uno de ellos responderá de manera diferente al cultivo (Hurtado y Merino, 1987; Thorpe, 1998; Pérez *et al.*, 1999). Por otra parte se ha visto que entre más grande sea el explante mayor la posibilidad

de sobrevivir y de menor tamaño tiene una mayor capacidad de regeneración, pero de igual forma, esto depende de cada especie (Thorpe, 1998).

En cuanto a los requerimientos de reguladores del crecimiento, se ha observado que depende en parte de cada familia. Lo que se recomienda para la proliferación son concentraciones elevadas de citocininas y las auxinas en bajas concentraciones, además de ser necesarias para la elongación de los brotes y en la etapa de enraizamiento de brotes. El medio de cultivo también puede estar libre de hormonas o adicionada con otros compuestos, como los extractos naturales (Arditti y Ernst, 1993; Thorpe, 1998).

Los explantes más empleados en el cultivo *in vitro* son los que presentan zonas meristemáticas, los cuales se caracterizan por un dominio de células totipotentes, como los meristemos apicales de tallo y raíz, en donde se concentra una gran actividad de varios programas del desarrollo en la vida de una planta, como la formación de primordios de hoja en el caso del meristemo apical de tallo. Los meristemos apicales en etapas tempranas del desarrollo y con activo crecimiento, son considerados los explantes más apropiados para iniciar los cultivos *in vitro*. Las zonas meristemáticas también se encuentran en otras partes del tallo como los meristemos laterales y nudos (Hurtado y Merino, 1987). En plantas ornamentales y en algunos cultivos de hortalizas se prefiere iniciar el cultivo *in vitro* a partir de meristemos laterales. En la práctica el cultivo de meristemos se usa para obtener plantas libres de virus o de otros patógenos (Thorpe, 1998).

Los ápices de tallo son más comúnmente usados para una rápida propagación masiva *in vitro* (micropropagación), distinguiéndose de los meristemos apicales por la talla de los explantes, siendo estos últimos de entre 0.1 y 0.5 mm, mientras que los ápices de brotes de 1 a 10 mm, pero estas dimensiones dependen del tipo de cultivo y los propósitos de la investigación.

Secciones de raíz se han utilizado en el cultivo, a pesar de que no es común la producción de callo o brotes adventicios (Arditti y Ernst, 1993), debido a la limitada competencia morfogénica para formar cuerpos vegetativos como brotes o PLB's, lo cual se debe a que las células que conforman el ápice de raíz, son altamente determinadas y diferenciadas hacia una vía del desarrollo (Vaz *et al.*, 1998), por lo que la conversión del meristemo de raíz hacia meristemo de brote es poco frecuente (Peres y Kerbauy, 1999). Sin embargo la regeneración de cuerpos vegetativos si se ha descrito en pocas especies de orquídeas como *Catasetum fimbriatum* (Peres y Kerbauy, 1999), *Vanilla planifolia* (Philip y Nainar, 1988) e híbridos de *Phalaenopsis* como *Doritaenopsis* (Park *et al.*, 2003); observándose cambios dramáticos en la

bioquímica y fisiología de este órgano después de la disección del tejido, propiciados por factores ambientales, nutricionales y hormonales (Vaz *et al.*, 1998). Entre los que destaca la fuente de carbohidratos, que se ha visto que afecta la diferenciación celular y el ciclo celular, actuando a nivel de expresión génica (Vaz *et al.*, 1998), mientras que hormonalmente es fuertemente promovida por los niveles exógenos de citocinina, en combinación con AIA, y etileno, que aumentan la conversión del meristemo de raíz (Peres y Kerbauy, 1999). Por lo anterior el cultivo de raíz puede ser útil en la micropropagación (Arditti y Ernst, 1993).

En cuanto al cultivo de hoja se han empleado varias partes de la hoja, como el extremo superior o punta de la hoja, el pecíolo, la base de la hoja, el parénquima, y todo esto en una gran variedad de medios de cultivo como el MS (Murashige y Skoog, 1962), el KC (Knudson, 1946), el medio Heller o H, y un medio denominado M, diseñado para el cultivo de ápices de brotes de *Cymbidium* y *Cattleya* (Ball *et al.*, 1971), produciéndose en la mayoría de los casos callo o PLB's de manera directa, principalmente en la parte superior de la hoja y en la base; el resultado difiere con la especie bajo estudio (Churchill *et al.*, 1973).

En la actualidad el cultivo de hojas o secciones de láminas foliares principalmente es utilizado para micropropagar orquídeas monopódicas como *Phalaenopsis* y *Vanda* (Flachsland *et al.*, 2001), pero también se han propagado otras especies de orquídeas como *Acampe praemorsa*, desarrollándose brotes en la base de la hojas (Nayak *et al.*, 1997) y *Aerides maculosum*, con la formación de PLB's en hojas inmaduras (Murthy y Pyati, 2001), sin embargo la regeneración de plantas a través de embriogénesis somática casi no ha sido documentada, reportándose en la especie *Phalaenopsis amabilis* (Chen y Chang, 2006) y en el híbrido *Oncidium Gower Ramsey* (Chen *et al.*, 1999), en ambos casos se formaron grupos de embriones somáticos que surgieron a partir de células epidérmicas sin mediación de callo. Sin embargo todavía no se conocen por completo los procesos que regulan el cultivo de hojas, ya que son necesarios más estudios con un mayor número de especies, para entenderlos y conocer las necesidades específicas de cada especie.

Tanto el cultivo de secciones o partes de hoja y raíz, son métodos que se persiguen y emplean actualmente para evitar dañar y sacrificar a la planta completa y que de esta manera pueda seguir con vida (Churchill *et al.*, 1973; Arditti, 1977).

Reguladores de crecimiento vegetal

Son definidos como compuestos orgánicos, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Hurtado y Merino, 1987; Borkowska, 2003). La acción del regulador en la planta depende no solamente de su concentración en los tejidos, sino también de la sensibilidad de los tejidos al regulador, que a su vez depende del tipo de célula y su estado fisiológico (Jankiewicz, 2003). Estos participan de forma muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas, participando como mensajeros. La mayoría ejerce su acción en lugares distintos donde fueron sintetizados, en algunos casos son activos en el lugar de síntesis (Hurtado y Merino, 1987; Borkowska, 2003). Dentro de los grupos de reguladores que estimulan el crecimiento, encontramos las auxinas, citocininas y giberelinas, y en los que inhiben el crecimiento está el ácido abscísico (Razdan, 2003).

Auxinas

Auxina proviene del griego *auxein*, que significa crecer; se descubrió en el ápice del coleóptilo de avena. Se deriva comúnmente del triptófano y se sintetiza principalmente en partes jóvenes de plantas como en meristemas apicales, frutos inmaduros y hojas en desarrollo. Se translocan hacia abajo (transporte basipétalo). Las auxinas estimulan el crecimiento, el alargamiento y la división de las células, la formación de brotes, raíces, raíces adventicias y callo, la respiración, la abscisión, la dominancia apical y el desarrollo de frutos (Jankiewicz, 2003; Tinoco, 2006).

Otra propiedad de las auxinas es que el tejido donde se encuentra en concentraciones elevadas, se convierte en un punto de atracción de nutrientes, así como de otras hormonas. Se ha visto que la adición de auxina provoca el aumento de la producción de etileno (Jankiewicz, 2003).

Las auxinas naturales son el AIA y el AIB. También hay auxinas sintéticas como el ANA y el 2,4-D. Tanto las auxinas naturales como las sintéticas son empleadas en el cultivo de tejidos, pero las sintéticas se usan más por su relativa estabilidad de resistir la esterilización por autoclave (Tinoco, 2006).

Las concentraciones en las que se emplean dependen de la especie y el tipo de explante que se estudie, ya que los efectos de las auxinas difieren en cada caso tanto cuantitativa como cualitativamente, además de que las auxinas sintéticas son generalmente más estables ya que sufren menos degradación enzimática, y sus efectos permanecen por más tiempo por lo que se puede adicionar menores concentraciones de las auxinas sintéticas (Arditti y Ernst, 1993). Esto

se ha visto en *Cymbidium*, donde a concentraciones de 10 $\mu\text{M/L}$ de AIA se tenía una producción vigorosa de PLB's, pero cuando se adicionó 2,4-D en lugar de AIA, sólo se requería 1 $\mu\text{M/L}$, pero los PLB's fueron anormales. La adición de ANA 1.25 ppm se ha visto que promueve la formación de raíces como en *Vanda* (Arditti y Ernst, 1993).

Por otro lado se ha observado que la adición de auxina o citocinina a medio MS modificado, produce PLB's a partir de explante de raíz en *Phalaenopsis*. También en esta especie se formaron brotes a partir de la adición de 2 ppm de ANA en medio Knudson C. Con AIA, ANA ó 2,4-D se incrementó la longitud inicial de brotes en *Phalaenopsis* a partir de segmentos nodales de inflorescencia, pero al final inhibió su desarrollo. El empleo de 2,4-D debe de ser cuidadoso, ya que puede causar mutaciones (Arditti y Ernst, 1993).

Citocininas

Las citocininas son derivados de la adenina con distintos sustitutos adheridos al N6 de la adenina y dependiendo de cual es el sustituto, se clasifican en citocininas isoprenoides o aromáticas; las principales formas conjugadas son: nucleósidos (ribósidos), nucleótidos (ribótidos), glucósidos, alanilderivados y metiltioderivados (Mok y Mok, 2001). Están implicadas en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, incluyendo división celular, iniciación de la brotación y crecimiento, diferenciación celular y senescencia de hojas (Kieber, 2002; Kakimoto, 2003).

Se sintetizan mayormente en ápices de raíz, pero también se puede sintetizar en el cámbium, ápice de tallos y semillas inmaduras, además en estos sitios es donde son más abundantes en la planta. Factores ambientales afectan los niveles de los nutrientes minerales, especialmente el nitrógeno, además de que decrecen sus niveles por estrés hídrico (Kakimoto, 2003).

Por 1950, Skoog y millar, encontraron que el ADN de esperma de arenque, era un potente activador para la proliferación del cultivo de células de médula de tabaco. Ellos identificaron el componente activo que era un derivado de la adenina, 6-furfurilaminopurina y lo nombraron Kin. La zeatina, fue identificada después como la primera citocinina natural, encontrada en endospermo inmaduro de maíz y descubrieron que era más abundante en el endospermo líquido de coco (Kieber, 2002).

La Kin y BA son las citocininas mejor conocidas (Arditti y Ernst, 1993; Kakimoto, 2003). También, existen dos derivados de la fenilurea, la 1,3-difenilurea y el tidiazurón o TDZ, que ejercen efectos análogos a la Kin. Actualmente la fenilurea más utilizada es el tidiazurón, ya

que promueve el desarrollo de yemas axilares o la diferenciación de yemas adventicias en cultivos *in vitro* (Tinoco, 2006).

En orquídeas se ha visto que la Kin muestra efecto inhibitorio en el crecimiento de raíces, pero estimula los brotes, esto se ha visto en *Cymbidium*. Mientras que concentraciones de 1 a 4 ppm de Kin incrementa la formación de PLB's. El desarrollo de brotes a partir de segmentos nodales de inflorescencia de *Phalaenopsis*, fue óptimo en el medio KC suplementado con 1 a 3 ppm de BA. Múltiples plántulas de *Phalaenopsis* fueron propagadas a partir de nudos de la inflorescencia con niveles de BA de 25 a 125 ppm en cultivos *in vitro*; las plántulas se pasaron a medio libre de fitohormonas adicionado con extracto de plátano para el desarrollo de raíces. Mientras que con la adición de 1 a 5 ppm de BA al medio en explantes de hoja de *Phalaenopsis* se obtuvieron PLB's (Arditti y Ernst, 1993).

Interacción Auxinas/Citocininas

La interacción de auxinas y citocininas, controla procesos en las plantas como la dominancia apical y el desarrollo de brotes y raíces (Coenen y Lomax, 1997; Nordström *et al.*, 2004). Al lograr un balance adecuado entre ellas, es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación (Borkowska, 2003).

Skoog y colaboradores en 1957, concluyeron que la formación de órganos era resultado de cuantitativas interacciones entre reguladores del crecimiento, en particular auxinas y citocininas y otros metabolitos (Thorpe, 1998). Además Skoog y Miller, demostraron que el balance adecuado entre ambos reguladores del crecimiento coordina la organogénesis *in vitro*, ya que la exposición a altas concentraciones de auxina/citocinina promueve en cultivos de callo en tabaco, la formación de raíces y a bajas concentraciones, el desarrollo de brotes (Nordström *et al.*, 2004).

Se ha observado que la interacción entre auxinas y citocininas puede tener efectos sinérgicos o antagonistas, por lo que el modo como interaccionen depende de la especie y el tejido que se emplee. Pueden regular sinérgicamente la división celular en células de callo y protoplastos en *Arabidopsis thaliana* y antagonistamente durante la formación de primordios laterales de raíz. Otra de las investigaciones realizadas donde se registraron efectos antagonistas fue al remover o decapitar el meristemo apical, lo que conduce a un gran incremento en los niveles de citocininas. Este incremento puede ser reducido mediante la aplicación de ANA exógeno en la parte donde se realizó la decapitación. Pero estudios indican que en cultivos *in vitro* donde hay

proliferación celular, al adicionar sólo uno de los reguladores del crecimiento en cultivos de protoplastos en *Arabidopsis thaliana*, ya no hay división celular (Coenen y Lomax, 1997).

De acuerdo con George y Sherrington (1984), altas concentraciones de auxinas y bajas de citocininas promueven la formación de raíces, mientras que altas concentraciones de citocininas y bajas de auxinas promueven la proliferación de yemas axilares. Esto puede ser porque las citocininas estimulan el transporte de auxina del tallo a los brotes laterales estimulando su desarrollo (Jankiewicz, 2003). Pero hay que tener presente, que ésto sólo se sugiere, no indica que siempre ocurra ya que depende de otros factores como la especie, el tipo de explante, proporción de los reguladores del crecimiento y otros metabolitos (Thorpe, 1998). En orquídeas se ha observado que requieren de auxinas y/o citocininas para el crecimiento, formación de callo o PLB's, proliferación y desarrollo de plántulas. Sin embargo que no todas requieren la adición de reguladores del crecimiento, como en *Cymbidium*, donde se observó que no eran requeridas. Por ésto muchos medios no contienen reguladores del crecimiento o sólo están adicionados con citocinina (Arditti y Ernst, 1993).

La adición de 0.5 a 3.0 ppm de ANA en combinación con 2 ppm de BA induce la formación de PLB's en secciones basales de hoja en *Phalaenopsis* y brotes a partir de segmentos nodales de inflorescencia. Sin embargo cuando Kin se ha usado en combinación con ANA en cultivos en *Vanda*, cada hormona ha contrarrestado los efectos de la otra (Arditti y Ernst, 1993).

Etileno

Es un hidrocarburo gaseoso de doble enlace, que tiene profundos efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Wang *et al.*, 2002; Schaller y Kieber, 2002). Está involucrado en varios aspectos del ciclo de vida de las plantas, como la germinación, desarrollo de raíces, nódulos radicales, senescencia floral, abscisión y maduración de frutos. La producción del etileno está firmemente regulada por señales internas durante el desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales bióticos, como el ataque de patógenos y abióticos, como estrés, heridas, hipoxia, ozono o heladas (Wang *et al.*, 2002).

La biosíntesis del etileno parte del aminoácido metionina, el cual se convierte a S-adenilmetionina (AdoMet). Incluso cerca del 80 % de la metionina celular es convertida a AdoMet (Wang *et al.*, 2002; Schaller y Kieber, 2002). Éste sirve como intermediario en numerosas vías de biosíntesis incluyendo la producción de poliaminas y es el mayor donador de metil en plantas (Wang *et al.*, 2002). Después la ACCsintetasa convierte AdoMet a ACC. Por último la

conversión de ACC a etileno es catalizada por ACCoxidasa (Schaller y Kieber, 2002). Casi todos los tejidos vegetales tienen la capacidad de producir etileno, siendo varios los factores que pueden modular su biosíntesis. En *Arabidopsis*, estos factores incluyen auxinas, citocininas, brasinoesteroides, ozono, etileno, cobre, patógenos, heladas y estímulos mecánicos (Schaller y Kieber, 2002).

La acción del etileno en la respuesta morfogénica en cultivos *in vitro*, es muy variada, depende de la especie que se esté analizando, las condiciones de luz y oscuridad, y en general, puede estimular la producción de brotes o inhibirla (Radice, 1998). En el cultivo de capas delgadas de internodos de *Nicotiana tabacum*, se observó que al adicionar 0.5 μM de AVG, un inhibidor de la biosíntesis del etileno, provocaba un pronunciado incremento en la formación de meristemas y la aparición de cuerpos vegetativos anormales. Mientras que 1 y 10 mM de CEPA, un promotor del etileno, aceleraba la emergencia de los cuerpos vegetativos (Biondi *et al.*, 1998). La cantidad de etileno producida *in vitro* varía con la especie, el tipo de explante, la concentración de auxinas y citocininas en el medio de cultivo, el tipo de agar seleccionado y la luz. Utilizando concentraciones de etileno de 0.1 $\mu\text{M/L}$, promueven respuestas morfogénicas, mientras que con 25 $\mu\text{M/L}$ de etileno en presencia de AIA en hojas de *Nicotiana tabacum*, se intensifica la pérdida de clorofila e inhibe en un 90 % la conversión de metionina a etileno, lo que se ha sugerido como autoinhibición en la producción de etileno (Aharoni *et al.*, 1979). En muchos casos, el etileno actúa como promotor de la morfogénesis, pero también es inhibitorio del crecimiento de los órganos diferenciados (Radice, 1998). Muchas veces el etileno se ve como un contaminante no deseado y por consiguiente las investigaciones en etileno y cultivo *in vitro*, se han centrado en entender, cómo la acumulación del etileno podría afectar la regeneración, y cómo se podría controlar su influencia en los cultivos (Biddington, 1992).

Los efectos inhibidores del etileno pueden prevenirse desde su biosíntesis o eliminándolo de la atmósfera del medio por ventilación o utilizando químicos como el perclorato de mercurio o permanganato de potasio (Biddington, 1992).

Complejos naturales

Los complejos o extractos naturales, representan un grupo de constituyentes en los cuales su composición es variable o se desconoce su naturaleza. Estos incluyen hidrolizados de proteínas, endospermos líquidos, pulpa o jugo de frutas y productos derivados de animales (Thorpe, 1998).

Se han usado muchas preparaciones de composición indefinida para enriquecer los medios de cultivo; frecuentemente se han empleado como una alternativa después de que todos los ingredientes definidos del medio han fallado en el establecimiento de cultivos de células y órganos (Hurtado y Merino, 1987).

Debido a su composición rica en nutrientes, aminoácidos, reguladores del crecimiento, el uso de extractos naturales ha sido muy exitoso, tal como lo reportó Arditti, para el extracto de plátano. Menciona que contiene citocininas, auxinas, giberelinas, biotina, minerales y aminoácidos que promueven el crecimiento de raíces (Withner y Krieger, 1985; Padrón, 2006). La forma y concentración en que se emplean algunos complejos naturales se indica en la Tabla 5.

Uno de los extractos naturales más extensamente utilizados es el endospermo líquido o agua de coco, ya que como mencionan Earle en 1965, contienen las cinco clases de compuestos esenciales para un crecimiento y organogénesis que requieren la mayoría de plantas, estos son: sales inorgánicas tanto macro como micro nutrientes, fuente energética de carbón, vitaminas, nitrógeno y reguladores del crecimiento (Thorpe, 1998). El agua de coco se emplea con una dilución que va del 2-15% v/v ó de 20-150 ml/L (Pierik, 1990; Thorpe, 1998). Hay que tener en cuenta que la efectividad del endospermo de coco, varía con la edad del fruto (Hurtado y Merino, 1987). Algunos de los compuestos aislados del agua de coco son la 1,3-difenilurea, la cual tiene actividad de citocinina (Arditti y Ernst, 1993); también el 9- β -D-ribofuranosilzeatina (citocinina), y zeatina, así como su ribósido (Pierik, 1990; Arditti y Ernst, 1993). Pero como es el caso de muchos complejos naturales, la actividad del agua de coco depende de varios factores, entre ellos la madurez del coco, estación del año en que fue cosechado, la procedencia, y la manera en que se esterilice (por autoclave o filtración). El uso del endospermo líquido de cocos inmaduros no se ha reportado en la mayoría de los trabajos (Arditti y Ernst, 1993).

Tabla 5. Complejos naturales más utilizados para el cultivo *in vitro* de orquídeas.

Especie	Complejo Natural	Concentración	Respuesta	Referencia
<i>Cattleya skinneri</i> var. <i>bateman</i> , <i>C skinneri</i> var. <i>alba</i> y <i>C. aurantiaca</i>	Jugo de tomate; Extracto de yuca; Germen de trigo	40 % v/v 250 g/L 100 g/L	Germinación de semillas, brotes	Elizondo, 2000.
<i>Phalaenopsis</i> sp.	Homogenizado de papa	3 % w/v	Formación de plántulas y PLB's a partir de PLB's	Park <i>et al.</i> , 2002
<i>Catasetum fimbriatum</i>	Pulpa de plátano	60 g/L	Brotes a partir de ápice de raíz	Vaz <i>et al.</i> , 1998
<i>Cypripedium calceolus</i>	Pulpa de plátano	50 g/L	Explantos muertos	Pindel y Pindel, 2004.
<i>Vanda teres</i>	Hidrolizado de peptona Hidrolizado de caseína	2 g/L 100 mg/L	Brotes vía directa	Sinha y Roy, 2004.
<i>Cymbidium</i> sp.	Endospermo de coco	10 a 20 % v/v	Formación de PLB's vía directa	Teixeria <i>et al.</i> , 2006

En orquídeas el uso de endospermo líquido de coco se ha extendido y principalmente para cultivos de germinación *in vitro* de semillas de varias especies (Withner y Krieger, 1985; Arditti y Ernst, 1993; Padrón, 2006). Hegarty en 1955 (Arditti y Ernst, 1993) germinó semillas de *Paphiopedilum* y *Vanilla*, notando efectos estimulantes mediante la adición de 10 % de agua de coco y 3 ppm de AIB. Ernst en 1967, observó una proliferación sustancial de brotes de *Phalaenopsis* en medio Knudson C modificado adicionado con 15 % de agua de coco, en comparación con otros extractos naturales como extracto de plátano y papa.

También en la germinación de orquídeas como *Phalaenopsis*, *Cymbidium*, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* y otras, se han empleado los extractos de plátano, tomate, pera, jugo de piña, miel, así como peptona y la enzima pepsina (Withner y Krieger, 1985; Arditti y Ernst, 1993; Padrón, 2006). El agua de coco fue usada por primera vez de manera exitosa para cultivos de tejidos de orquídeas a partir de ápices de brotes de *Phalaenopsis* por Intuwong y Sagawa en 1974. Después en medio líquido VW modificado con 20 % de agua de coco, sirvió para la proliferación de PLB's a partir de tejido de hojas de *Phalaenopsis*. Haas-Schmude en 1983, usó agua de coco en grandes proporciones (53 %) en medio basal MS. para la proliferación de PLB's de *Phalaenopsis*. Posteriormente eran diferenciados en un medio con los nutrientes reducidos y adicionado con 20 % de agua de coco (Arditti y Ernst, 1993).

Otro de los complejos naturales más empleados es el hidrolizado de caseína, el cual se reporta que se añade a una concentración de 0.1-0.5 g/L. Es ampliamente recomendado por ser una fuente rica en nitrógeno (Pierik, 1990).

Atmósfera *in vitro* y el tipo de recipiente empleado

La atmósfera *in vitro* o el sistema gaseoso es un factor determinante en los procesos morfogénicos y está condicionada por el tipo y tamaño de recipiente o envase seleccionado así como también el sistema de cobertura del mismo. En condiciones *in vivo* la atmósfera contiene 78 % de nitrógeno; 21 % de oxígeno (O₂) y 0.035 % de dióxido de carbono (CO₂). En cultivos *in vitro* se ha visto que contiene oxígeno, dióxido de carbono, etanol, acetaldehído y otros compuestos hidrocarbonados (Thorpe, 1998; Radice, 1998).

El etileno es producido por los tejidos o explantes y es un regulador del crecimiento que presenta diferentes efectos morfogénicos, puede estimular o inhibir la organización del desarrollo. Algunos de los factores que propician la biosíntesis del etileno, son el agente gelificante, la auxina y citocinina empleadas, el tipo de envase, cómo se selló el envase, la especie, el explante usados y la luz (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994; Thorpe, 1998; Radice, 1998). El nivel de oxígeno disponible para el explante, condiciona el crecimiento y los procesos morfogénicos. En general se necesita una buena aireación para obtener cualquier tipo de proceso morfogénico. En cultivos de anteras de tabaco, se ha visto que cuando hay una tensión de oxígeno del 5 %, se estimula la producción de brotes (Radice, 1998). La concentración de dióxido de carbono en la atmósfera gaseosa *in vitro* varía según la respiración y la actividad fotosintética de las plantas. En condiciones de oscuridad el dióxido de carbono se incrementa mientras que en condiciones de luz disminuye. En trabajos realizados con *Ficus lyrata* se han encontrado concentraciones variables que van del 0.5 al 8.5%, según el tipo de sello o tapa empleados. Estas concentraciones superiores a 1%, generalmente tóxicas para las condiciones *in vivo*, probablemente no son limitantes para la actividad fotosintética (Radice, 1998). Las interacciones entre C₂H₄, CO₂ y O₂ se han observado en cultivos de tejidos (Thorpe, 1998).

Como se mencionó la atmósfera *in vitro* está condicionada por el envase, la tapa y la forma de sellar. Las tapas usadas en cultivo *in vitro* varían desde el tapón de algodón, papel de aluminio, película de resinite transparente o tapas rígidas de polipropileno (Radice, 1998). El intercambio gaseoso es diferente para cada tipo de tapa; en consecuencia, la atmósfera interna

también sufrirá variaciones. Esto fue observado por Takejiro y cols. (2006), en la formación de brotes de *Solanum melongena* y *S. integrifolium*, donde compararon un envase con una membrana permeable para filtrar gas y un envase sellado; el efecto que observaron fue que en los envases con membrana permeable para filtrar gas, se redujo el porcentaje de brotes vitrificados y la tasa de supervivencia al momento de aclimatización era mayor en comparación con los brotes cultivados en el envase sellado. Esto nos indica que hay variaciones en la atmósfera *in vitro*, dependiendo del intercambio gaseoso que permita el sistema de cobertura o tipo de tapa empleado, lo cual influye en la respuesta morfogénica o en la manera como respondan los regenerantes formados.

En relación al estudio del tipo y tamaño de envase utilizado en la siembra *in vitro*, los trabajos realizados son escasos. No obstante éste es un parámetro físico que tiene influencia en la proliferación, tal como lo reportó Monette (1983), en cultivos de *Vitis vinifera* en medio líquido, donde ensayó tres envases de diferentes volúmenes: frasco Erlenmeyer de 125 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL y “mason jar” de 473 mL, obteniendo incrementos significativos en la proliferación y longitud de brotes, cuando se cultivó en “mason jar”, seguido del frasco Erlenmeyer de 250 mL y por último el de 125 mL. Islam y cols. (2005), ensayaron cuatro envases diferentes de cultivo para el cultivo de ápices de tallo de *Mentha* spp.: frasco de vidrio industrial, envase magenta, frasco Erlenmeyer y tubo de cultivo, con uno y dos explantes. El envase magenta fue el que mostró un mejor desempeño, registrando la formación más alta de hojas. De igual forma que al emplear tapas de diferentes materiales que permiten distintas coberturas e intercambios gaseosos, el tamaño y tipo de envase influyen en el resultado del cultivo. Además es necesario tomar en cuenta el tamaño y la forma del envase de cultivo para tener una producción en anaqueles más eficiente y consecuentemente los costos de la producción (Kane y Philman, 1992).

Aclimatización de plantas propagadas *in vitro* a condiciones *ex vitro*

La aclimatización es un proceso por el que los organismos van a sufrir una serie de modificaciones y cambios en su estructura o función fisiológica que les permitan sobrevivir mejor en las condiciones ambientales, es un proceso además regulado por el hombre (De la Cruz, 2006).

Las plántulas provenientes de cultivo *in vitro* presentan una morfología anormal, anatomía y fisiología, ya que las condiciones bajo las que crecieron son especiales, es decir, envases muy

bien cerrados para evitar la entrada de patógenos, existe un limitado intercambio gaseoso, hay una alta humedad en la atmósfera *in vitro*, una baja radiación con respecto a los cultivos convencionales y producción de etileno (Pospíšilová *et al.*, 1999; Kadlecek *et al.*, 2001; Hazarika, 2003). Además la adición de una fuente de carbono hace que disminuya el potencial hídrico de la planta y al agregar reguladores del crecimiento puede ocasionar algunas anormalidades en las plántulas (Pospíšilová *et al.*, 1999).

En la transferencia de *in vitro* a *ex vitro* las plántulas tendrán que corregir estas anormalidades mencionadas. Por lo general este proceso se realiza en un invernadero, donde se presentan condiciones de mayor radiación luminosa a las de *in vitro* y principalmente menor humedad, lo que es estresante para las plantas (Pospíšilová *et al.*, 1999; Kadlecek *et al.*, 2001; Hazarika, 2003). Por esto hay que tener cuidado en la pérdida de agua por las hojas y hay que considerar que el suministro de agua también puede ser limitado porque hay poca conductividad hidráulica de las raíces y raíz-tallo. Estos son los principales motivos por los que muchas plántulas mueren en este período. Las plántulas que están en condiciones *ex vitro* necesitan algunas semanas de aclimatización disminuyendo gradualmente la humedad atmosférica (Pospíšilová *et al.*, 1999). Uno de los procesos de aclimatización más empleados es el descenso gradual de la humedad relativa, el cual permite a las plantas desarrollar mecanismos de protección a las nuevas condiciones ambientales, ya que los problemas principalmente están relacionados con las variaciones de humedad (De la Cruz, 2006). Aún así en muchos casos las hojas formadas *in vitro* son incapaces de desarrollarse bajo condiciones *ex vitro* y son reemplazadas por nuevas hojas (Pospíšilová *et al.*, 1999).

Lo que se ha observado en la práctica, es que después de transferir las plántulas *in vitro* al invernadero, hay cambios substanciales en la morfología y anatomía de la hoja, sobre todo en la epidermis, el grosor de la hoja, diferenciación del mesófilo y el número y estructura de cloroplastos (Pospíšilová *et al.*, 1999).

El desarrollo tardío de cutícula, ceras epidérmicas y un aparato estomático no funcional es causa de altas tasas de transpiración en la cutícula y estomas en las hojas que ya están fuera de los cultivos *in vitro*. Pero durante la aclimatización, las tasas de transpiración disminuyen porque la regulación de la pérdida de agua por los estomas es más eficaz, gracias al desarrollo de la cutícula y las ceras epidérmicas. Los contenidos en clorofila *a* y *b* incrementan después del trasplante, pero de forma gradual. En *Nicotiana tabacum* se encontró que durante la primera semana de aclimatización decrece la clorofila *a* y *b*, además del contenido de

carotenos e incrementa la proporción de los pigmentos xantofilas (Pospíšilová *et al.*, 1999; Kadlecek *et al.*, 2001).

En la aclimatización de orquídeas, al igual que en otras plantas es muy importante evitar la pérdida de humedad. Para evitarla Chávez (2008) reportó, para *Stanhopea tigrina*, que con charolas de plástico transparente y una mezcla de peat-moss y agrolita (3:1) las plantas se adaptaban y desarrollaban favorablemente a las condiciones *ex vitro*. Otros trabajos reportan que la mezcla de peat-moss y agrolita es adecuada por su fácil manejo, buen drenaje, aireación y buena retención de humedad, además de que incrementa la supervivencia y disminuye la pérdida de hojas, raíces e incrementa su longitud (De la Cruz, 2006; Sierra, 2006). Esto se debe a que el peat-moss (*Sphagnum*), es un sustrato que mejora el crecimiento de las raíces y pseudobulbos, es muy ligero, permite la aireación de las raíces, y junto con las charolas de plástico retienen en gran parte la humedad, evitando que se pierda. También se observó durante la aclimatización, la pérdida de algunas hojas provenientes del cultivo *in vitro*, así como el surgimiento de nuevas hojas más vigorosas (Pospíšilová *et al.*, 1999) y en algunas plantas se observó la formación de nuevos pseudobulbos (Chávez, 2008).

Con respecto a la talla de las plantas, se considera que para iniciar su aclimatización, ésta varía según la especie, pero se ha reportado desde 5 cm a 8 cm, ya que tamaños menores disminuyen las posibilidades de éxito en la aclimatización (De la Cruz, 2006). En *Euchile mariae* se aclimatizaron plantas después de 9 meses de cultivo *in vitro*, con una altura \bar{X} de 4-6 cm, hojas (4-5 cm), raíces (5-6 cm) y un pseudobulbo (1 cm), logrando establecerse en condiciones *ex vitro* con 100 % de supervivencia. Este porcentaje de supervivencia fue evaluado después de 35 días (Suárez, 2006).

Cultivo *in vitro* de orquídeas

Las orquídeas son de las primeras plantas que fueron propagadas por métodos asépticos, sin embargo, desde el principio los investigadores han tenido varios problemas en su cultivo (Arditti, 1977).

Los primeros intentos por cultivar orquídeas, se realizaron de 1852 hasta casi 1909, al dispersar las semillas alrededor de la base de una planta madre, con pocos resultados. Posteriormente cuando Bernard descubrió que las semillas necesitaban ser infectadas por un hongo para germinar, se realizaron cultivos en tubos donde se inoculaban las semillas de orquídea con el hongo, pero fueron poco fiables o productivos. No fue sino hasta 1921 que la

propagación e hibridización de las orquídeas tuvo una revolución con el descubrimiento de un método de germinación asimbiótica relativamente sencillo propuesto por Knudson, este método consiste en utilizar un medio que contiene azúcar. Knudson fue el primero en proponer y obtener una germinación de semillas de orquídea mediante el método asimbiótico y demostró que en la nutrición de éstas influyen varios azúcares especialmente sobre el desarrollo, ya que son parte del estímulo disparador de las respuestas morfogénicas para la germinación en condiciones naturales y también *in vitro* (Arditti, 1977; Pierik, 1990). En 1922, logró por primera vez la germinación asimbiótica de hasta el 100% de semillas del híbrido *Laeliocattleya*, con la utilización de glucosa y fructosa en un medio nutritivo con sales minerales y extractos orgánicos (Pierik, 1990).

Otro avance importante se obtuvo en 1960, cuando Morel empleó los conocimientos para producir plantas libres de virus, como una eficiente y rápida herramienta para una multiplicación clonal. Lo cual lo logró al inducir una formación múltiple de PLB's de *Cymbidium* a partir de cultivos de meristemos (Thorpe, 1998). Este método se ha utilizado para la propagación de otras especies de orquídeas en la producción comercial, establecimiento de nuevos híbridos y preservación de germoplasma (Sagawa, 1991).

En el cultivo *in vitro* de orquídeas se han empleado además de meristemos apicales, otros explantes (Tabla 6), como meristemos de raíz, protocormos, hojas, yemas, partes de tallo, inflorescencias, rizomas, yemas florales y protoplastos (Arditti y Ernst, 1993).

Tabla 6. Medios de cultivo y tipos de explantes usados en la micropropagación de orquídeas.

Especie	Tipo de explante	Medio	Respuesta	Referencia
<i>Bletia urbana</i>	Semillas	KC	Formación de plántulas	Chávez, 1980
<i>Acampe praemorsa</i>	Sección basal de hoja	MS BA, Kin y TDZ	Brotes vía directa	Nayak <i>et al.</i> , 1997
<i>Oncidium cavendishianum</i>	Nudos de inflorescencia	MS modificado ANA y BA	PLB's	Cahuantzi, 1998
<i>Cattleya mossiae</i>	Ápice de Tallo	MS modificado BA y TDZ	Brotes	Torres y Mogollón, 2000
<i>Doritaenopsis</i>	Ápice de raíz	MS TDZ, BA y Kin	PLB's vía directa e indirecta	Park <i>et al.</i> , 2003
<i>Dactylorhiza baltica</i>	Segmentos de PLB's	MS ANA y 2iP	PLB's a partir de ápices	Vaasa y Rosenberg, 2004
<i>Laelia albida</i>	Semillas	KC ANA y BA, almidón de papa y agua de coco (10%)	PLB's	Santos-Hernández <i>et al.</i> , 2005
<i>Phalaenopsis amabilis</i>	Segmentos de hoja	MS 50% modificado TDZ	Embriones somáticos en epidermis	Chen y Chang, 2006
<i>Prosthechea vitellina</i>	Semillas y plántulas	MS	Formación de plantas	De la Cruz, 2006
<i>Laelia autumnalis</i>	Semillas	MS 50% ANA y BA	Formación de plántulas	Sierra, 2006
<i>Euchile mariae</i>	Secciones apicales y basales de protocormos	MS y KC modificados ANA y BA	Embriones somáticos	Suárez, 2006
<i>Stanhopea tigrina</i> , <i>Laelia anceps</i> , <i>Epidendrum veroscriptum</i> y <i>Cattleya x esbetts</i>	Protocormos	MS 50% BA y 2,4-D	PLB's y brotes	Tinoco, 2006
<i>Laelia speciosa</i>	Hojas jóvenes	MS modificado ANA y 2iP	Brotes vía indirecta	Barrera, 2006
<i>Stanhopea tigrina</i>	Semillas	MS 50 y 100%, KC	Formación de plántulas	Chávez, 2008

Algunos de los estudios que se han reportado en la literatura para la propagación y conservación *in vitro* de distintos géneros de orquídeas, utilizando partes o secciones de raíz como explante inicial, son los generados en *Doritaenopsis*, donde se cultivaron ápices de raíz, en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de TDZ, BA y zeatina, obteniéndose

PLB's de manera directa y mediada por callo (Park *et al.*, 2003). A partir del cultivo de ápices de raíces aéreas de *Vanilla planifolia*, en medio MS con AIA y Kin se formaron brotes y posteriormente plántulas (Philip y Nainar, 1988).

A partir de láminas foliares de *Oncidium bifolium*, se regeneraron en medio MS 50 %, PLB's con TDZ o combinados con 2,4-D, y yemas mediante la adición de TDZ (Flachsland *et al.*, 2001). Nayak y cols. (1997a), al usar explantes de hoja de *Acampe praemorsa* cultivadas en medio MS y adicionado con BA, Kin, y TDZ, indujeron la formación de brotes adventicios principalmente en la parte basal de las hojas.

En lo que se refiere al cultivo de secciones de tallo, se reportó que la regeneración de brotes de *Dendrobium candidum*, a partir de segmentos nodales de tallo en medio MS suplementado con BA y ANA y la elongación de los brotes regenerados se realizó con la adición de 0.2 mg/L ANA en el medio de cultivo (Shiau *et al.*, 2005). En *Cattleya mossiae*, se formaron brotes vía directa a partir de ápices caulinares provenientes de yemas en reposo de tallo sembrados en medio MS modificado por Huang, adicionado con TDZ (Torres y Mogollón, 2000).

En las orquídeas, la información relacionada con los efectos de las interacciones hormonales sobre la formación de plántulas es muy escasa. En algunos trabajos, se reporta que la combinación de auxinas como el ANA y el 2,4-D y citocininas como Kin o BA, pueden incrementar el crecimiento, pero los efectos de estas combinaciones pueden variar dependiendo de los reguladores de crecimiento utilizados, sus concentraciones y las especies bajo estudio (Arditti y Ernst, 1993).

Con respecto a *Laelia gouldiana*, la información en torno a su biología es muy limitada y no existen reportes sobre su micropropagación. La realización de un estudio para desarrollar un protocolo con la finalidad de la obtención de plantas a partir de tejidos somáticos, es una medida urgente para su estudio, conservación y aprovechamiento sostenible.

3. Justificación

Debido a su belleza, fragancias y variados colores, las orquídeas se encuentran entre las flores más atractivas del mundo, lo que ha ocasionado que sean extraídas de su medio natural. Éste es el caso de *Laelia gouldiana*, una especie endémica de México, distribuida sólo en la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Debido a su época de floración y por la belleza de sus flores, éstas eran cortadas y utilizadas para realizar los adornos de los festejos del día de muertos. Esta acción disminuyó su posibilidad de reproducción, de por sí ya muy baja en condiciones naturales. El crecimiento de la población humana, sus actividades agrícolas, ganaderas y de pastoreo, terminaron con las poblaciones sobrevivientes. Esta situación crítica, sumada al lento y largo ciclo de vida de *L. gouldiana*, impidió la recuperación de sus poblaciones que la llevaron a estar considerada como extinta en la naturaleza. Escasos ejemplares existen en colecciones privadas, jardines botánicos y en casas de la Barranca de Metztitlán.

Evitar la extinción total de esta especie por cualquier medio es fundamental. El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser una útil herramienta biotecnológica que ha favorecido la propagación masiva de múltiples especies, algunas de ellas en peligro de extinción. Sin embargo esto no es posible sin un estudio de la capacidad regenerativa de diferentes tipos de explantes.

Por lo anterior resulta urgente la realización de la presente investigación con tejidos somáticos como ápices de raíz, hojas y tallos, en virtud de que no se cuenta con semillas que permitan propagar sexualmente esta especie extinta en la naturaleza, para establecer lotes de conservación y bases para una reproducción controlada que a futuro permita la posibilidad de ser reintroducida a su ambiente natural y el abasto a los mercados para propiciar la conservación de aspectos culturales.

4. Objetivos

Objetivo general

- Lograr la regeneración *in vitro* de *Laelia gouldiana*, especie extinta en la naturaleza, como una medida para su conservación.

Objetivos particulares

- Describir el efecto de ANA y BA en la regeneración *in vitro* de *Laelia gouldiana* a partir de secciones de ápice de raíz y segmentos de tallo y hoja, obtenidos de plántulas.
- Determinar el explante con mayor potencial de regeneración bajo las condiciones de cultivo ensayadas.
- Evaluar dos tipos de recipientes de cultivo, frascos Gerber® y cajas Petri en el desarrollo de los cultivos.
- Evaluar la respuesta morfogénica de segmentos de tallos y hojas en el mejor tratamiento hormonal (ANA/BA), con la adición de agua de coco.
- Establecer lotes de conservación y bases para su propagación controlada.
- Establecer condiciones para la aclimatización de las plántulas regeneradas *in vitro*.

5. Materiales y métodos

En el siguiente diagrama (Figura 4), se sintetiza el método general para la regeneración *in vitro* de *Laelia gouldiana*.

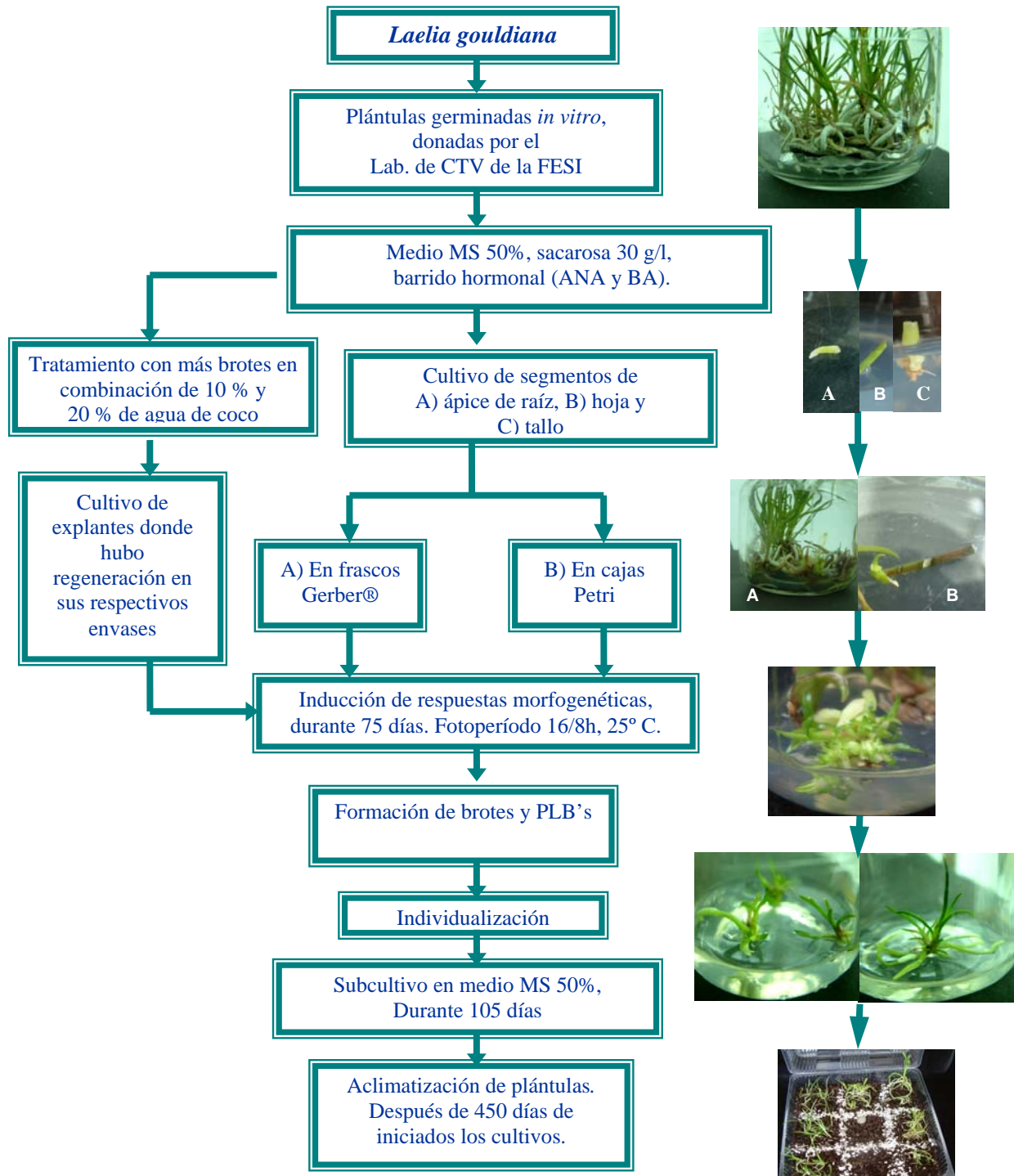


Figura 4. Método general para la regeneración *in vitro* de *L. gouldiana* a partir de segmentos de ápices de raíz, segmentos de tallos y hojas.

Material biológico

El material biológico empleado constó de entre 200 y 250 plántulas de *L. gouldiana*, ya establecidas en condiciones *in vitro* en medio MS al 50% de las sales, sacarosa 30 g/L y carbón activado 1g/L. El material fue donado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la FES Iztacala, por el Dr. Ernesto Aguirre, quien obtuvo semillas de la polinización manual entre flores de dos plantas aparentemente distintas, cultivadas en el Jardín Botánico de la FES Iztacala. Obtuvo la germinación de las semillas después de 20 a 30 días, en medio MS al 100% y al 50%, con un porcentaje de germinación menor al 20% (Aguirre, com. pers., 2007).

Las plántulas *in vitro* presentaban de 2 a 3 hojas, de 1 a 2.5 cm de longitud; 1 a 3 raíces, de 0.5 a 3 cm de longitud; el tallo o pseudobulbo inmaduro tenía entre 0.3 a 1.5 cm de largo. Además se contó con 3 explantes con PLB's, este material fue el más escaso, por lo que no se utilizó en el diseño de este trabajo de investigación.

Fase de inducción (75 días)

Para la inducción se utilizó medio MS (Apéndice 1) al 50% de sales inorgánicas y los componentes orgánicos, sacarosa 30 g/L, modificado con la adición de un barrido hormonal, constituido de diferentes combinaciones de ANA (0, 0.1, 0.5 mg/L) con BA (0, 0.5 y 1 mg/L) (Tabla 7). La expresión de las concentraciones de los reguladores de crecimiento cuando estaban combinados fue x/y, lo que corresponde a x mg/L ANA/y mg/L BA, y cuando no estaban combinadas sólo se escribió x ó y ANA ó BA, que corresponde a x ó y mg/L ANA ó BA. Con el fin de tener presente dichas concentraciones de los reguladores de crecimiento y los reguladores empleados, se anotó al inicio de cada apartado la concentración completa. Previo a la adición del gelificante, que en este caso fue Phytigel 5 g/L, el pH se ajustó a 5.7, con la adición de una solución básica (NaOH) o ácida (HCl), según se requirió, en concentraciones de 0.5 y 0.1M para ambas. Parte del medio de cultivo se calentó hasta disolver el gelificante y fue vertido (25 mL) en frascos Gerber® de un volumen de 100 mL, para después ser esterilizado. El resto del medio de cultivo se esterilizó en matraz Erlenmeyer y bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar fue vertido (20 mL) a cada caja Petri de vidrio de 100x20 mm. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave, a una presión de 1.5 kg/cm² y una temperatura de 120° C durante 17 min.

Se hicieron dos siembras con el mismo barrido hormonal, sólo difirieron en el recipiente de cultivo, es decir, uno se realizó en cajas Petri y el otro en frascos Gerber®, con el fin de observar cómo intervienen en la respuesta morfogénica para los tres tipos de explantes. El tiempo inducción en el medio con reguladores de crecimiento fue de 75 días.

Tabla 7. Tratamientos utilizados para inducir respuestas morfogénicas, a partir de explantes de ápice de raíz, segmentos de tallo y hoja de plántulas de *Laelia gouldiana*, cultivadas en medio MS 50 %, en dos envases de cultivo diferentes, durante 75 días.

BA mg/L ANA mg/L	0	0.5	1
0	Control	1	2
0.1	3	4	5
0.5	6	7	8

A partir de ápices de raíz, segmentos de hojas y tallos se obtuvieron explantes, que se sembraron en el medio y las condiciones previamente descritas.

En cajas Petri, se sembraron por separado cinco explantes de cada tipo de explante: ápice de raíz, segmentos de tallo y de hoja, con cuatro cajas Petri por tratamiento, en los nueve tratamientos (180 explantes en total para cada tipo de explante) para todos sus tratamientos.

Para frasco Gerber®, se sembraron cuatro explantes de ápice de raíz, segmentos de tallo y hoja, con cinco frascos Gerber® por tratamiento, en los nueve tratamientos (180 explantes en total para cada tipo de explante) para todos sus tratamientos. Todo esto se realizó bajo condiciones asépticas.

Ápices de raíz

Se seleccionaron las raíces que se encontraban en desarrollo y más próximas al tallo, con una longitud de 1 a 2 cm, el ápice de color verde y a lo largo la presencia de velamen de coloración blanca. Se seccionaron fragmentos de entre 0.5 y 1 cm de longitud, de la parte distal de las raíces, es decir, los ápices.

Segmentos de hoja

Los segmentos de hojas seleccionados, se obtuvieron de las hojas de 1 a 1.5 cm, que se encontraban en la parte más apical del tallo y que no se habían desarrollado totalmente. Para obtener el explante se desprendieron, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, las brácteas y hojas que rodean al tallo y que se encontraban por debajo de la hoja más superior, la cual se apreciaba de un color verde más intenso que las demás hojas y con una talla inferior, puesto que se encontraban en crecimiento. Se seccionaron segmentos de 0.5 a 1 cm de longitud, iniciando el corte unos milímetros por arriba del ápice del tallo de tal manera que el explante fuera lo más próximo a la base de la hoja y al ápice del tallo. La porción superior de la hoja o distal con respecto al tallo, sólo se seccionaba si la hoja superaba 1.5 cm de longitud, de no ser así se conservaba esta porción.

Segmentos de tallo

La porción que se escogió como explante de tallo, fue la parte más próxima a la base del mismo, ya que aquí se encuentran yemas o meristemos laterales que dan origen a nuevos brotes. Los explantes midieron de 0.5 a 1 cm de longitud, los cuales tenían una coloración verde. Además se observó la presencia en algunos casos de restos de brácteas de color café translúcido y se cortaron lo más próximo al tallo todas las raíces teniendo cuidado de no lastimar las yemas laterales, por lo que quedaba una porción de 1 mm de las raíces.

Previo al corte del tallo se tuvo que determinar cual era la porción que se consideraba como tallo, ya que las plántulas al estar en un estadio de crecimiento muy temprano, no se distinguió fácilmente dicha área.

Lo anterior se realizó mediante la observación con microscopio estereoscópico, en donde con ayuda de bisturí y pinzas de disección, se fueron separando cada uno de los componentes que no forman parte del tallo, como brácteas que envuelven al tallo y raíces, además del rizoma. La longitud del tallo, después de 5 plántulas que se examinaron aleatoriamente, fue de 0.7 a 1.5 cm de longitud, esto porque las plántulas se encontraban en distintas etapas de su desarrollo. En la parte basal del tallo se encuentran yemas laterales. La parte más distal al ápice fue la que se seccionó para la realización de este trabajo (Figura 5).

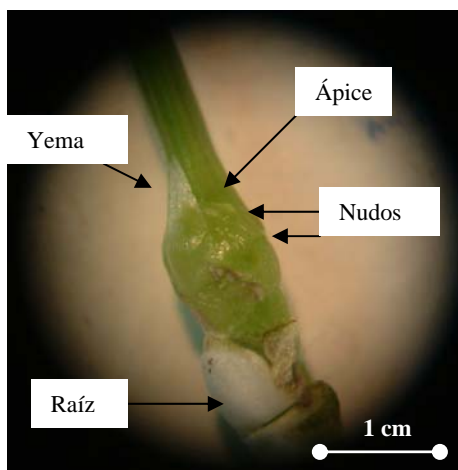


Figura 5. Determinación de la porción que se seccionó de tallo, en donde se observan yemas laterales.

Todos los cultivos fueron sellados con Egapack, para evitar una contaminación, e incubados bajo fotoperiodo de 16 horas luz con una intensidad luminosa de $50 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ y con 8 horas de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Se realizó un registro de los cultivos en cajas Petri a los días 10, 45, 60 y 75, y para frascos Gerber® se hizo a los 10, 30, 60 y 75 días. Se evaluó el número de brotes por explante y para este fin se contaron sólo brotes que mostraron primordios foliares así como plántulas, no se tomaron en cuenta yemas laterales o masas de PLB's hasta que se hubieran desarrollado en brotes. Se determinó el \bar{X} de brotes por explante y se relacionó con el tipo de recipiente, tipo de explante y el tratamiento hormonal empleado.

Fase de crecimiento y desarrollo (105 días)

Después de 75 días de la fase de inducción, se procedió a individualizar los brotes y plántulas que se habían formado, con el fin de que continuaran su crecimiento y desarrollo. Para esto se sembraron en medio MS 50% basal. Todos los brotes y plántulas de ambos tratamientos: cajas Petri y frascos Gerber®, se sembraron en frascos Gerber®, con el fin de que se desarrollaran y crecieran en un contenedor más amplio. Todo bajo condiciones de asepsia e incubados bajo las condiciones previamente descritas.

Se tomaron registros a los 30, 60, 90 y 105 días para contabilizar el número de brotes y plántulas que se habían formado.

Agua de coco

Concluida la fase de inducción y multiplicación de los cultivos en cajas Petri y en frascos Gerber®, se seleccionó sólo la concentración hormonal y el explante en donde se obtuvo la mayor proliferación de brotes después del período de inducción (75 días), así como el envase donde se llevó a cabo el cultivo.

Se combinó 0.1 mg/L ANA con dos concentraciones diferentes de agua de coco: 10 % y 20 % v/v, así como un control libre de reguladores del crecimiento y complejos naturales (Tabla 8), en frascos Gerber® en el explante de tallo. También se cultivo segmentos de hojas en cajas Petri en las combinaciones previamente descritas. La forma de expresar las concentraciones de 0.1 mg/L ANA y agua de coco empleadas fue: 0.1/x% ANA/coco, que corresponde a 0.1 mg/L ANA/x % endospermo líquido de coco y x % coco cuando estaba sin ANA. Al igual que la fase de inducción, se escribió al inicio de cada apartado la concentración completa.

Tabla 8. Combinaciones de agua de coco y regulador del crecimiento, para evaluar la respuesta morfogénética, a partir de explantes de segmentos de tallo y hoja de *Laelia gouldiana*, cultivados en medio MS 50 %, en dos envases de cultivo diferentes, durante 75 días.

Agua coco v/v \ ANA mg/L	0 %	10 %	20 %
0	Control	1	2
0.1	3	4	5

El agua de coco se calentó hasta el punto de ebullición; a partir de este momento se contaron 10 minutos y se retiró del fuego. Se separaron dos fases, la superior con una apariencia translúcida y la inferior blanquecina. Para separarlas se decantó y se filtró con ayuda de una gasa y coladera para obtener sólo la fase superior. Se dejó enfriar y se agregó al medio en las concentraciones requeridas. Las condiciones del medio, en siembra y el número de explantes sembrados en frascos Gerber® y en cajas Petri, fueron las mismas anteriormente descritas para la fase de inducción. Los cultivos se incubaron bajo las condiciones antes descritas.

Aclimatización

La aclimatización se realizó al cabo de 450 días (15 meses) de iniciados los cultivos *in vitro*. Las plántulas regeneradas tenían de 2 a 3 hojas de 5 a 7 cm de longitud, los tallos tenían una longitud de 0.8 a 1.5 cm y presentaban de 3 a 6 raíces, con una longitud de 5 a 7 cm. Las raíces tenían una coloración blanca y el ápice verde. Las plantas fueron retiradas de los frascos Gerber®, se eliminó el medio de cultivo que se encontraba adherido a las raíces y se enjuagaron cuidadosamente con agua tibia para evitar una posible contaminación por hongos. Se eliminaron estructuras muertas (hojas y raíces) que pudieran ser otra vía de contaminación para la planta (Sierra, 2006) y se colocaron en charolas de plástico sobre toallas de papel humedecidas con agua destilada y se rociaron con una solución de captán 1 g/L para prevenir contaminación por hongos, permaneciendo en estas condiciones durante un día, evitando la luz solar directa.

Se utilizaron tres sustratos: Peat moss, agrolita y fibra de coco, los cuales fueron humedecidos y calentados en horno de microondas durante 30 minutos. Este procedimiento se realizó para eliminar fuentes de contaminación que estuvieran presentes en los sustratos.

Una vez obtenidos los sustratos estériles, se hicieron tres mezclas de la siguiente manera:

- Peat moss y agrolita (3:1) (v/v)
- Fibra de coco y agrolita (3:1) (v/v)
- Peat moss, fibra de coco y agrolita (3:3:1) (v/v/v)

Las tres mezclas de sustratos se colocaron cada una en una charola de plástico de 40x40x10 cm, con una capa de 2 cm de espesor del sustrato, donde se colocaron 75 grupos de plántulas en posición vertical y conservando la polaridad. Se realizó un riego con agua destilada y se selló la tapa de las charolas con cinta adhesiva, para crear un microclima semejando las condiciones *in vitro*. Se colocaron en el cuarto de aclimatización a temperatura ambiente.

Cada 30 días, a lo largo de 150 días, las tapas se levantaron 2 cm, con el fin de reducir gradualmente la humedad relativa dentro de las charolas y evitar una deshidratación violenta. Se hicieron riegos cada 15 días. En caso de contaminación con hongos se aplicó Captan 2.5 g/L. Se evaluó la supervivencia cada 30 días durante 5 meses.

6. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos del cultivo de tejidos de *Laelia gouldiana*, después del período de inducción (75 días) y del período de multiplicación (105 días), se resumen en la Tabla 9. Los resultados se desglosan, para su explicación y análisis, para cada tipo de explante y el tipo de envase empleado en la siembra.

Tabla 9. Número de regenerantes del período de inducción (75 días) y al final del período de multiplicación (105 días), para los cultivos en frascos Gerber® y cajas Petri.

	Cultivos en Frascos Gerber®		Cultivos en Cajas Petri	
	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja
Número total de regenerantes/explantes sobrevivientes (75 días de inducción)	244/156	19/148	148/130	15/125
Número total de regenerantes/explantes sobrevivientes (180 días de cultivo)	307/124	53/122	185/89	67/120
Mejor \bar{X} brotes/explante (75 días de inducción)	4.38 (0.1 ANA)	0.56 (0.5/1 ANA/BA)	2.4 (1 BA)	0.4 (0.1 ANA y Control)
Mejor \bar{X} brotes/explante (180 días de cultivo)	7.33 (0.1 ANA)	2.88 (0.5/1 ANA/BA)	4.5 (0.1 /1 ANA/BA)	1.0 (0.1 ANA y 0.1/1 ANA/BA)

Cultivos de ápice de raíz

Los cultivos de ápice de raíz sembrados en cajas Petri, al momento de la siembra mostraron una coloración verde en la porción apical y el resto variaba de blanco, por el velamen, epidermis múltiple en la raíces aéreas de orquídeas epífitas (Park *et al.*, 2003), a verde (Figura 6a), pero a los 10 días de cultivo en medio de inducción, la coloración de los explantes se tornó a un verde claro, aunque prevalecía el verde más intenso. Esto se dio en todos los tratamientos y el control. No hubo una influencia por los reguladores del crecimiento en este fenómeno. Los explantes en todos los tratamientos adquirieron con el tiempo en cultivo dos coloraciones: verde claro y café claro, lo que indicó principios de oxidación (Figura 6b). Esto se registró después de 45 días de iniciada la inducción.

A los 75 días en medio de inducción, ningún explante en los nueve tratamientos, logró alguna respuesta morfogénica, sólo varió la coloración café, mostrando en la mayoría de los explantes un estadio avanzado de oxidación (Tabla 10). Esta oxidación gradual que empezó desde el día 10 con algunos explantes que adquirieron una coloración blanquecina, hasta el día 75 donde la mayoría de los explantes se encontraban oxidados, es considerada una expresión de los procesos de senescencia del mismo explante (Zaid, 1987). En 123 de los 160 explantes que concluyeron el período de inducción, se presentó una coloración café, quedando 37 explantes con pigmento verde. Ya que los explantes en todos los tratamientos, incluidos el control se oxidaron, se puede decir que los reguladores del crecimiento no influyeron en la oxidación. El tratamiento con más incidencias de oxidación fue el adicionado con 0.5 mg/L BA, donde 19 de los 20 explantes se oxidaron. Posiblemente se debió a que las citocininas estimulan la síntesis de compuestos fenólicos. Lo anterior se ha reportado en medios de cultivo enriquecidos con kinetina, donde se incrementaba la oxidación (Zaid, 1987).

Transcurridos 105 días de cultivo, en que los explantes llevaban 30 días en medio basal, solamente había 5 explantes que conservaban pigmentos verdes sin señales de oxidación, estos se encontraban en los tratamientos con 0/0.5, 0.1/0.5, 0.1/1 y 0.5/0, con un explante en cada uno excepto en el tratamiento con 0.5 BA, donde habían dos explantes. Después de 180 días de cultivo los explantes no generaron alguna estructura, ni incrementaron su tamaño.

El ápice de raíz ha sido empleado en el cultivo *in vitro* (Hurtado y Merino, 1987), pero poco empleado en orquídeas, por lo que casi no hay trabajos reportados en la literatura, además la respuesta que se ha obtenido en este trabajo ha sido muy variada. Park y cols. (2003), en *Doritaenopsis*, obtuvieron a partir de ápices de raíz, la formación de PLB's, mediante la adición al medio MS modificado, de 2.3 μ M de TDZ, formándose de 2 a 6 PLB's por explante. Los PLB's se formaron en dos vías, una directa a partir del meristemo de la raíz y la otra, mediada por la formación de callo a partir de las células corticales. Los resultados se observaron después de 5 semanas de cultivo. A pesar de la formación de PLB's, los autores de este trabajo consideraron que los ápices de orquídeas son recalcitrantes a formar PLB's o callo *in vitro*, en especies de géneros como *Epidendrum*, *Oncidium* y *Cattleya* (Park *et al.*, 2003). La respuesta nula en el presente estudio para este explante, puede deberse a los reguladores del crecimiento, ya que Park y cols. (2003), emplearon en *Doritaenopsis*, TDZ; mientras que Vaz y cols. (1998), emplearon zeatina en la formación de brotes en *Catasetum fimbriatum* en cultivos de ápice de raíz. Por otra parte, Peres y Kerbauy (1999), en cultivos de

raíz para *Catasetum fimbriatum*, y *Oncidium sp.*, señalaron que la obtención de alguna respuesta morfogénica en cultivos de ápice de raíz, depende de componentes genéticos propios de cada planta.

En el caso de los cultivos de ápice de raíz sembrados en frascos Gerber®, al inicio de la siembra presentaban una coloración verde en el ápice y de verde claro a blanco en el resto del explante, con una apariencia fresca y húmeda (Figura 7a). Al día 10 de inducción los explantes en todos los tratamientos por la alta humedad presente en los envases *in vitro*, tenían una coloración verde en todo el explante (Figura 7b). Esta diferencia se dio porque algunas raíces de orquídeas y en este caso *L. gouldiana*, presentan una cubierta esponjosa de células epidérmicas muertas llamada velamen, que le sirve a la orquídea para absorber mejor la humedad de la lluvia, rocío, neblina y minerales para ser aprovechados al interior de la raíz. En condiciones donde no hay una elevada humedad se observa de color blanco debido a las células muertas, pero cuando hay una alta humedad en el ambiente se transparenta esta cubierta dejando ver la coloración verde característica de la raíces con pigmentos fotosintéticos (De la Cruz, 2006; Chávez, 2008).

A los 30 días de inducción seguían mostrando una coloración verde y el ápice verde claro en todos los tratamientos sin señales de oxidación, además en 22 de los 180 explantes empezaron a elongar el ápice en cuatro de los nueve tratamientos (control, 0.1 ANA, 0.5 ANA, 0.5/0.5), el crecimiento fue de 1.5 a 3 cm de longitud (Figura 7c). Al día 60 de inducción, los explantes empezaron a mostrar señales de oxidación en 86 de 168 explantes (de 180, pero 12 explantes se contaminaron).

Al final del período de inducción (75 días), los explantes en su mayoría se encontraron oxidados (Tabla 10), siendo el adicionado con 0.1 ANA donde se apreció más esto, ya que 18 de los 20 explantes estaban oxidados (Figura 7d). Además, de los 164 explantes que terminaron el período de inducción sin contaminación, sólo 53 explantes no mostraron señales de oxidación y mantuvieron una coloración verde. La respuesta fue más variada en los cultivos en frasco Gerber®, siendo el rasgo más particular la elongación del ápice, este proceso ocurrió a los 30 días de iniciados los cultivos. Al término del período de inducción (75 días), algunos explantes alcanzaron longitudes de 6 cm, como fue el caso del tratamiento adicionado con 0.5/0.5 (Figura 8a), además en el tratamiento libre de reguladores del crecimiento un explante que estaba elongado tenía una coloración verde (Figura 8b), a diferencia de los demás explantes que se elongaron que eran blancos por el velamen y verdes

en el ápice (Hágsater *et al.*, 2005). Esto se debió a que todo el explante tenía contacto con el medio lo que ocasionó que se transparentara la cubierta de células muertas y evidenciara los pigmentos verdes de la raíz. Después de 75 días de inducción la elongación del ápice de raíz, sólo se presentó en cuatro de los nueve tratamientos (Tabla 11).

Estos explantes se subcultivaron a medio basal MS 50 % después de 75 días de inducción. Transcurridos 30 días de cultivo en medio basal, 30 explantes de 155 no se habían oxidado y continuaban con pigmentos verdes y/o estaban elongados y en los cultivos con 0.1/1 fue donde hubo más explantes sin oxidación con 5 (Figura 9a). Había 13 explantes con elongación en cuatro tratamientos y los adicionados con 0.5 ANA y el libre de reguladores fueron donde hubo más con 4 explantes en cada uno; el libre de reguladores tenía al explante con la elongación de mayor longitud con 7 cm. Al término de 180 días de cultivo quedaron 13 explantes sin oxidar de 155 (Figura 9b) y de éstos, 10 explantes presentaron elongación, con una longitud máxima de 11.5 cm en el tratamiento libre de reguladores (Tabla 12).

Tabla 10. Total y porcentaje de explantes de ápice de raíz oxidados en cada tratamiento al final del período de inducción (75 días), en frascos Gerber® y cajas Petri.

Tipo de envase Tratamiento (mg/L)	Caja Petri		Frasco Gerber®	
	Oxidados (%)	Sin oxidar	Oxidados (%)	Sin oxidar
Control	18 (90)	2	14 (70)	6
0.5 BA	19 (95)	1	10 (62.5)	6
1 BA	8 (80)	2	13 (65)	7
0.1 ANA	16 (80)	4	18 (90)	2
0.1/0.5 ANA/BA	15 (75)	5	14 (70)	6
0.1/1 ANA/BA	9 (60)	6	8 (66.7)	4
0.5 ANA	17 (85)	3	15 (75)	5
0.5/0.5 ANA/BA	13 (86.7)	2	7 (43.75)	9
0.5/1 ANA/BA	8 (40)	12	12 (60)	8

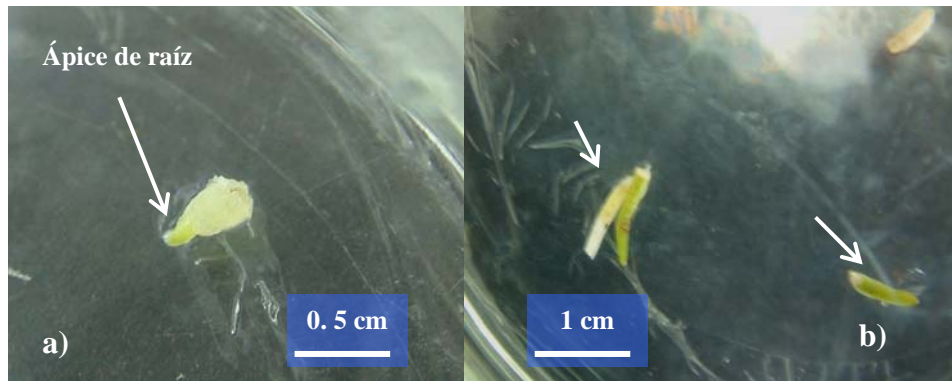


Figura 6. a) Ápices de raíz al momento de la siembra y b) inicios de la oxidación a los 45 días de inducción, en caja Petri.

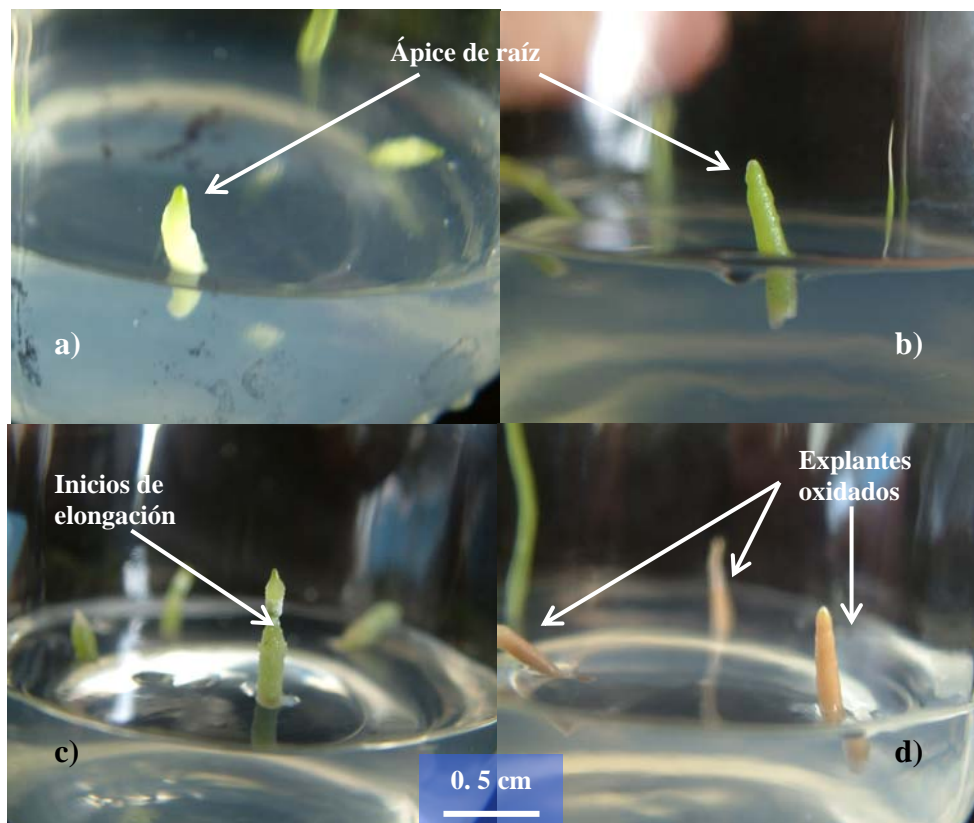


Figura 7. Ápices de raíz a) al momento de la siembra; b) a los 10 días de inducción; c) a los 30 días de inducción, iniciando la elongación, y d) explantes oxidados a los 75 días de inducción en frascos Gerber®.

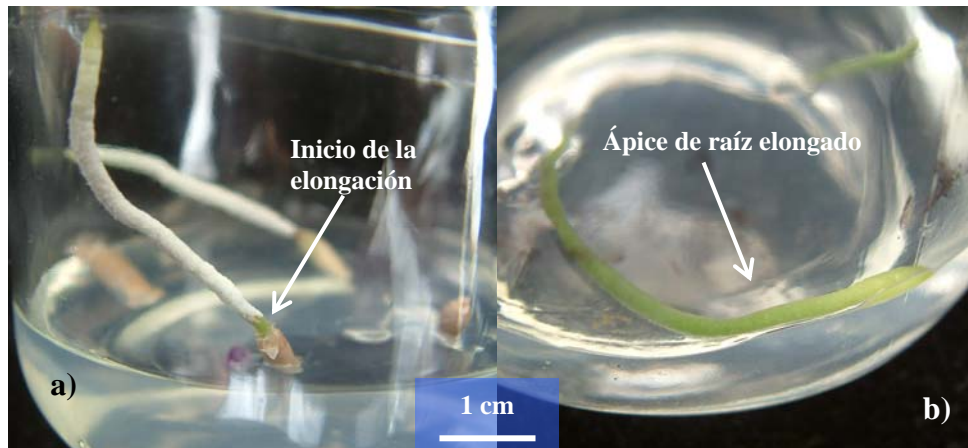


Figura 8. Elongación del ápice de raíz a los 75 días de inducción. a) Explante con crecimiento vertical, sembrado en medio MS 50% adicionado con 0.5/0.5, alcanzó 5 cm, y b) explante elongado con una coloración verde.

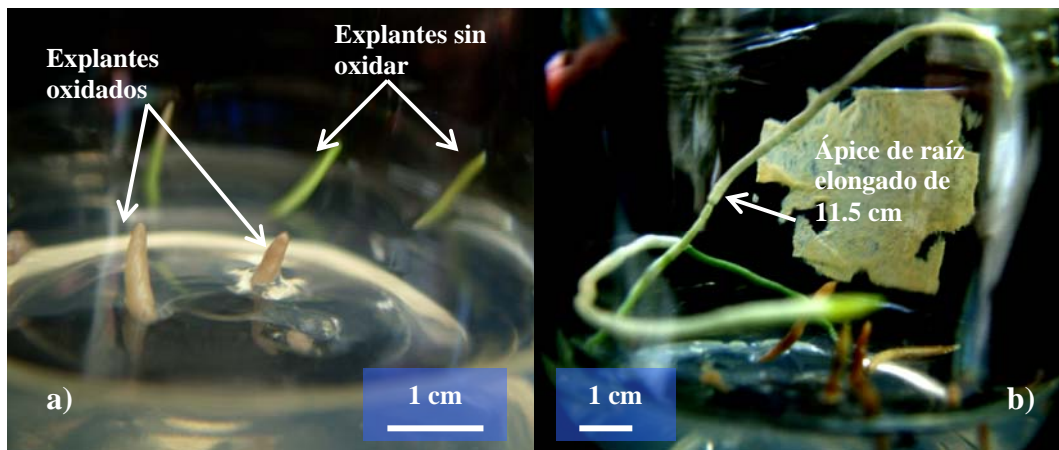


Figura 9. Cultivos de ápice de raíz. a) Explantes oxidados y sin oxidar después de 105 días de cultivo y b) explantes elongados con una longitud máxima de 11.5 cm en el tratamiento libre de reguladores, después de 180 días de cultivo.

Tabla 11. Elongación de ápices de raíz en frascos Gerber®, después de 75 días de cultivo.

Tratamientos (mg/L)	Número de explantes que presentaron elongación (%)	Intervalo de crecimiento (cm)	Longitud máxima (cm)
Control	5 de 20 (25)	2.5-5	5
0.1 ANA	2 de 20 (10)	2.5-5	5
0.5 ANA	5 de 20 (25)	1.5-5	5
0.5/0.5 ANA/BA	8 de 15 (53)	2-6	6

Tabla 12. Elongación de ápices de raíz en frascos Gerber®, después de 180 días de cultivo.

Cultivos provenientes de estos tratamientos (mg/L)	Número de explantes que presentaron elongación (%)	Intervalo de crecimiento (cm)	Longitud máxima (cm)
Control	3 de 20 (15)	6.5-11.5	11.5
0.1 ANA	1 de 20 (5)	5	5
0.5 ANA	3 de 20 (15)	4-5	5
0.5/0.5 ANA/BA	3 de 7 (43)	3.5-4	4

La elongación no estuvo asociada a la presencia de reguladores del crecimiento, ya que hubo explantes elongados en los cultivos libres de reguladores, pero si la favorecieron, en particular la auxina (ANA), ya que en dos de los tres tratamientos con reguladores, únicamente tenían la presencia del ANA, mientras que el tercero estaba en combinación tanto de ANA como de BA. La presencia de ANA indicó que en bajas concentraciones favoreció la elongación del ápice de raíz. En *Catasetum fimbriatum*, Vaz y cols. (1998) observaron que AIB, estimuló la elongación en cultivos de raíz en la concentración de 3 μ M, promoviéndola fuertemente e inhibiendo la formación de brotes vegetativos, además se reportó que mientras se elongaba la raíz, se reducía el contenido total de carbohidratos solubles, lo que se ha considerado que mejora la elongación de la raíz. Esto sugiere que las auxinas estimulan el crecimiento y alargamiento celular, en cultivos de raíz (Jankiewicz, 2003; Tinoco, 2006). Mientras que con 0.5/0.5 se obtuvo la elongación más prominente durante el cultivo con reguladores, ya que la longitud máxima que alcanzó un explante fue con esta concentración al término de este período fue de 6 cm, más que en los otros tratamientos, además 50 % de los explantes se elongaron. Por lo que la interacción de ambos reguladores puede tener un efecto sinergista en el incremento de la respuesta y el control del desarrollo de raíces (Coenen y Lomax, 1997; Nordström *et al.*, 2004). Además la elongación se favoreció cuando se cultivaron los explantes de raíz en frascos Gerber®. La atmósfera *in vitro*, es posible que haya promovido la elongación, siendo el etileno uno de los responsables de mediar este proceso. En *Corylus avellana*, se observó que la formación de primordios de raíz fue estimulada mediante el etileno. En este estudio González y cols. (1991), concluyeron que el etileno juega un papel importante en la formación de raíces.

Por otra parte la elongación de la raíz se vio afectada al quitar los reguladores del crecimiento en los cultivos donde se habían adicionado, ya que los explantes no incrementaron su longitud

y solamente se elongaron más en el tratamiento que siempre estuvo libre de reguladores, donde se alcanzaron longitudes de 11.5 cm después de 180 días de cultivo. Esto pudo deberse a una habituación a los reguladores, lo que no ocurrió en el tratamiento libre de reguladores, que al contrario cuando fue subcultivado a medio fresco favoreció aún más la elongación, lo que pudo deberse a la fuente de carbón, la cual se ha visto que participa en la expansión celular (Vaz *et al.*, 1998).

Cultivos de segmentos de hoja

Los segmentos de hoja al inicio del cultivo en caja Petri, tenían una coloración verde (Figura 10a). Durante este período no se presentó la formación o crecimiento de alguna estructura o morfogénesis.

A los 45 días de inducción, los explantes ya mostraban señales de oxidación, siendo más severa en el tratamiento libre de reguladores y en el adicionado con 0.5 mg/L BA, donde todos los explantes en ambos tratamientos tenían alguna porción oxidada. Durante este período se desarrollaron brotes vía directa (Figura 10b), los cuales surgieron a partir de la base del explante. Esto ocurrió en los tratamientos con 0.1 ANA (3 brotes), 0.1/0.5 mg/L ANA/BA (1 brote), 0.1/1 (4 brotes), 0.5 ANA (3 brotes), 0.5/0.5 (1 brote) y 0.5/1 (1 brote). La aparición de la primera respuesta a los 45 días de iniciados los cultivos concuerda con Arditti (1977) en cultivos de hoja de *Cattleya*, ya que menciona que a partir de este tiempo empieza la proliferación.

Al término de los 75 días de inducción, los explantes mostraban una coloración amarilla con pigmentos verdes y en su mayoría había porciones oxidadas, lo cual es un proceso esperado en los explantes de hoja, como se ha observado en cultivos de hoja de *Cattleya*, donde el tejido muere o se torna a una coloración café (Arditti, 1977). Además de los seis tratamientos donde se habían formado brotes, sólo quedaban tres (Tabla 13), debido a que en los tratamientos adicionados con 0.5 ANA, 0.5/0.5 y 0.5/1 ANA/BA, las cajas Petri donde se encontraban los explantes con los brotes, se contaminaron. Cabe señalar que en 5 de los 11 explantes donde se formaron brotes, posiblemente se disectó el segmento de hoja muy cerca del ápice del tallo o de un meristemo axilar, quedando parte de éste en el explante, lo que posiblemente dio como resultado la formación de un brote en cada uno de estos explantes (Figura 10c). Arditti (1977) señaló que al quedar restos de meristemo axilar en la base de la hoja, esto inhibía que se formaran brotes adventicios y crecía sólo un brote, como lo presentado en los 5 explantes posibles restos de meristemo axilar, donde se formó un brote/explante. El total de brotes y plántulas formados al cabo de 75 días de inducción fue 15, éstos tenían una talla que iba de los 0.5 a 2.5 cm de longitud (Figura 10d).

En el tratamiento libre de reguladores al término del período de inducción se formaron cuatro brotes, lo que no sucedió a los 45 días de cultivo. Esto nos indica que la formación de brotes

se adelantó con la adición de reguladores. El tratamiento donde se obtuvo el mayor \bar{X} de brotes por explantes fue el libre de reguladores del crecimiento y con 0.1 ANA (Figura 11).



Figura 10. Segmentos de hoja cultivados en medio MS, a) al momento del cultivo; b) formación de brotes a los 45 días de cultivo e indicios de oxidación; c) formación de plántulas a partir de vestigios de tallo, explante oxidado, y d) formación de plántulas después de 75 días de inducción.

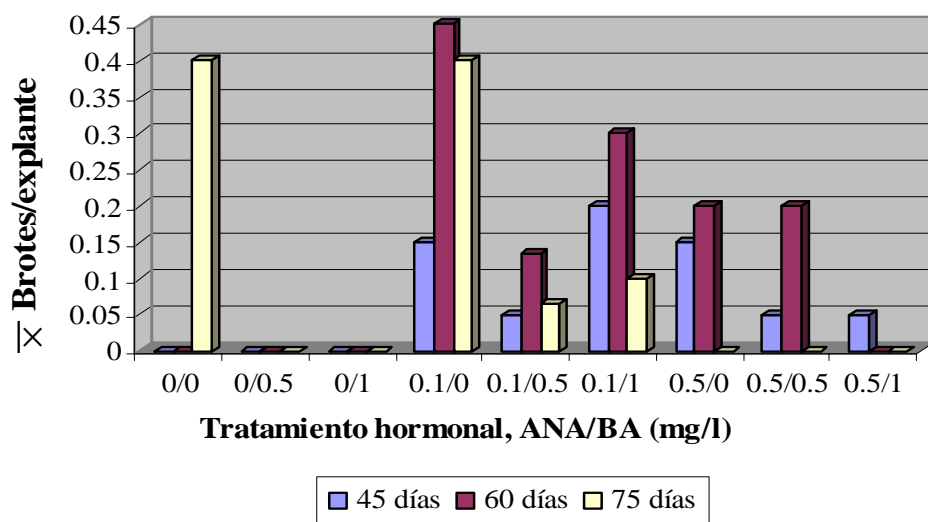


Figura 11. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hojas de *L. gouldiana* en medio MS, sembradas en cajas Petri.

Tabla 13. Brotes generados a partir de segmentos de hoja de *L. gouldiana*, en medio MS en cajas Petri. Resultados a los 75 días de cultivo.

Tratamiento ANA/BA mg/L	No. total de brotes	Explantes sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	4	10	0.4
0/0.5	0	15	0
0/1	0	10	0
0.1/0	8	20	0.4
0.1/0.5	1	15	0.07
0.1/1	2	20	0.1
0.5/0	0	15	0
0.5/0.5	0	15	0
0.5/1	0	5	0

La regeneración de brotes (con previa formación de yemas), se ha reportado en *Oncidium bifolium* (Flachsland *et al.*, 2001), de la que se obtuvieron yemas a partir de las láminas foliares, con TDZ 1 mg/L y un \bar{X} de 7 yemas/explante. Con 0.1 y 0.5 mg/L TDZ se regeneraron 3 yemas/explante. Usando la misma concentración de 1 mg/L TDZ, se logró el mayor porcentaje de regeneración de brotes cultivando explantes foliares de *Acampe praemorsa* (Nayak *et al.*, 1997a). Lo cual no concuerda con el presente estudio para los cultivos en cajas Petri, ya que los tratamientos con mayor \bar{X} de brotes/explante, además de ser donde se obtuvo el mayor número de brotes, fueron el libre de reguladores y el adicionado con 0.1 ANA (Tabla 13). Estas condiciones de cultivo, no coinciden con *Phalaenopsis amabilis*, ya que estas concentraciones de reguladores hacían que los explantes foliares tendieran a necrosar y no formaran algún regenerante (Chen y Chang, 2006). Sin embargo Chen y cols. (2004), en todas las concentraciones ensayadas de 2,4-D sin la combinación de TDZ en el híbrido *Paphiopedilum* PH59 en hojas intactas de 1-5 cm de longitud, resultaron en la formación de brotes, lo que no ocurrió en todos los ensayos con TDZ únicamente. Esto indica que hay otros factores que están interviniendo en la respuesta que se obtenga, tales como el tipo de envase empleado en la siembra, ya que en *Acampe praemorsa* se sembró en matraces Erlenmeyer de 150 mL y tubos de cultivo de 20 mm de diámetro (Nayak *et al.*, 1997a). En el híbrido *Paphiopedilum* PH59 se usaron tubos de cultivo de 20x150 mm (Chen *et al.*, 2004); para *Oncidium bifolium*, no se menciona el tipo de envase (Flachsland *et al.*, 2001) y en *Phalaenopsis amabilis* se emplearon cajas Petri de 90x15 mm (Chen y Chang, 2006), siendo este último el único que coincidió con el presente estudio, por lo que otro factor

que determina la respuesta, puede ser la especie con la que se está trabajando (Thorpe, 1998). Los otros tratamientos en el presente estudio que generaron respuesta fueron los adicionados con 0.1/1 y 0.1/0.5, donde se desarrollaron 2 y 1 brote respectivamente por tratamiento. Esto coincide con lo obtenido por Chen y cols. (2004), en el híbrido *Paphiopedilum* PH59, a través de hojas intactas de 1.5 cm de longitud, donde el mayor \bar{X} de brotes/explante lo registraron en el tratamiento libre de reguladores y el adicionado con 4.52/4.54 μM 2,4-D/TDZ, ya que el cultivo libre de reguladores y la combinación de auxina/citocinina promovieron la formación de brotes. Flachsland y cols. (2001), al utilizar bajas concentraciones de auxina (0.01 mg/L 2,4-D) en combinación con 0.1 y 1 mg/L TDZ, observaron una menor respuesta obteniéndose 1 brote por tratamiento.

Un resultado a resaltar en el presente estudio, es que con los tratamientos adicionados con ANA/BA, los brotes formados a los 75 días empezaron a oxidarse, cosa que no se observó al día 60 de cultivo. Esto sugiere que una exposición prolongada a ambos reguladores del crecimiento termina por oxidar los brotes, por lo que se recomienda terminar el período de inducción al día 60 cuando los brotes se encuentran en condiciones de activo crecimiento y desarrollo. Esto no se recomienda en el tratamiento libre de reguladores del crecimiento, donde sí fue necesario el cultivo hasta el día 75.

La nula respuesta que se presentó en los medios que contenían solamente BA, para *Laelia gouldiana*, puede ser influenciada por el tipo de citocinina que se está empleando, ya que en los trabajos previamente citados se utilizó TDZ, la cual se ha visto que es efectiva en inducir la morfogénesis *in vitro* de varias especies de orquídeas y en promover la diferenciación de yemas adventicias y la regeneración de brotes (Chen *et al.*, 2004; Tinoco, 2006). Además del tipo de citocinina que se elija también intervienen otros factores, como la especie que se esté estudiando, ya que cada una responde de manera diferente a los reguladores del crecimiento además de tener necesidades y requerimientos particulares (Thorpe, 1998), como lo mencionado por Chen y cols. (2004), para los dos híbridos de *Paphiopedilum* que estudiaron, indicando que la capacidad regenerativa de los explantes varía con el genotipo estudiado, además el tipo de explante afecta de manera notoria la respuesta en la formación de brotes.

Al término de los 75 días de cultivo en medio de inducción se subcultivaron brotes, plántulas y explantes que no respondieron, a medio basal MS al 50%. Después de los 105 días de cultivo, 30 días después de su siembra a medio basal, los explantes que presentaban oxidación regeneraron brotes (Figura 12a), esto fue evidente en los cultivos que provenían de la adición

de 0.5 y 1 BA, los cuales durante la inducción no presentaron ninguna respuesta. Además en los cultivos provenientes de la adición de 0.5 ANA, a pesar de haber perdido sus brotes por oxidación, al cambiarlos a medio libre de reguladores regeneraron brotes (Figura 13). A lo largo de los 180 días de cultivo, 105 días en medio MS basal, se dio un incremento en el número de brotes y plántulas (Figura 12b) llegando a tener al final del periodo de multiplicación 67 plántulas (Tabla 14). Además incrementaron en talla, llegando a tener hasta 10 cm de longitud.

En los cultivos que provenían de 0.1/1 y 0.5 ANA, hubo un incremento en el número total y el \bar{X} de brotes/explante, lo que pareció indicar que en presencia de mayores concentraciones de reguladores se vio disminuida la formación de brotes, pero sí son un factor para que en medio basal se hubiera estimulado la brotación. Esto indicó que fue necesario el previo impulso hormonal, pero con subcultivo subsiguiente en medio basal. Mientras que en los cultivos libres de reguladores y el proveniente de 0.1 ANA, se formaron nuevos brotes a partir de los preformados, 20 brotes y plántulas en 180 días de cultivo. Al día 135 de cultivo se oxidaron todos los brotes en el tratamiento libre de reguladores, por lo que se perdieron los brotes, en este caso la oxidación fue letal. Comparado con el resultado de los explantes cuando estaban adicionados con 0.5 y 1 BA, que no formaron brotes y sí se oxidaron, al cambiarlos a medio basal al 50 % formaron brotes. Esto puede indicar dos cosas, primero que la oxidación no fue letal, ya que los explantes formaron brotes, y que el impulso hormonal que se dio, al igual que en los tratamientos con 0.1/1 y 0.5 ANA, fue necesario en estas concentraciones para permitir que los explantes reaccionaran durante su cultivo en medio basal y formaran brotes. Cabe mencionar que a pesar de que se dio una morfogénesis, produjo sólo 3 brotes en ambos tratamientos (0.5 y 1 BA), siendo la menor formación de brotes a diferencia de los otros tratamientos donde también hubo respuesta (Tabla 14).

Tabla 14. Brotes generados a partir de segmentos de hoja de *L. gouldiana*, en medio MS en cajas Petri. Resultados a los 180 días de cultivo.

Provenientes de ANA/BA mg/L	No. total de brotes	Explantos sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	0	5	0
0/0.5	3	15	0.2
0/1	3	10	0.3
0.1/0	20	20	1
0.1/0.5	8	15	0.53
0.1/1	20	20	1
0.5/0	13	15	0.87
0.5/0.5	0	15	0
0.5/1	0	5	0



Figura 12. Cultivos de hojas en medio basal MS 50 %. a) Brotes formados a partir de explantes oxidados y brotes nuevos formados a partir de yemas laterales de brotes previamente formados, (105 días de cultivo). b) Incremento en talla y en número de plántulas después de 180 días de cultivo

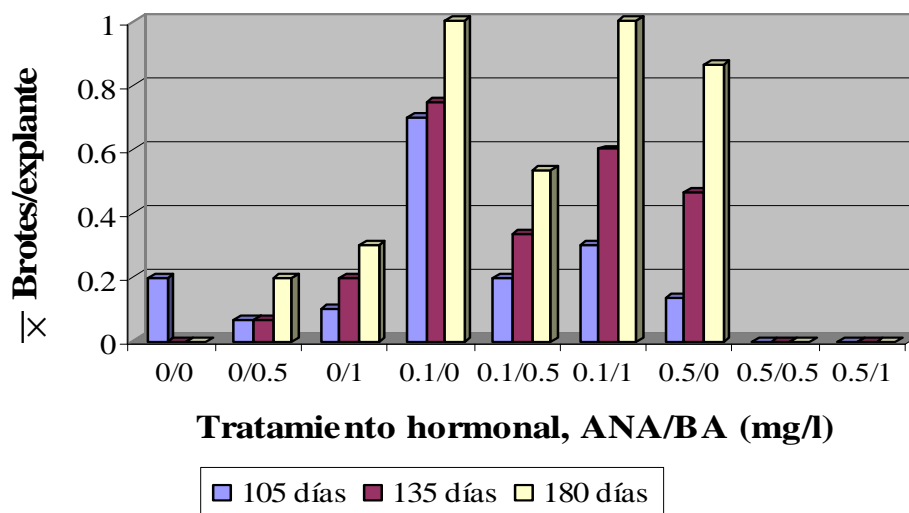


Figura 13. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hojas en medio MS, sembradas en cajas Petri, durante 105 días de multiplicación

Los explantes de hoja cultivados en frascos Gerber® al momento de la siembra mostraron una coloración verde y solamente en la porción donde se realizó la disección, en algunos explantes se apreció una ligera coloración blanquecina. Transcurridos los 10 días de cultivo los explantes no habían respondido morfogénicamente y tampoco incrementaron su tamaño, pero en 56 explantes (31.1 %) de los 180 cultivados, en todos los tratamientos, había señales de oxidación. La oxidación dentro de los primeros 10 días de cultivo fue el resultado de las heridas o cambios fisiológicos provenientes de la disección realizada para obtener el explante (Zaid, 1987).

La oxidación y la forma en que se desarrolló, no estuvo influenciada por los reguladores del crecimiento, ya que en todos los tratamientos incluyendo el libre de reguladores, los explantes se oxidaron.

Después de los 30 días de cultivo la oxidación siguió avanzado de manera gradual conforme lo descrito anteriormente, mientras que los explantes que antes de este período ya se encontraban totalmente oxidados, sólo variaron en la coloración, pasando de café casi translúcido a café oscuro. Esta oxidación gradual es considerada una expresión de los procesos de senescencia propios del tejido en las condiciones de cultivo (Zaid, 1987). Durante este tiempo también ocurrió la formación de brotes en dos tratamientos, con 0.1/1 mg/L ANA/BA, donde se formó un brote en el centro del explante, y con 0.5/1, se formaron dos PLB's cerca de la parte central del explante, de forma ovovada, coloración verde y de 0.2 cm de longitud; además de dos brotes, uno muy cercano a la parte superior del explante y otro en la parte central del explante (Figura 14a). Los brotes eran esféricos, con una coloración verde y una longitud entre 0.3 y 0.5 cm, además se observaban los primordios foliares. Posteriormente a los 60 días de cultivo en el tratamiento adicionado con 0.5/0.5, también surgió un brote de la parte inferior del explante, y en el tratamiento adicionado con 0.5/1 se formaron cuatro PLB's más (Figura 14e).

Al término del período de inducción (75 días), los explantes tenían una coloración café oscuro y no incrementaron su talla, es decir, conservaron su tamaño con respecto al momento de la siembra. Pese a esto se desarrollaron más brotes en los tratamientos que ya se habían generado y aparecieron brotes en dos tratamientos donde no habían surgido. En total se formaron 19 brotes en todos los tratamientos (Tabla 15). En el tratamiento libre de reguladores (Figura 14b) y el adicionado con 0.1/0.5, se desarrollaron brotes por primera vez

a los 75 días de cultivo (dos en cada tratamiento). En el tratamiento adicionado con 0.1/1, el brote que se había formado se oxidó al igual que el explante (Figura 14c). En el tratamiento adicionado con 0.5/1, al final del periodo de inducción, se formaron 9 brotes, de los cuales 6 provenían de PLB's. Uno de los brotes se desarrolló en plántula que medía 3 cm de longitud desde la raíz hasta el extremo superior de la hoja (Figura 14d); los brotes eran esféricos, con una coloración verde clara tendiendo a amarillo que adquirieron durante el cultivo y una longitud de 0.3 y 0.5 cm. Los 6 brotes que provenían de PLB's, eran alargados, de color verde claro en la base y verde más intenso en las hojas, con una talla de 0.4 a 1 cm (Figura 14f). Los tratamientos que generaron más brotes fueron el que tenía una combinación de 0.5/1 y 0.1/1 con 9 y 5 brotes por tratamiento, respectivamente (Figura 15).

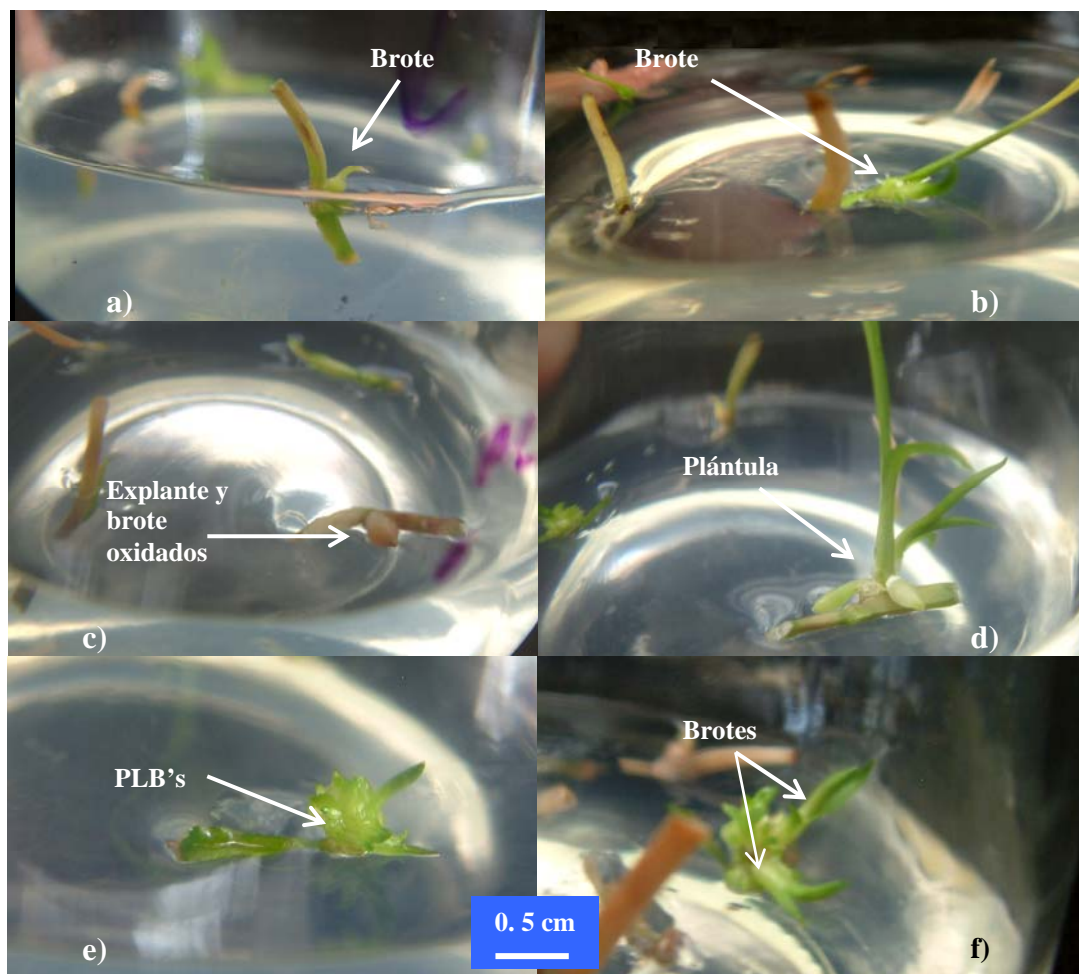


Figura 14. a) Formación de brote en parte central a 30 días (0.5/1); b) formación de brotes a 75 días de cultivo; c) explante y brote oxidado (0.1/1) a 75 días de cultivo; d) desarrollo de plántula de 3 cm a 75 días de cultivo; e) PLB's (0.5/1) a 60 días de cultivo, y f) brotes provenientes de PLB's, a 75 días.

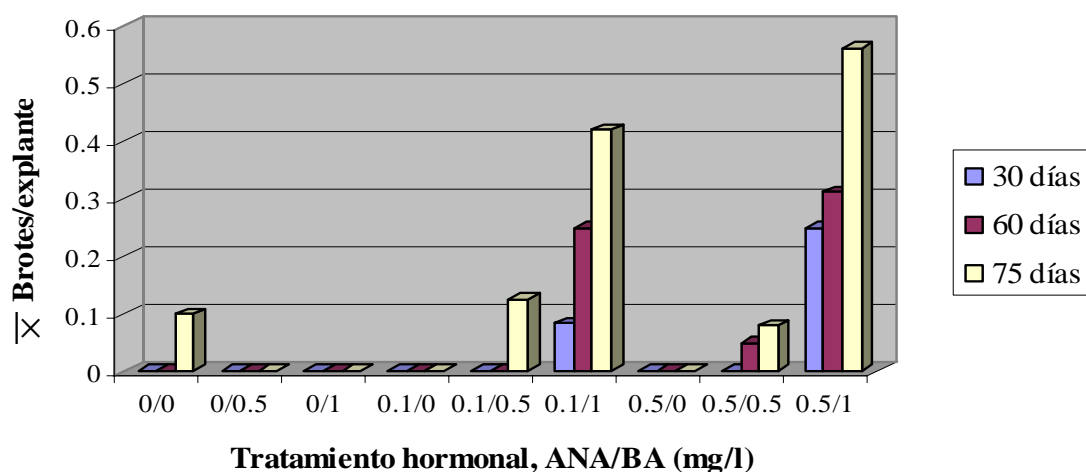


Figura 15. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hojas en medio MS, sembradas en frascos Gerber®, durante 75 días de cultivo en inducción.

Tabla 15. Brotes generados a partir de segmentos de hoja de *L. gouldiana*, en medio MS en frascos Gerber®. Resultados a los 75 días de cultivo.

Tratamiento ANA/BA mg/L	No. total de brotes	Explantos sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	2	20	0.1
0/0.5	0	16	0
0/1	0	16	0
0.1/0	0	20	0
0.1/0.5	2	16	0.13
0.1/1	5	12	0.42
0.5/0	0	20	0
0.5/0.5	1	12	0.08
0.5/1	9	16	0.56

Después de los 105 días de cultivo, 30 días en medio basal, 132 de 140 explantes que habían sobrevivido al período de inducción, finalmente se oxidaron (Figura 16a). Adquirieron una coloración café y los bordes donde fueron disectados se tornaron más oscuros. Los explantes que conservaban algunos pigmentos fotosintéticos regeneraron brotes, como en el tratamiento adicionado con 0.5 ANA, donde se generó un brote, el cual creció en la porción central del explante (Figura 16b). En el tratamiento con 0.1/0.5, se generaron cuatro brotes (en un explante) también en la porción central del explante (Figura 16c).

Transcurridos los 180 días de cultivo, 105 días en medio basal, los brotes y plántulas regenerados incrementaron su talla, se formaron nuevos brotes a partir de las plántulas preexistentes y todos los explantes terminaron por oxidarse. El número de brotes y de plántulas al final del periodo de multiplicación (105 días), fue de 53, siendo el tratamiento adicionado con 0.5/1, donde se generaron más con 23 brotes y plántulas, además de ser el de mayor \bar{X} de brotes por explante (Figura 17), seguido del tratamiento libre de reguladores con 11 brotes y plántulas (Tabla 16). Las plántulas alcanzaron una longitud en general para todos los tratamientos de 1 a 7 cm (Figura 16d).

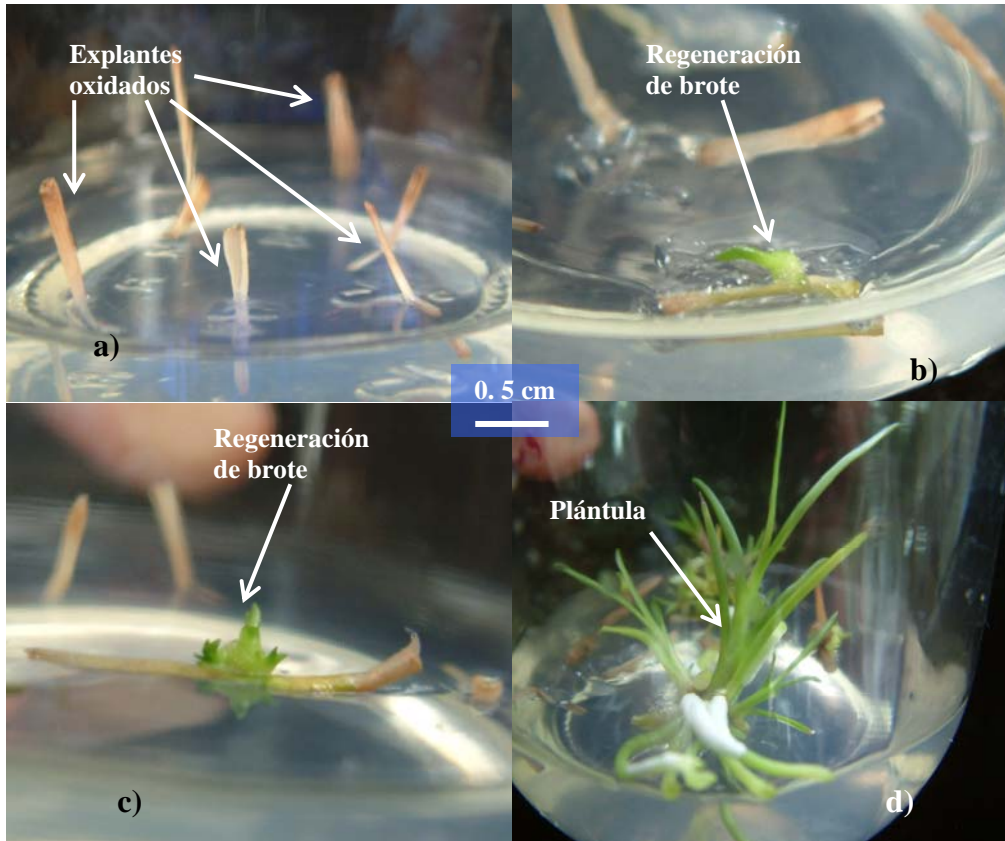


Figura 16. Cultivos de hoja en frascos Gerber®. a) Explantes con oxidación a 105 días; b) regeneración de un brote (0.5 ANA) a 105 días; c) regeneración de 4 brotes (0.1/0.5) con 105 días, y d) plántula de 7 cm de longitud después de 180 días de cultivo.

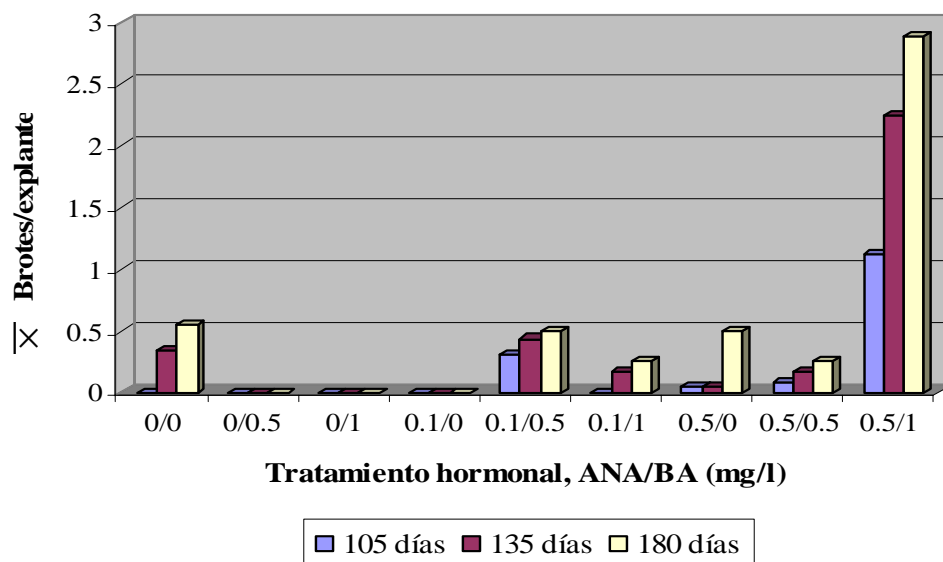


Figura 17. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hojas en medio MS, sembradas en frascos Gerber®, durante 180 días de cultivo.

Tabla 16. Brotes generados a partir de segmentos de hoja de *L. gouldiana*, en medio MS en frascos Gerber®. Resultados a los 180 días de cultivo.

Provenientes de ANA/BA mg/L	No. total de brotes	Explantos sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	11	20	0.55
0/0.5	0	16	0
0/1	0	8	0
0.1/0	0	20	0
0.1/0.5	8	16	0.5
0.1/1	3	12	0.25
0.5/0	5	10	0.5
0.5/0.5	3	12	0.25
0.5/1	23	8	2.88

En cultivos de hoja en frascos Gerber® se necesitó la combinación previa a la siembra en medio basal de ANA y BA, para exponenciar la respuesta de brotes y plántulas, ya que el estímulo hormonal incrementó el número total de regenerantes de 19 brotes durante la siembra en inducción. Este número se elevó a 53 durante el cultivo en medio MS 50 % basal. La formación de brotes y PLB's ocurrió en la parte central y basal del explante. Esto concuerda con lo reportado por Nayak y cols. (1997a) en la orquídea *Acampe praemorsa*, donde se evaluó la brotación en segmentos de hojas, tanto de la parte distal, como de la parte proximal al pseudobulbo y sólo se obtuvo respuesta en esta última. Observaron que la porción basal de la hoja, es la parte del explante de hoja, que tiene un mayor potencial morfogénico para generar brotes.

Murthy y Pyati (2001), en *Aerides maculosum*, regeneraron PLB's únicamente en la parte basal de la hoja y no en ápice o en la superficie del explante de hoja, los estudios anatómicos revelaron que la diferenciación empezó a partir de células subepidérmicas. Además se ha sugerido que la base de la hoja es generalmente una zona meristemática en las monocotiledóneas y en aislamiento y cultivo puede diferenciarse hacia plántulas (Murthy y Pyati, 2001). Sin embargo Churchill y cols (1973), obtuvieron PLB's sin mediación de callo, a partir de la parte superior de la hoja del híbrido *Laeliocattleya*. Chen y cols. (1999), también regeneraron PLB's a partir de ápice de hoja del híbrido *Oncidium Gower Ransey* y Chen y Chang (2001) regeneraron en mayor porcentaje PLB's en la parte apical de la hoja del híbrido antes mencionado *Oncidium Gower Ransey*, que de las otras zonas de la hoja como son la parte adaxial y abaxial, además de la zona de la disección del explante. La diferencia en la

zona donde se regeneren PLB's o brotes en explante de hoja, puede deberse a la especie bajo estudio (Churchill *et al.*, 1973).

La obtención de PLB's en orquídeas, se ha sugerido en la literatura, a reserva de que se hagan más estudios histológicos, que es una manifestación de la embriogénesis somática, pero hay poca información sobre los factores que inducen y controlan este proceso (Morel, 1974; Vaz *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Suárez, 2006). Los PLB's son masas de tejido esférico o nodular, semejantes a protocormos (Tisserat y Jones, 1999). Chen y cols. (1999), en el híbrido *Oncidium* Gower Ramsey, obtuvieron embriones somáticos o PLB's, mediante la adición de TDZ y 2,4-D, determinando que las concentraciones óptimas iban de 0.1-1 mg/L TDZ sin la presencia de 2,4-D. Sin embargo la combinación de ambos reguladores, sí generó PLB's, en concentraciones de 3/1, 3/3 y 3/0.3 mg/L 2,4-D/TDZ. En *Phalaenopsis amabilis* se regeneraron embriones somáticos con la adición de ANA y TDZ, con un óptimo de 3 mg/L TDZ, seguido de 0.1/3 y 1/3 mg/L ANA/TDZ (Chen y Chang, 2006), que son concentraciones similares a las obtenidas en el presente estudio de 0.5/1, donde se dio la formación de PLB's, de forma ovovada y coloración verde. Este resultado también coincide con los cultivos de hojas en híbridos de *Phalaenopsis*, donde se generó un máximo de PLB's con el suplemento de 5.4/88.8 μ M ANA/BA (Park *et al.*, 2002). Arditti y Ernst (1993), observaron que la adición de 0.5 a 3.0 ppm de ANA en combinación con 2 ppm de BA inducía la formación de PLB's en secciones basales de hoja en *Phalaenopsis*.

Los resultados en *Laelia gouldiana*, en cuanto a la formación de brotes, estuvieron influenciados por la combinación de ANA y BA, siendo el óptimo 0.5/1, donde se dio el mayor \bar{X} de brotes/explante (2.88). Lo anterior coincide con lo reportado por Nayak y cols. (1997), en el cual las combinaciones de ANA y TDZ promovieron el crecimiento de brotes y la expansión de hojas, en el cultivo de hojas de *Acampe praemorsa*, obteniendo el mayor \bar{X} de brotes/explante con 0.5/1 mg/L ANA/TDZ y 1 mg/L TDZ, seguido de 1/1 mg/L ANA/TDZ, de 23 combinaciones que ensayaron. Además las combinaciones de ANA y BA, lograron porcentajes elevados de regeneración, esto indica que la interacción de auxina/citocinina estimuló la brotación. También se reportó resultados muy similares en los híbridos *Paphiopedilum* PH59 y PH60, donde se formaron 2 brotes/explante con la combinación de 4.52/4.54 μ M 2,4-D/TDZ, lo que para el primer híbrido mencionado fue su mejor \bar{X} y para el segundo híbrido resultó su segundo mayor \bar{X} (Chen *et al.*, 2004). En

Oncidium bifolium, se regeneraron yemas adventicias con la combinación de 0.01/1 mg/L 2,4-D/TDZ, pero se vio disminuida la respuesta con esta combinación, formándose yemas de coloración blanca amarillenta que luego murieron (Flachsland *et al.*, 2001). A pesar de este último dato, la combinación en un balance adecuado de auxina/citocinina, se ha reportado que interactúan para controlar procesos como el desarrollo de brotes y raíces, alcanzando elevadas tasas de proliferación (Coenen y Lomax, 1997; Borkowska, 2003; Nordström *et al.*, 2004). Skoog y Miller, demostraron que el balance adecuado entre ambos reguladores del crecimiento coordina la organogénesis *in vitro*, ya que bajas concentraciones de auxina/citocinina promueve el desarrollo de brotes (George y Sherrington, 1984; Nordström *et al.*, 2004).

En cuanto al envase usado para la siembra, se ha recomendado para el cultivo de secciones de hoja, envases con un volumen de 125 mL (Arditti, 1977), semejante al empleado en este estudio de 100 mL. Esto es entendible al comparar el mayor \bar{X} de brotes por explante obtenido en este estudio, en el cultivo de hoja en caja Petri con 0.1 ANA que fue de 1 brote/explante, y el cultivo de hoja en frasco Gerber® con 0.5/1.

En la actualidad el cultivo de hojas o secciones de láminas foliares es utilizado para micropropagar orquídeas monopódicas como *Phalaenopsis* y *Vanda* principalmente (Flachsland *et al.*, 2001), pero dado que no se conocen por completo los procesos que regulan el cultivo de hojas, es necesario realizar más estudios, como el presente, para entenderlos y conocer las necesidades específicas de cada especie, además de tener otra alternativa de explante y de esta manera evitar dañar y sacrificar a la planta completa (Churchill *et al.*, 1973; Arditti, 1977).

Cultivos de segmentos de tallo

Los cultivos de tallo en cajas Petri, al momento de la siembra tenían una coloración verde con algunos restos de hojas que envolvían al tallo, los cuales daban una coloración más clara al tallo por ser casi translúcidos. A los 10 días de cultivo los explantes no generaron alguna respuesta, pero su coloración empezó a tornarse a un verde más claro y en los tratamientos con 0.5 mg/L BA, 1 BA y 0.5 ANA se observaron indicios de oxidación o se habían tornado de color blanco en las partes donde se seccionó el tejido (Figura 18a). A 45 días de cultivo, 59 (40.7 %) de 145 explantes que no se habían contaminado mostraron señales de oxidación siendo el tratamiento con 0.5 BA el que presentó mayor oxidación con 14 de los 20 cultivados. Los explantes que no evidenciaban algún grado de oxidación adquirieron una coloración de verde oscuro a verde olivo. Los cultivos de tallo en todos los tratamientos regeneraron 29 brotes (Figura 18b), siendo el adicionado con 1 BA donde se generaron más brotes/tratamiento (6). Por otro lado, los explantes de los tratamientos con 0.5 BA y 0.1/1 mg/L ANA/BA fueron los que formaron menos brotes, con un brote en cada uno. Con 0.5 ANA, hubo un explante que tenía dos brotes en desarrollo, pero se oxidaron muy rápido (Figura 18c). Al día 60 de cultivo se incrementó el número de brotes a 55 y éstos comenzaron a desarrollarse en plántulas. En los tratamientos adicionados con 0.5 BA (Figura 18d) y 0.1 ANA (Figura 18e), se formaron masas de PLB's, éstos tenían una apariencia compacta poco friable, la coloración era verde, de forma esférica y con una talla de 0.1 a 0.2 cm.

Después de los 75 días de cultivo en medio de inducción, 100 (76.9 %) de 130 explantes se oxidaron (Tabla 18). En total se obtuvieron 148 brotes; el mayor número de regenerantes se logró en el tratamiento libre de reguladores (32 brotes), seguido del adicionado con 0.5 BA (30 brotes) (Tabla 17), pese a esto, el tratamiento con el mayor \bar{X} de brotes por explante se logró con 1 BA (2.4 brotes/explante) (Figura 19). Esto se debió a que al final del período de inducción sólo sobrevivieron cinco explantes y en ellos se formaron 12 brotes, mientras que en el tratamiento libre de reguladores sobrevivieron 15 explantes y se formaron 32 brotes (Tabla 17). La respuesta morfogénica evaluada a lo largo de los 75 días de inducción, fue una morfogénesis directa, ya que a partir de los explantes de tallo, se empezaron a formar brotes de 0.3 a 6 cm de longitud, y la formación de dos grupos de PLB's que también se obtuvieron por vía directa. Los dos grupos o masas de PLB's al término del período de inducción no habían elongado las hojas, por lo que no se contabilizaron en el total de brotes por explante.



Figura 18. Segmentos de tallo cultivados en cajas Petri, a) después de 10 días de cultivo, mostrando inicios de oxidación; b) formación de brotes a los 45 días de cultivo en un explante hiperhidratado; c) oxidación de brotes y explante a 45 días de cultivo; d) formación de masa de PLB's en tratamiento 0.5 BA, y f) formación de masa de PLB's en tratamiento 0.1 ANA.

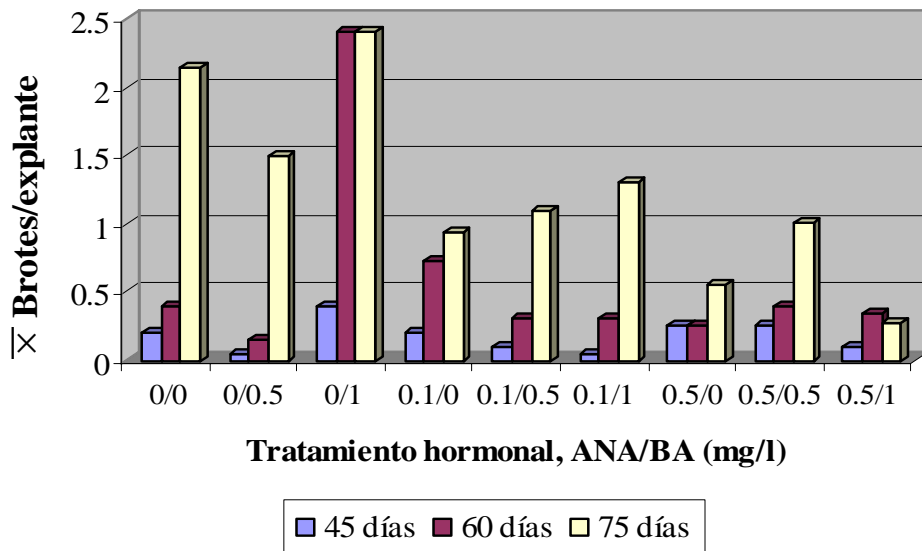


Figura 19. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS, sembrados en cajas Petri. Resultados a los 75 días de iniciados los cultivos.

Tabla 17. Brotes generados a partir de segmentos de tallo de *L. gouldiana*, en medio MS en cajas Petri. Resultados a los 75 días de cultivo.

Tratamiento ANA/BA mg/L	No. total de brotes	Explantes sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	32	15	2,13
0/0.5	30	20	1,5
0/1	12	5	2,4
0.1/0	14	15	0,93
0.1/0.5	22	20	1,1
0.1/1	13	10	1,3
0.5/0	11	20	0,55
0.5/0.5	10	10	1
0.5/1	4	15	0,27

Tabla 18. Total de explantes oxidados en cada tratamiento al final del período de inducción (75 días), para los cultivos en frascos Gerber® y cajas Petri.

Tipo de envase Tratamiento (mg/L)	Caja Petri		Frasco Gerber®	
	Oxidados (%)	Sin oxidar	Oxidados (%)	Sin oxidar
Control	10 (66.7)	5	6 (30)	14
0.5 BA	18 (90)	2	8 (50)	8
1 BA	5 (100)	0	7 (43.75)	9
0.1 ANA	10 (66.7)	5	4 (25)	12
0.1/0.5 ANA/BA	10 (50)	10	7 (43.75)	9
0.1/1 ANA/BA	10 (100)	0	11 (55)	9
0.5 ANA	16 (80)	4	6 (30)	14
0.5/0.5 ANA/BA	10 (100)	0	7 (43.75)	9
0.5/1 ANA/BA	11 (73.3)	4	7 (43.75)	9

Después del periodo de inducción (75 días), se subcultivaron los brotes y plántulas regenerados a medio MS basal 50%. Transcurridos los 105 días de cultivo, el número de brotes disminuyó de 148 a 121, siendo el tratamiento que provenía de la adición de 0.5 BA, el que tenía mayor número de brotes. Este descenso en el número de brotes se debió a problemas de contaminación por errores de manipulación al momento del subcultivo. La contaminación ocurrió en los cultivos que provenían de los tratamientos 0/1, 0.1/0.5, 0.5/0.5 y el libre de reguladores. Posteriormente los cultivos incrementaron el número de brotes y al cabo de 180 días, se habían formado un total de 185 regenerantes (Tabla 19). Éstos se generaron a partir de las yemas laterales de plántulas y brotes previamente formadas durante el período de inducción, alcanzando longitudes de 14 cm (Figura 20a) y un \bar{X} de 6.3 cm. Además se originaron dos brotes a partir de un brote que estaba completamente oxidado, esto ocurrió en el tratamiento que provenía de 0.5 BA, lo que indicó que la oxidación en este caso no fue letal, pero sí en los demás explantes y brotes que se oxidaron (Figura 20b). Los PLB's que se formaron en el período de inducción en el tratamiento 0.1 ANA, se diferenciaron en brotes a los 105 días de cultivo, esto se apreciaba por la emergencia de las hojas y a los 180 días de cultivo ya se habían desarrollado en plántulas completas (Figura 20c). Los PLB's provenientes del tratamiento con 0.5 BA empezaron a elongar sus hojas a los 135 días de cultivo y al día 180 no se había formado todavía alguna plántula, únicamente habían incrementado su tamaño en pocos milímetros (Figura 20d). El tratamiento que presentó el \bar{X} de brotes/explante más elevado fue el que provenía del tratamiento con 0.1/1, con 45 brotes; seguido del libre de reguladores con 33 brotes (Figura 21).

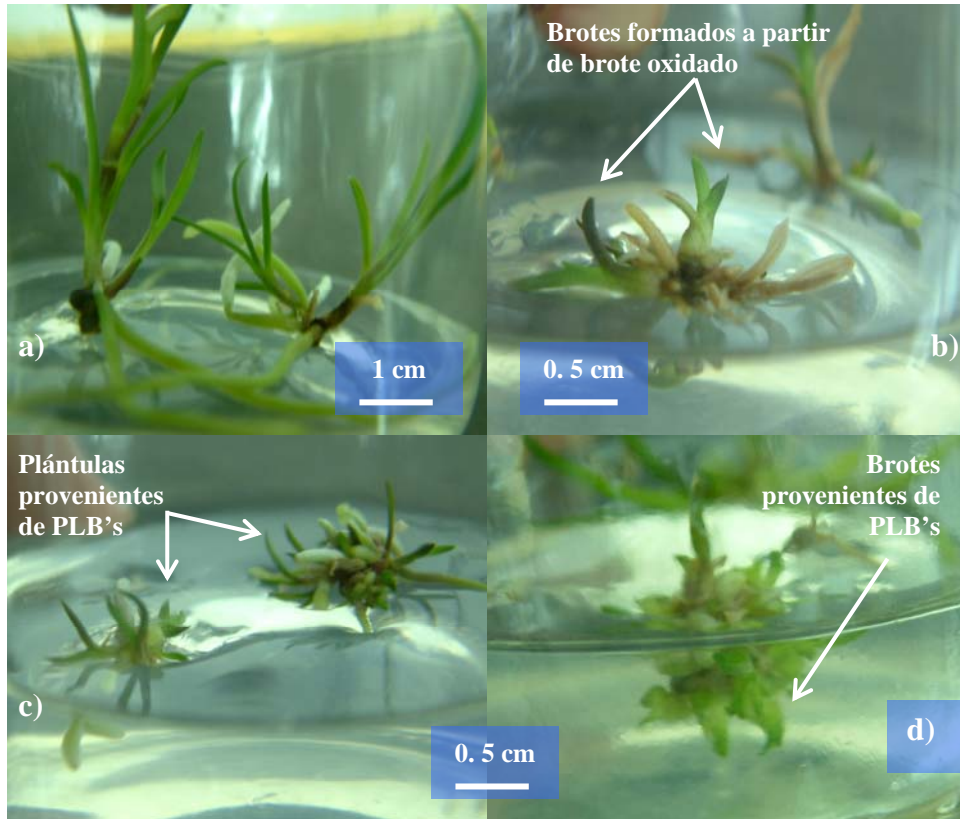


Figura 20. Cultivos de tallo después de 180 días de cultivo. a) Plántulas de 14 cm de longitud; b) formación de un brotes a partir de brote oxidado; c) plántulas provenientes de PLB's (0.1 ANA); d) brotes provenientes de PLB's (0.5 BA).

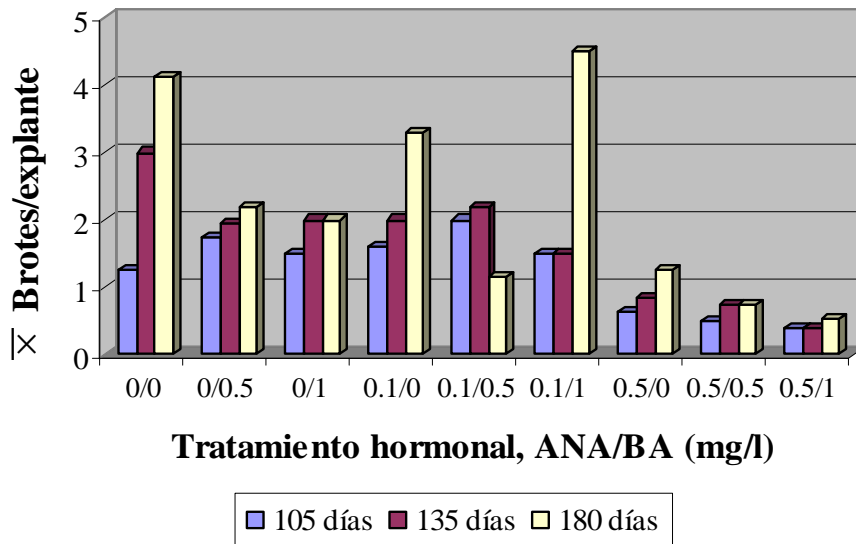


Figura 21. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS, sembrados en cajas Petri. Resultados a 180 días de iniciados los cultivos.

Tabla 19. Brotes generados a partir de segmentos de tallo de *L. gouldiana*, en medio MS en cajas Petri. Resultados a los 180 días de cultivo.

Provenientes de ANA/BA mg/L	No. total de brotes	Explantos sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	33	8	4.13
0/0.5	33	15	2.2
0/1	8	4	2
0.1/0	23	7	3.3
0.1/0.5	7	6	1.2
0.1/1	45	10	4.5
0.5/0	25	20	1.25
0.5/0.5	3	4	0.75
0.5/1	8	15	0.53

El tratamiento previamente adicionado con 0.1/1, incrementó el número de brotes formados de 13 a 45, del día 75 al 180 de cultivo, siendo el que tuvo el mayor número de brotes formados y el de mayor \bar{X} brotes/explante (Tabla 19). El incremento que presentó pudo deberse al pulso hormonal que recibió de la combinación de los reguladores del crecimiento y su efecto residual una vez sembrados los explantes en medio basal. En relación a los explantes y brotes del tratamiento libre de reguladores, a pesar de la disminución de brotes debido a problemas de contaminación, se generaron más brotes, aumentando de 10 brotes después de los 105 días de cultivo a 33 brotes al término de los 180 días de cultivo. Un caso contrario fue el tratamiento previamente adicionado con 1 BA; que cuando se encontraba en medio de inducción fue el mejor tratamiento y no se pudo recuperar al problema de la disminución de brotes por la contaminación, como el tratamiento libre de reguladores, y sólo generó dos brotes más durante su cultivo en medio basal. Esto indicó que la morfogénesis en este caso particular fue dependiente de la adición de 1 BA, sin subsiguiente subcultivo a medio basal.

La respuesta morfogénica en los cultivos de tallo no estuvo asociada a la presencia de los reguladores del crecimiento, visible en el tratamiento libre de reguladores. Sin embargo esta respuesta fue estimulada apreciándose en los tratamientos adicionados con 1 BA y en 0.1/0.5 (después de los 75 días de cultivo), que fueron los cultivos junto al libre de reguladores que generaron más brotes. Además, el pulso hormonal es necesario en los explantes provenientes del tratamiento 0.1/1, para que regeneren brotes una vez en medio basal y después de 180 días de cultivo. Los resultados son parecidos a lo presentado por Nguyen y Tran (2006), pues en uno de los dos híbridos de *Dendrobium* que estudiaron, el D36, el mayor número de

brotos/explante, previa formación de PLB's, lo presentó el tratamiento de 1 mg/L de BA, como ocurrió en el presente estudio después de 75 días de cultivo en el tratamiento con 1 mg/L BA. Esto también coincide con Geetha y Shetty (2000), en cultivos de tallo de *Vanilla planifolia*, donde la mayor proliferación de brotes se logró con 1 mg/L BA después de 10 semanas. Pero en el trabajo de Nguyen y Tran (2006), fue más significativo el incremento de brotes, cuando se adicionaron al medio tanto BA como ANA, resultado obtenido en el otro híbrido estudiado, *Dendrobium* D16, con 1/1 mg/L ANA/BA; ya que como mencionan los autores, la aplicación de ambos reguladores, promueve una mayor brotación, que cuando se usan individualmente. Esto se debe a que la interacción de ambos reguladores estimula el desarrollo de brotes, ya que pueden tener efectos sinérgicos en procesos como la división celular (Coenen y Lomax, 1997; Nordström *et al.*, 2004). Esto ocurrió en el presente estudio, con la combinación de 0.1/1, y fue como ya se mencionó, el mejor tratamiento al final de 180 días de cultivo. También Shiau y cols. (2005), en cultivos en medio líquido de segmentos nodales de tallos de *Dendrobium candidum*, obtuvieron la segunda mayor brotación con la combinación de 0.1/1 mg/L ANA/BA. George y Sherrington (1984), argumentan que altas concentraciones de citocininas y bajas de auxinas promueven la proliferación de yemas axilares o laterales. Esto puede ser porque las citocininas estimulan el transporte de auxina en el tallo a los brotes laterales estimulando su desarrollo (Jankiewicz, 2003). Es muy posible que algo similar haya ocurrido con *L. gouldiana*, ya que en los explantes de tallo había yemas laterales que con la combinación de ANA y BA en el medio, estimuló el desarrollo y crecimiento de las yemas, logrando que se diferenciaron a brotes. También Basker y Narmatha Bai (2006), obtuvieron resultados muy parecidos a los presentados en este trabajo, en cultivos de segmentos de pseudobulbos de *Coelogyne stricta*, obtuvieron un incremento y desarrollo considerable en la producción de plántulas en cuanto a longitud de brotes y raíces, con la combinación de 1/2 mg/L ANA/BA, y de igual forma con esta concentración y con concentraciones de 1 a 2 mg/L BA sin ANA, éstas fueron favorables para incrementar la brotación múltiple, como lo obtenido en el presente estudio con 0.5 y 1 BA a los 75 días de cultivo.

Las concentraciones de 0.5 BA y 0.1 ANA por separado, estimularon la formación de PLB's, en *L. gouldiana*. Se ha reportado a partir de explantes de tallo la formación de un elevado porcentaje de PLB's, en el híbrido *Dendrobium* var. *semialba*, con la adición de 0.5 mg/L ANA. Esto indica que con bajas concentraciones de ANA, se estimula la formación de PLB's

en segmentos de tallos (Kim y Kim, 2003). También con la adición de citocininas se ha observado que promueven la formación de PLB's, como lo encontrado por Torres y Mogollón (2000), en *Cattleya mossiae*, cuando ensayaron el efecto residual del TDZ en brotes obtenidos de tallos. Esto se logró cuando se añadió 6.6 $\mu\text{M/L}$ TDZ en el primer o en ambos subcultivos. Sin embargo, la combinación de auxina/citocinina, promueve la formación de PLB's, como lo obtenido por Jo y cols. (2006) con segmentos basales de tallo de un híbrido de *Phalaenopsis*, (1/5 mg/L ANA/2iP) y en los híbridos de *Dendrobium*: Earsakul y Omyapink, donde los porcentajes más elevados de explantes con PLB's se obtuvieron con 0.1/0.5 y 0.5/0.5 mg/L ANA/BA respectivamente.

Pese a esto, hay otros factores que intervienen en la embriogénesis como la fuente de nitrógeno, que es importante en el desarrollo de masas embriogénicas (Thorpe, 1998); además la concentración de carbohidratos en el medio de cultivo, se ha visto que es un factor importante que favorece la embriogénesis, e incluso en condiciones mixotróficas o heterotróficas, se prefieren PLB's que brotes (Ogasawara *et al.*, 1995).

Los explantes en los cultivos de tallo en frascos Gerber®, al momento de la siembra tenían una coloración verde y en la base la coloración era verde pardo, debido a los restos de hojas y raíces que no se pudieron eliminar en la disección. Transcurridos los 10 días de cultivo, los explantes no cambiaron su coloración, sólo se hizo más notorio el color verde pardo de la base a un café y en algunos casos café oscuro, lo que indica que los restos de hoja y raíces que quedaron se oxidaron, además de que fueron los lugares donde se hicieron las disecciones del explante. Estos factores provocaron la liberación al medio de compuestos fenólicos por parte de los explantes, que son los responsables de la oxidación de los mismos (Murthy y Pyati, 2001). Durante estos 10 primeros días de cultivo, las yemas laterales de los explantes comenzaron a activar su crecimiento en todos los tratamientos (Figura 22 a y b), desarrollándose en brotes y alcanzando longitudes de 1 cm (Figura 22c, d y e). Las yemas laterales de los tallos, surgían de la base del mismo (Figura 22a) o también de los nudos (Figura 22b). Se formaron 122 brotes después de 10 días de cultivo.

A los 30 días de cultivo los explantes adquirieron una coloración verde pardo, pero prevalecía el verde; sólo había 6 explantes oxidados en dos tratamientos: 0.5 mg/L BA con uno y 0.5/1 mg/L ANA/BA con cinco explantes (Figura 23a). Los explantes no incrementaron su longitud aunque en el tratamiento libre de reguladores (2 brotes), el adicionado con 0.1/0.5 (1 brote), 0.5 ANA (2 brotes) y 0.5/1 (1 brote), seis explantes estaban hiperhidratados (Figura 23b) e incrementaron su grosor de 0.3 cm en \bar{X} a 0.6 cm. En dos de ellos que se encontraban en los tratamientos adicionados con 0.5 BA y 0.5 ANA, empezaron a surgir hojas de la parte superior del explante (Figura 23c). Además en el tratamiento adicionado con 0.5 ANA se dio la formación de una masa de PLB's que surgía de la parte superior del explante, en apariencia eran tres cuerpos esféricos, verdes, brillantes y medían 0.2 cm de diámetro (Figura 23d). Las yemas laterales continuaban desarrollándose y surgiendo nuevas, se incrementó el número de brotes formados de 122 a 211, con una longitud \bar{X} de 1.3 cm (Figura 23e) y también comenzaron a desarrollarse los brotes en plántulas (Figura 23f).

Después de los 60 días, 53 (34.2 %) de 155 explantes que habían sobrevivido después de este tiempo, se oxidaron. El incremento de brotes no fue tan elevado de los días 30 al 60 de cultivo, como en los primeros 30 días de cultivo. En este período sólo se formaron 15 nuevos brotes para un total de 226 brotes y plántulas formados, siendo en tratamiento adicionado con 0.1 ANA donde había más brotes formados (46), seguido del adicionado con 0.5 ANA (39

brotos), además este último tratamiento fue donde se incrementó más la formación de nuevos brotes del día 30 a 60 de cultivo (10 brotes).

Al término del período de inducción (75 días de cultivo), 63 (40.4 %) de 156 explantes se oxidaron (Tabla 18), y el tratamiento donde más explantes se oxidaron fue el adicionado con 0.1/1, con 11 explantes oxidados. En 25 de los explantes oxidados, las yemas y brotes que estaban en el explante se oxidaron o presentaron indicios de oxidación (Figura 24a). El grupo de PLB's que se había formado en el tratamiento con 0.5 ANA, no había elongado sus hojas y tallo aún, pero incrementaron su tamaño de 0.2 cm a 0.3 y 0.4 cm. Aparentemente también se incrementó el número de PLB's (de tres a cinco), en la base del explante se formó un brote de 1 cm de longitud (Figura 24b). Además de este grupo de PLB's, se formaron dos grupos más, los cuales provenían del tratamiento adicionado con 0.1 ANA. Ambos grupos surgieron de la base del explante y de los brotes y plántulas que ya se habían formado, posiblemente de una yema lateral, que aunque permanecía inactiva, con el pulso hormonal puede formar nuevas estructuras como PLB's (Hurtado y Merino, 1987; Thorpe, 1998). Un grupo de nueve PLB's, tenía forma alargada, coloración verde claro y verde más intenso en el ápice, lo que indicó que ya se estaban formando los primordios foliares, éstos medían 0.2 cm de longitud (Figura 24c). En el otro grupo de 13 PLB's, eran más esféricos y de un color verde claro uniforme, de 0.1 cm de longitud (Figura 24d). El número de brotes y plántulas que se formaron incrementó a 18 brotes nuevos (de 226 a 244 brotes) (Tabla 20), con una longitud \bar{X} de 3.3 cm, alcanzando tallas de 10 cm desde el ápice de la raíz hasta la parte superior de la hoja más larga. El tratamiento adicionado con 0.1 ANA fue el que tuvo el mayor número de regenerantes con 70 y el mayor \bar{X} de brotes/explante con 4.375. El segundo tratamiento con más brotes formados fue el adicionado con 0.5/0.5, que pasó de 29 a 41 brotes y un \bar{X} de 2.56 brotes/explante (Figura 25).

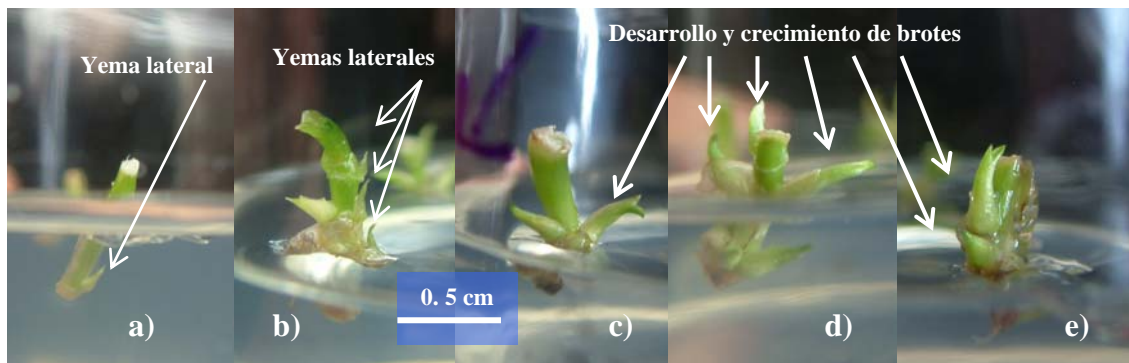


Figura 22. Formación de brotes a los 10 días de cultivo en medio de inducción. a) Yema lateral; b) yemas laterales y brote en la base; c) desarrollo de brotes surgiendo de la base del tallo; d) brotación múltiple, y e) Formación de brotes surgiendo de base y nudos.

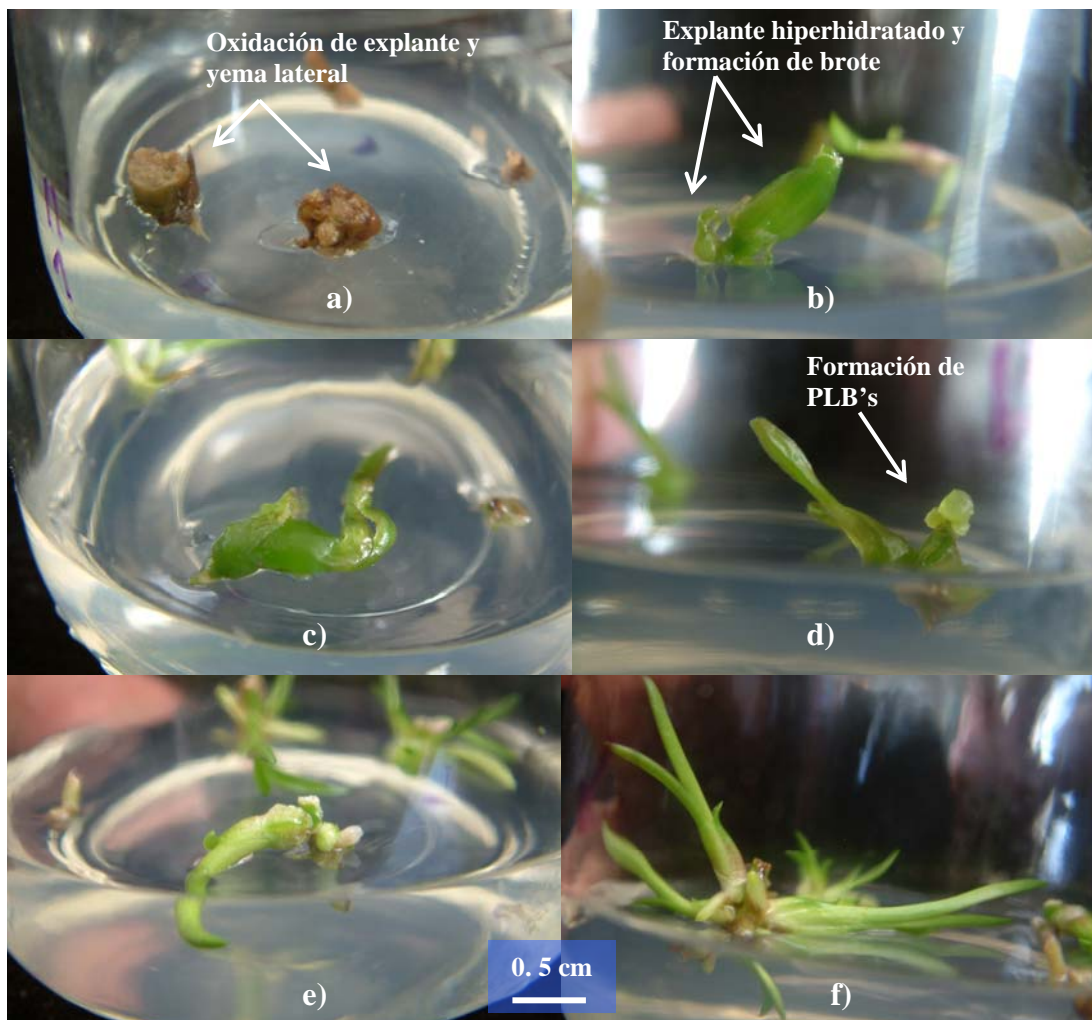


Figura 23. Cultivos después de 30 días. a) Explantes y yemas oxidadas; b) explante hiperhidratado con brote en base; c) Explante hiperhidratado y emergencia de hojas a partir de parte superior; d) Formación de PLB's (0.5 ANA); e) brote de 1.3 cm de longitud, y f) desarrollo de plántulas.

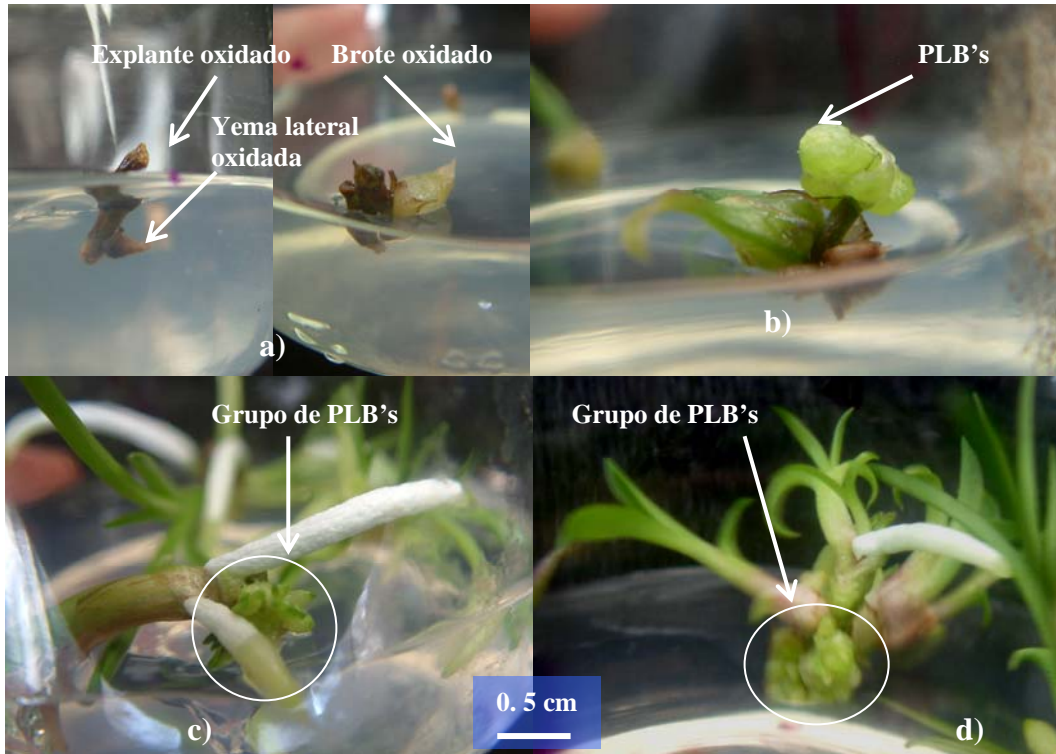


Figura 24. Cultivo de tallo después de 75 días de cultivo. a) Explantes, yemas y brote oxidados; b) incremento de talla y número de PLB's del tratamiento 0.5 ANA; c) formación de PLB's en tratamiento adicionado con 0.1 ANA surgiendo entre explante base de plántula y d) formación de grupo de PLB's a partir de base de plántulas.

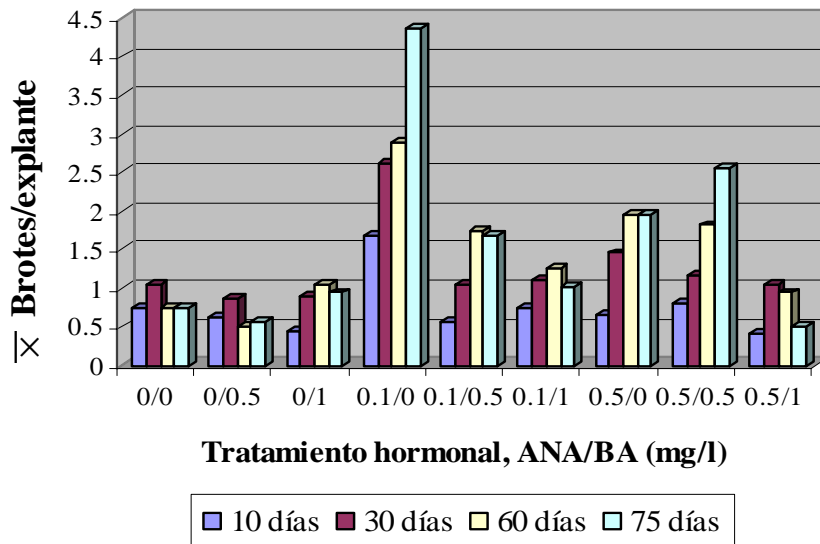


Figura 25. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS, sembrados en frascos Gerber®, durante 75 días de iniciados los cultivos.

Tabla 20. Brotes generados a partir de segmentos de tallo de *L. gouldiana*, en medio MS en frascos Gerber®. Resultados a los 75 días de cultivo.

Tratamiento ANA/BA mg/L	No. total de brotes	Explantos sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	15	20	0.75
0/0.5	9	16	0.56
0/1	15	16	0.94
0.1/0	70	16	4.38
0.1/0.5	27	16	1.69
0.1/1	20	20	1
0.5/0	39	20	1.95
0.5/0.5	41	16	2.56
0.5/1	8	16	0.5

Al igual que en los cultivos en cajas Petri, los explante, brotes, y plántulas regeneradas en frascos Gerber® se subcultivaron a medio MS basal 50 %. Después de los 30 días de cultivo en medio basal (105 días desde iniciados los cultivos), todos los explantes se oxidaron, pero esto no significó que fuera letal para todos los explantes. En los tratamientos adicionados con 0.5 y 1 BA, 0.1/1 y 0.5/1, se formó un explante oxidado por tratamiento, una masa de PLB's con características diferentes en cada caso. La masa de PLB's generada en el tratamiento con 0.5 BA, surgieron de la parte superior del explante, y parecían dos masas diferentes: una presentaba una coloración verde claro, eran esféricos pero alargados en el ápice y un diámetro de 0.1 a 0.2 cm como máximo, este grupo era el más numeroso con seis PLB's; del otro lado eran dos PLB's, la coloración era de un verde más intenso y brillante, esféricos, eran más grandes con un diámetro de 0.3 cm hasta 0.4 cm (Figura 26a). Los PLB's (8) del tratamiento adicionado con 1 BA, surgieron alrededor de una yema oxidada, eran verde claro con el ápice verde, esféricos terminando en punta, medían alrededor de 0.1 a 0.3 cm, el explante presentaba además un brote oxidado (Figura 26b). En el tratamiento adicionado con 0.1/1, la masa de PLB's (4) que se formó era compacta, poco friables y definidos, de color verde claro, surgieron a un lado de un brote oxidado y medían en conjunto 0.4 cm de longitud (Figura 26c). Los PLB's provenientes del tratamiento adicionado con 0.5/1, se formaron en la parte superior del explante, eran cinco PLB's, compactos de color verde claro, medían 0.1 cm de diámetro (Figura 26d). En el tratamiento adicionado con 0.5 ANA se formó un nuevo grupo de PLB's (14) que surgieron de la base de una plántula, a diferencia del otro grupo de PLB's que surgió de la parte superior del explante en este mismo tratamiento. Estos eran friables, de

color verde claro, esféricos con el ápice verde y medían 0.1 cm de longitud cada uno. Por debajo del medio ya empezaban a elongar sus hojas 4 PLB's que medían 0.4 cm de longitud (Figura 26e). Hay que mencionar que a pesar de que se formaron PLB's a partir de explantes o yemas oxidadas, también se oxidaron (6) brotes, esto sucedió en los tratamientos libres de reguladores, con 5 brotes oxidados, y el adicionado con 0.1/0.5, con 7 brotes oxidados. Pese a esto, el número de brotes se incrementó de 246 a 267 brotes e incluso en el tratamiento libre de reguladores se formaron 4 brotes a partir de un explante hiperhidratado. Éstos surgieron de la parte superior del explante y medían 1 cm de longitud (Figura 26f). También se desarrollaron brotes y plántulas a partir de los PLB's generados en los tratamientos con 0.1 y 0.5 ANA, los brotes medían de 0.5 a 0.9 cm (Figura 26g) y las plántulas entre 4.5 y 1 cm (Figura 26h).

Después de los 135 días de cultivo los PLB's formados en los tratamientos con 0.5 y 1 BA, y 0.1/1 y 0.5/1, comenzaron a desarrollarse. Esto se pudo apreciar por la emergencia de los primordios foliares; los brotes en estos tratamientos medían en \bar{X} 0.6 cm (Figura 27a). Solamente en el tratamiento con 1 BA, se formaron 5 PLB's más (Figura 27b).

Al término de los 180 días de los cultivos de tallo (105 días en medio basal), el número de brotes y plántulas incrementó a 307 (Tabla 21), con un \bar{X} de 5.1 cm de longitud (Figura 27c). Los cultivos provenientes de 0.1 ANA, fueron los que presentaron el mayor número de brotes (88) y el mayor \bar{X} de brotes por explante con 7.33; seguido del tratamiento con 0.5/0.5 (53 brotes) y 3.21 brotes/explante (Figura 28).

Tabla 21. Brotes generados a partir de segmentos de tallo de *L. gouldiana*, en medio MS en frascos Gerber®. Resultados a los 180 días de cultivo.

Provenientes de ANA/BA mg/L	No. total de brotes	Explantes sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	2	12	0.16
0/0.5	19	16	1.19
0/1	32	12	2.6
0.1/0	88	12	7.33
0.1/0.5	28	12	2.33
0.1/1	13	12	1.08
0.5/0	43	16	2.69
0.5/0.5	53	15	3.53
0.5/1	29	16	1.81

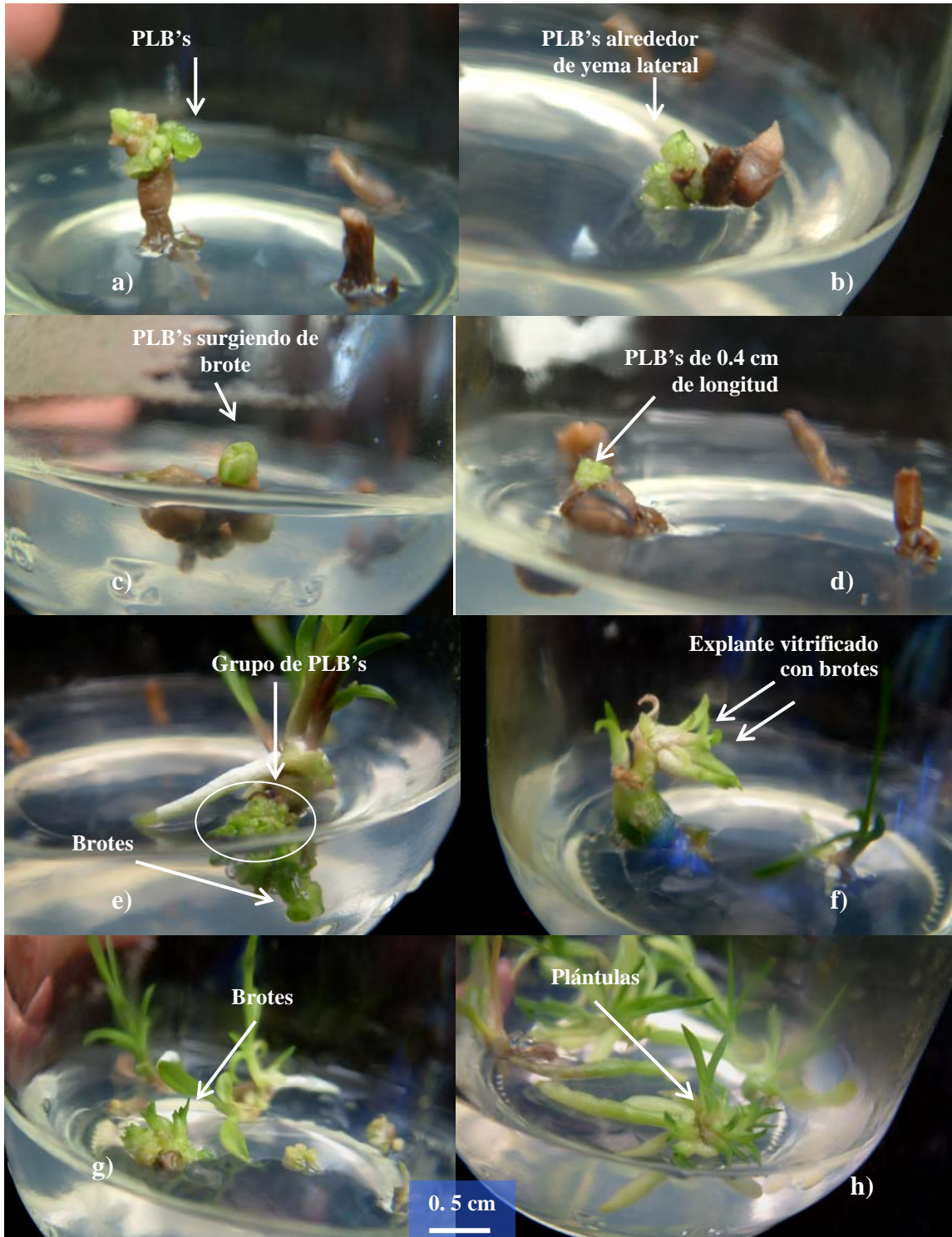


Figura 26. Cultivos de tallo después de 105 días. a) PLB's formados en explante oxidado (0.5 BA); b) PLB's alrededor de yema lateral (1 BA); c) PLB's generados a partir de brote (0.1/1); d) PLB's surgiendo en parte superior de explante (0.5/1); e) PLB's y brotes surgiendo en base de plántula (0.5 ANA); f) explante hiperhidratado con 4 brotes en la parte superior (libre de reguladores); g) brotes formados a partir de PLB's (0.1 y 0.5 ANA), y h) plántulas formadas a partir de PLB's (0.1 y 0.5 ANA).

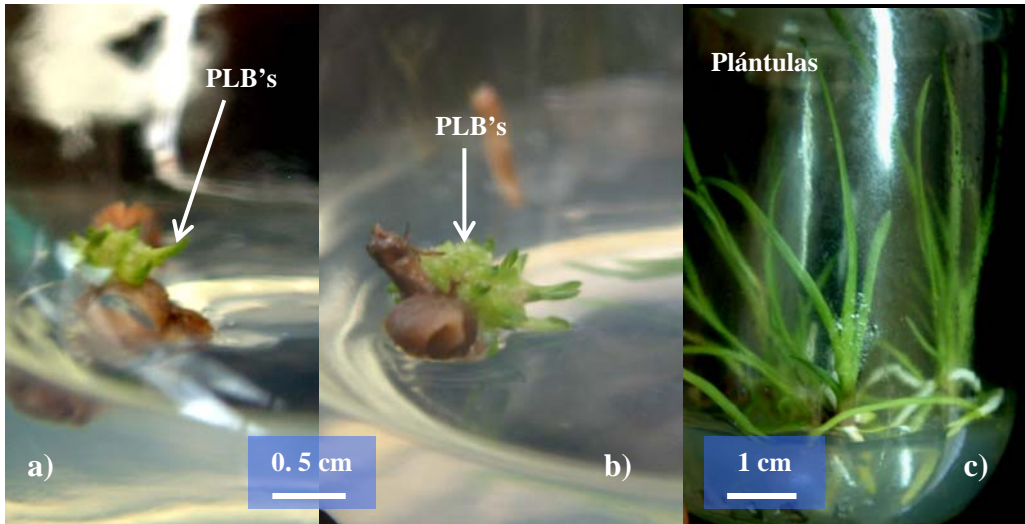


Figura 27. a) Después de los 135 días de cultivo comenzaron a elongarse los primordios de hoja de los PLB's; b) se formaron 5 nuevos PLB's (1 BA), y c) después de 180 días de cultivo se incrementó el número de plántulas con un \bar{X} de longitud de 5.1 cm.

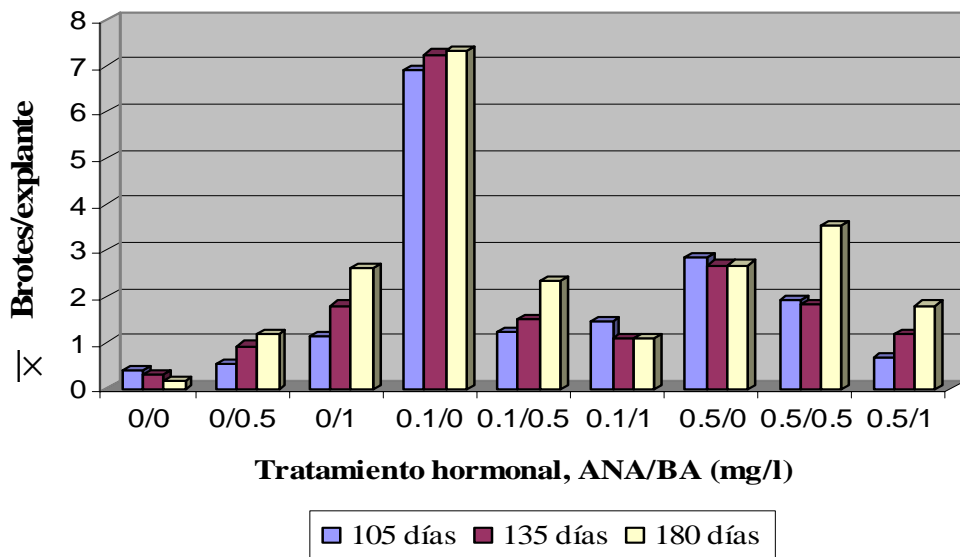


Figura 28. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS, sembrados en frascos Gerber®, durante 105 días de iniciados los cultivos.

Los explantes cultivados en medio de inducción y en frascos Gerber®, respondieron de mejor manera que después de subcultivarlos a medio basal. Hubo la formación de más brotes, es decir en medio de inducción se formaron 246 brotes y en medio basal sólo se formaron 61 nuevos brotes. Esto ocurrió también en los explantes cultivados en cajas Petri, ya que al término de los 75 días de inducción se formaron 148 brotes y al subcultivarlos en medio basal

se formaron sólo 37 brotes nuevos (Tabla 9). Esto indicó que es necesaria la adición de reguladores del crecimiento para que los explantes reaccionen morfogénicamente, regenerando brotes ó PLB's de manera directa para *Laelia gouldiana*. Aunque no es necesaria la adición de concentraciones elevadas de reguladores, debido a que el tratamiento que obtuvo el mayor \bar{X} brotes/explante y la mayor cantidad de brotes después del cultivo en medio de inducción fue el de 0.1 ANA con 70 brotes por tratamiento, seguido del tratamiento con 0.5/0.5 y 0.5 ANA con 41 y 39 brotes respectivamente. Al respecto la adición únicamente de auxina para estimular la brotación en orquídeas casi no ha sido documentada, siendo más frecuente el efecto inhibitorio de las auxinas en la formación de brotes (Mata-Rosas y Salazar-Rojas, 2009). En la literatura Torres y Mogollón (2000), para *Cattleya mossiae*, reportaron que para la proliferación de brotes se requirió TDZ, en concentraciones de 1 y 3.3 $\mu\text{M/L}$ TDZ. Sheelavantmath y cols. (2000), en cultivos de rizoma de *Geodorum densiflorum*, indujeron una brotación múltiple con 5 μM BA, mientras que con 2 μM ANA estimularon el crecimiento del rizoma. Este mismo resultado observaron Paek y Yeung (1991), en cultivos de rizoma de *Cymbidium forrestii*. Con ANA estimularon el crecimiento del rizoma y con BA indujeron la formación de brotes. Mientras que en el trabajo de Nguyen y Tran (2006), se ensayaron 7 combinaciones de ANA y BA, en dos híbridos diferentes de *Dendrobium*, sí se obtuvo brotación en los tratamientos adicionados únicamente con 1 y 2 mg/L ANA. Sin embargo en los dos híbridos estudiados, fueron las de menor \bar{X} s de brotes/explante. Nayak y cols. (1997b), en segmentos de tallo de *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* y *D. moschatum*, se obtuvo la mayor brotación con 2.2 y 4.5 μM de TDZ. En cultivos de segmentos de tallo de *Cattleya x mesquiae*, se obtuvo la mayor formación de brotes de las combinaciones ensayadas de ANA y BA, en la que tenía sólo 0.5 mg/L BA (Ramos y Carneiro, 2007). Sin embargo Mata-Rosas y Salazar-Rojas (2009), obtuvieron la mayor formación de brotes, sin mediación de callo, en protocormos de *Lycaste skinneri*, mediante la adición de 2.7 μM ANA, en medio MS y KC modificado, seguido del tratamiento con 2.7/2.2 μM ANA/BA. Este resultado fue similar al segundo tratamiento con mayor \bar{X} brotes/explante en el presente estudio que fue 0.5/0.5. Además al transferir los brotes obtenidos a medio basal incrementaron su tamaño, tal y como ocurrió en el presente trabajo. Los estudios ejemplificados indican que el efecto de los reguladores del crecimiento depende de la especie que se esté estudiando y de las condiciones de cultivo que se ensayen, como el

tipo de explante, medio de cultivo, recipiente de cultivo y en el caso de *L. gouldiana*, la aplicación de 0.1 ANA estimuló la brotación lateral, en comparación a cualquier otro explante y recipiente de cultivo. La aplicación de 0.5 ANA fue efectiva para regenerar brotes, ya que fue el tercer tratamiento con mayor \bar{X} brotes/explante. Esto pudo deberse a que el nivel endógeno de citocininas en *L. gouldiana* fue el necesario para interactuar de forma sinérgica con ANA y estimular el desarrollo de brotes (Jankiewicz, 2003).

La aplicación de 0.5/0.5, fue el segundo tratamiento con mayor formación de brotes (53) al final de 180 días de cultivo. Esto coincide con el trabajo de Nguyen y Tran (2006), donde se cultivaron secciones de tallo de dos híbridos de *Dendrobium* con la mayor brotación obtenida con 1/1 mg/L ANA/BA. Esto se debe a que la combinación de ambos reguladores en concentraciones semejantes incrementa la producción de brotes. También en el trabajo de Shiau y cols. (2005), cuando aplicaron ANA y BA juntos en cultivos de segmentos de tallo de *Dendrobium candidum*, obtuvieron una mayor proliferación de brotes, tanto en medio semi-sólido como líquido.

La presencia de reguladores del crecimiento exógenos indujo la regeneración PLB's, en los tratamientos con 0.5 y 0.1 ANA durante los primeros 75 días de cultivo y al final de los 180 días, también la indujo en los cultivos provenientes de la adición previa de 0.5, 1 BA y 0.1/1, 0.5/1. Las auxinas juegan un papel crucial en la embriogénesis, las cuales fueron necesarias durante el período de inducción, debido a que únicamente los tratamientos con ANA generaron PLB's. Posteriormente los PLB's generados provenían de explantes oxidados, lo que pudo ser el factor detonante en su formación, además del subcultivo a medio fresco que tuvieron los explantes, después de los 75 días, lo que pudo actuar como estrés osmótico, lo cual se ha visto que potencia la embriogénesis somática (Thorpe, 1998). En la literatura la formación de PLB's se ha obtenido con combinaciones de ANA y BA, como lo señalan Kim y Kim (2003), en cultivos de tallo de tres híbridos de *Dendrobium*. En cultivos de segmentos basales de un híbrido de *Phalaenopsis*, se regeneraron PLB's mediante la adición de 1/5 mg/L ANA/2iP (Jo *et al.*, 2006). Sin embargo, Suárez (2006), obtuvo la mayor formación de PLB's a partir de secciones basales de protocormos de *Euchile mariae*, con 1 mg/L BA. Esto sugiere que la regeneración vía embriogénesis somática depende de las condiciones de cultivo como el medio de cultivo, ya que en los trabajos de Kim y Kim (2003) y Jo y cols. (2006), emplearon medio VW, además de la especie con la que se estudie (Thorpe, 1998). Hay que añadir que la embriogénesis somática en orquídeas no ha sido bien documentada, ya que los

factores que inducen y controlan este proceso son pobremente entendidos, por la complejidad de los procesos y la falta de buenos sistemas o modelos experimentales (Chen *et al.*, 1999).

Un punto importante a resaltar es que de los tres explantes estudiados, los segmentos de tallo fueron los que presentaron el mayor número de regenerantes. Esto sugiere que la habilidad de los segmentos de pseudobulbos de orquídeas para generar brotes en corto tiempo, puede ser empleada exitosamente para una rápida propagación mediante un adecuado balance del medio y reguladores del crecimiento (Geetha y Shetty, 2005; Basker y Narmatha-Bai, 2006; Nguyen y Tran, 2006). El empleo de segmentos de tallo con yemas laterales, es el indicado para la propagación masiva de cultivares comerciales, ya que es un método rápido, simple, económico y altamente reproducible (Geetha y Shetty, 2000).

Cultivos de hoja con agua de coco

Los cultivos de hoja que se sembraron en cajas Petri, al inicio de la siembra tenían una coloración verde. A los 10 días de cultivo, en todos los tratamientos, los explantes adquirieron una coloración verde amarillento con indicios de oxidación en su parte superior. No hubo alguna respuesta morfogenética durante este período. Transcurridos 30 días de cultivo había 45 explantes oxidados (40.2 %) de 112, siendo el tratamiento con 20 % coco, donde se registro más oxidación, con 14 explantes. A los 30 días de cultivo apareció la primera respuesta en dos tratamientos: 0.1 mg/L/10% ANA/coco con 3 brotes por tratamiento, 2 de los cuales medían 0.2 cm de longitud, eran verde claro. El tercero estaba hiperhidratado, esférico, verde claro y medía 0.7 cm (Figura 29a) y en el tratamiento con 10% coco con 2 brotes que se formaron en la base de la hoja en dos explantes distintos, ambos eran verde claro y medían 0.1 cm.

Al día 60 de cultivo había 76 explantes oxidados (67.9 %) de 112, principalmente la oxidación se dio en la parte superior del explante hacia la parte inferior, es decir la porción que tenía contacto con el medio de cultivo se oxidó menos. Los explantes que no mostraban señales de oxidación tenían una coloración verde claro. El número de brotes aumentó a 17, los cuales se formaron en los siguientes cuatro tratamientos: en el adicionado con 0.1 mg/L/10 % ANA/coco, donde había 6 brotes de 0.3 cm de longitud en \bar{X} y una plántula de 1.5 cm de longitud (Figura 29b); en el que tenía la combinación de 0.1/20 % ANA/coco, había 5 brotes de 0.2 cm de longitud y uno de los cuales se generó en la parte central del explante. En el adicionado con 10 % coco con 4 brotes de 0.3 cm de longitud y en el tratamiento con 20 % coco donde se generó un brote de 1 cm de longitud.

Al término del período de inducción (75 días) 88 explantes (81.5 %) de 108 que sobrevivieron, se oxidaron. Se regeneraron 19 brotes, 2 más que en el día 60 de inducción (Tabla 22); uno de los cuales se formó en el tratamiento con 0.1/10 % ANA/coco. Éste medía 0.3 cm de longitud, era verde claro y parecía que estaba rodeado de una masas de PLB's en la base (Figura 29c). En el tratamiento libre de reguladores, donde no se había registrado respuesta, se formó una masa de PLB's, que medía 0.2 cm de diámetro, era compacta, poco friable y de coloración verde claro (Figura 29d). El otro brote que se generó estaba en el tratamiento con 10 % coco, el cual surgió junto a un brote previamente formado y medía 0.3 cm de longitud, con los primordios foliares desarrollados (Figura 29e). El tratamiento con mayor \bar{X} de brotes por explante se dio en el adicionado con 0.1/10 % ANA/coco, con 0.4 y 8 brotes formados,

seguido del adicionado con 0.1/20 ANA/coco con 0.3 brotes por explante y 5 brotes (Figura 30).

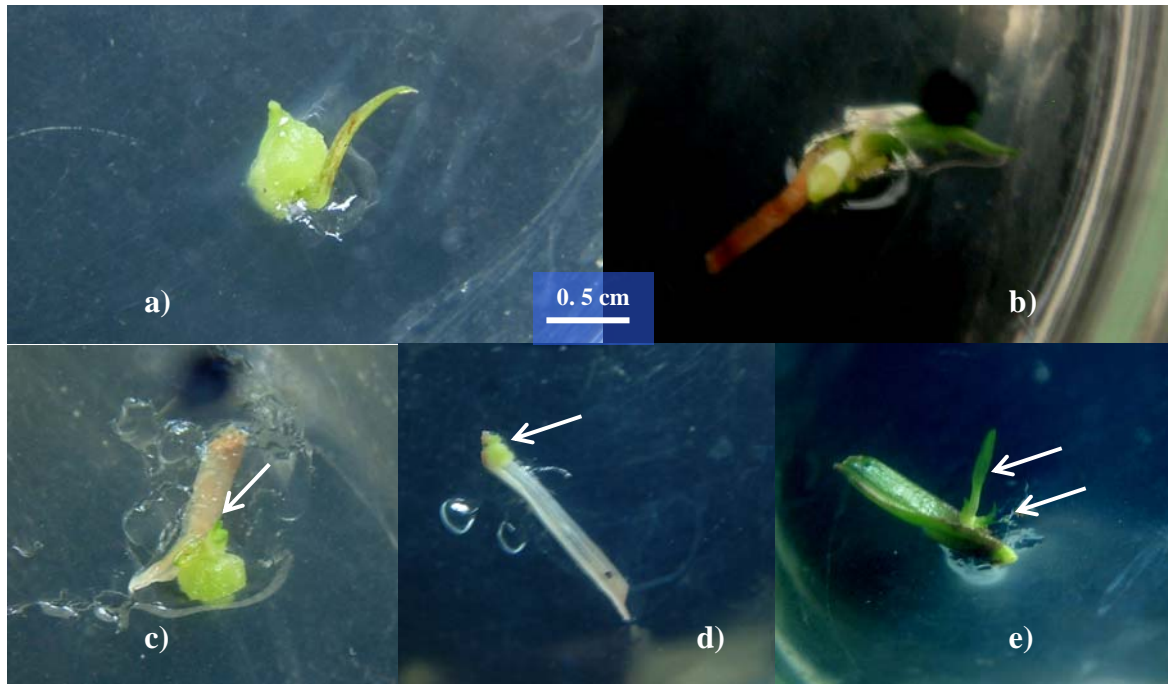


Figura 29. a) Brote hiperhidratado (0.1/10% ANA/coco, 30 días de cultivo); b) plántula de 1.5 cm (0.1/10% ANA/coco, 60 días de cultivo), c) brote con masa de PLB's (0.1/10% ANA/coco, 75 días de cultivo); d) masa de PLB's en tratamiento control y e) formación de brotes (10 % coco).

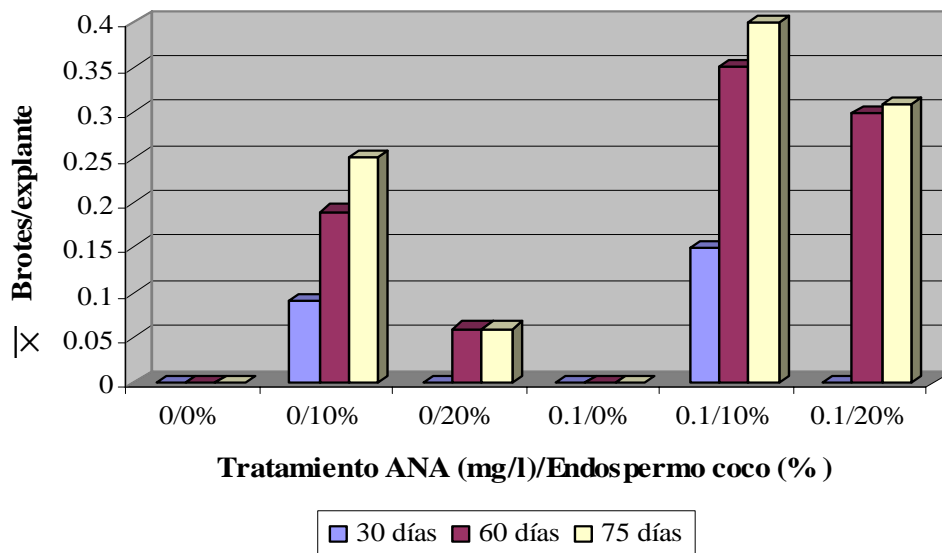


Figura 30. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hoja en medio MS con agua de coco, durante 75 días de iniciados los cultivos.

Tabla 22. Brotes generados a partir de segmentos de hoja de *L. gouldiana*, en medio MS en cajas Petri, con agua de coco. Resultados a los 75 días de cultivo.

Tratamiento ANA/coco mg/L/%	No. total de brotes	Explantos sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	0	20	0
0/10	5	20	0.25
0/20	1	16	0.06
0.1/0	0	16	0
0.1/10	8	20	0.4
0.1/20	5	16	0.31

Brotes, plántulas y PLB's fueron subcultivados a medio basal. Después de los 30 días de cultivo en este medio (105 días de cultivo) todos los explantes se oxidaron. El número de brotes se incrementó a 29, siendo el tratamiento con 0.1/10 % ANA/coco el que presentó más brotes, con 16. Había cuatro tratamientos con masas de PLB's, tres de las cuales se formaron en este período y una se había formado a los 75 días de cultivo en el tratamiento control. Esta última incrementó su volumen y medía 0.6 cm de diámetro, era una masa compacta, con una coloración verde claro (Figura 31a). La otra masa que se había formado a los 75 días de inducción en el tratamiento con 0.1/10 % ANA/coco, comenzó a brotar en este tiempo, desarrollándose 10 brotes de 0.5 cm de longitud en \bar{X} . Además de que se formó una de las tres nuevas masas de PLB's en otro explante, esta masa era friable con los PLB's bien definidos, de forma esférica (Figura 31b). Las otras dos masas de PLB's se formaron en los tratamientos con 0.1 ANA y 0.1/20 % ANA/coco, ambas eran unas masas compactas, poco friables y de una coloración verde translúcido.

Después de 135 días de cultivo había 44 regenerantes entre brotes y plántulas formadas. Las 4 masas de PLB's ya empezaban a brotar durante este tiempo y los brotes que estaban desarrollándose medían en \bar{X} 0.5 cm de longitud (Figura 31c) e incluso el desarrollo de los PLB's era ya avanzado que se habían formado plántulas (Figura 31d), lo cual ocurrió en el tratamiento con 0.1/10 % ANA/coco.

Transcurridos 180 días los cultivos de hoja habían regenerado 78 brotes y plántulas de 3.2 cm de longitud en \bar{X} (Figura 31e) en 92 explantes que sobrevivieron el cultivo (Tabla 23). El tratamiento que tuvo el mayor número de brotes formados fue el que tenía la combinación de 0.1/20 % ANA/coco con 22 brotes, mientras que el mayor \bar{X} de brotes por explante lo logró el adicionado con 0.1 ANA con 2.13 y 17 brotes (Figura 32).

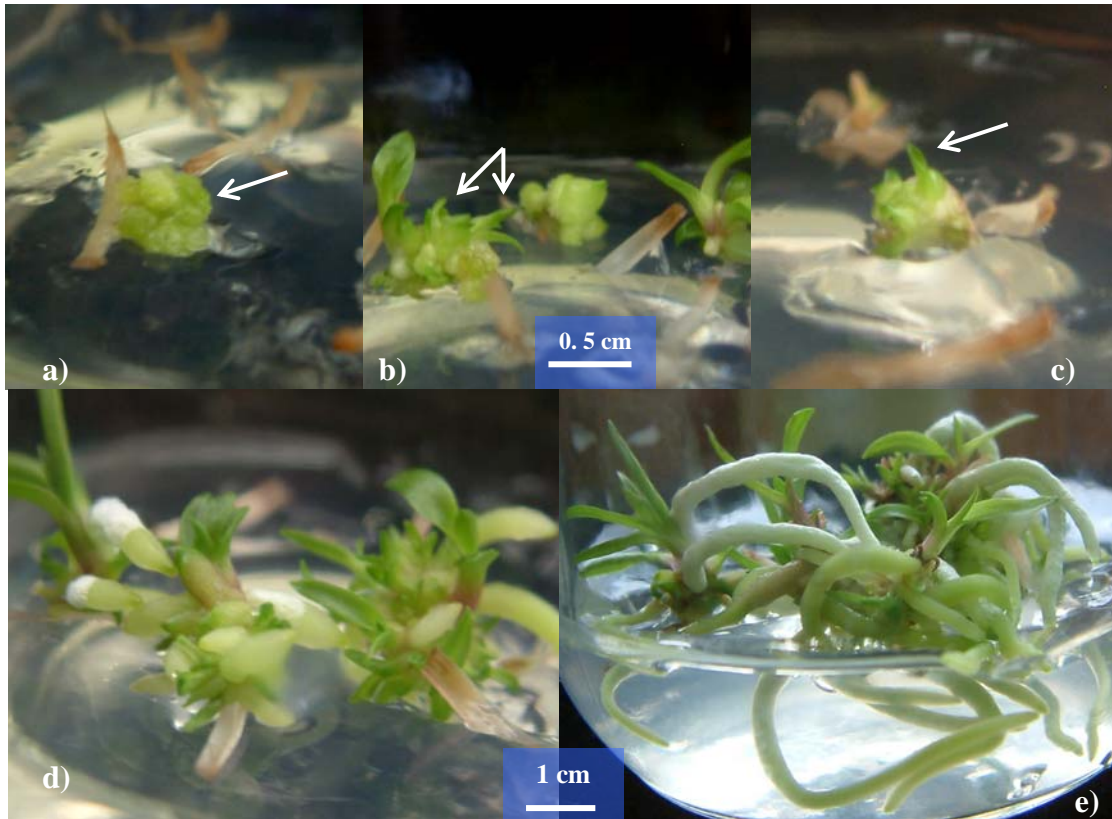


Figura 31. Cultivo de hoja después de 105 días. a) Grupo de PLB's con incremento de volumen (tratamiento control); b) PLB's diferenciándose en brotes (0.1/10 % ANA/coco). c) Grupo de PLB's con primordios de hoja después de 135 días de cultivo; d) formación de plántulas provenientes de PLB's (0.1/10 % ANA/coco), y e) brotes y plántulas después de 180 días de cultivo.

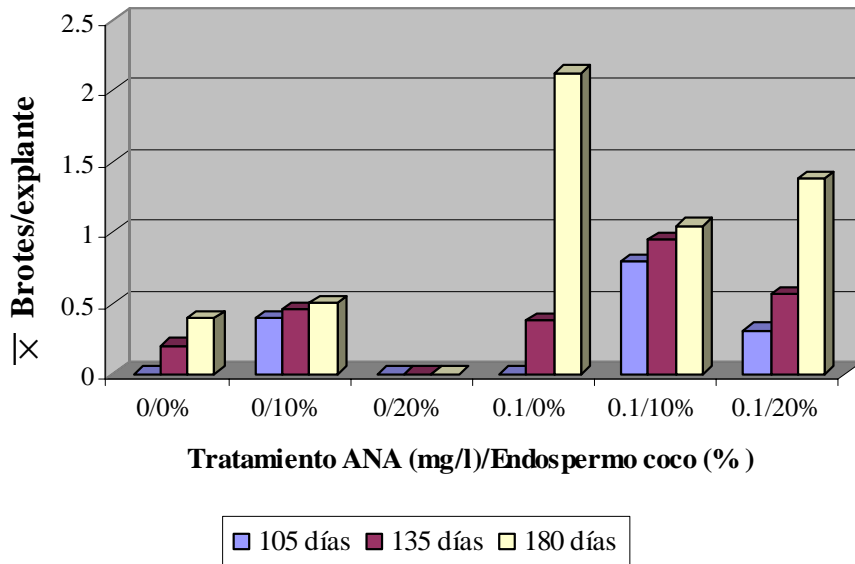


Figura 32. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de hoja en medio MS con agua de coco, durante 180 días de iniciados los cultivos.

Tabla 23. Brotes generados a partir de segmentos de hoja de *L. gouldiana*, en medio MS en cajas Petri, con agua de coco. Resultados a los 180 días de cultivo.

Provenientes de ANA/coco mg/L/%	No. total de brotes	Explantes sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	8	20	0.4
0/10	10	20	0.5
0/20	0	9	0
0.1/0	17	8	2.13
0.1/10	21	20	1.05
0.1/20	22	16	1.38

La adición de agua de coco resultó benéfica para los cultivos de hoja en *L. gouldiana*, ya que al término del período de inducción, únicamente los tratamientos adicionados con agua de coco tuvieron alguna respuesta morfogénica. Esta inercia cambió al subcultivar los explantes y brotes formados a medio basal, ya que tanto el tratamiento control como el adicionado con 0.1 ANA formaron brotes, inclusive éste último fue el que tuvo el mayor \bar{X} de brotes/explante, sin embargo en los tratamientos con 0.1/10 % y 0.1/20 % ANA/coco, se formaron más brotes, con 21 y 22 brotes respectivamente. Esto nos indicó que el agua de coco en combinación con 0.1 ANA estimuló la brotación. Esto coincide con la literatura, Teixeira y cols. (2006), reportaron que en cultivos de segmentos de PLB's de un híbrido de *Cymbidium*, al ser suplementado el medio con 10 y 20 % de agua de coco, se obtenía un incremento significativo en el número de PLB's formados, con 23.1 por explante. De manera similar, Sinha y Roy (2004), reportaron que la concentración de 10 % agua de coco y 0.5/1 mg/L ANA/BA en medio VW, fue favorable para el desarrollo y crecimiento de protocormos en *Vanda teres*. Cabe mencionar que la adición de agua de coco al medio no siempre resulta exitosa, como lo observado en el tratamiento con 20 % coco, donde sólo se formó un brote que por problemas de contaminación al momento de subcultivarlo se perdió. Pindel y Pindel (2004), reportaron que los explantes de ovarios y cápsulas inmaduras de *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza maculata*, *Epipactis helleborine*, *Goodyera repens* y *Gymnadenia conopsea*, después de 8 semanas se tornaron café y terminaron por morir, cuando se empleó agua de coco al 15 % en medio KC.

Cultivos de tallo con agua de coco

Los cultivos de tallo al momento de la siembra tenían una coloración verde claro y la base de los explantes era café, esto probablemente porque se realizaron varios cortes para eliminar raíces y brácteas que cubrían al tallo (Figura 33a). La coloración de los explantes en el tallo cambió a un verde más intenso después de 10 días de cultivo en todos los explantes, excepto para 3 que empezaron a mostrar señales de oxidación. La respuesta morfogénica se dio a los 10 días de cultivo, formándose 56 brotes que provenían de las yemas laterales de los explantes (Figura 33b), de nudos y de la parte superior del explante (donde se realizó la disección). El tratamiento que tuvo más brotes fue el adicionado con 20 % coco con 16 brotes. Se vitrificaron 3 explantes, 2 en el tratamiento adicionado con 0.1 mg/L ANA y uno en el adicionado con 10 % coco. Estos explantes incrementaron su talla a 1.5 cm de largo por 0.5 cm de ancho (Figura 33c), en relación al promedio de los demás explantes de 0.8 cm de largo por 0.3 cm de ancho. Transcurridos los 30 días de cultivo, había 4 explantes oxidados (3.7 %) de 108 explantes, en el tratamiento con 10 % de coco se contaminaron con hongos 12 explantes. El número de brotes se incrementó a 178, más del triple que lo registrado a los 10 días de inducción (56 brotes), esta vez el tratamiento con más brotes fue el adicionado con 0.1 ANA con 49 brotes, seguido del adicionado con 20 % coco con 35 brotes. En 5 de los 6 tratamientos se desarrollaron un total de 10 plántulas de los brotes preformados, éstas alcanzaron longitudes de 4.5 cm (Figura 33d). A los 60 días de cultivo 16 (16.7 %) de 96 explantes se oxidaron, este descenso en el número de explantes se debió a contaminación fúngica, y debido a esto el número de brotes formados descendió de 178 a 152 brotes. Cabe destacar que se formaron dos masas de PLB's compactas, poco friables de forma esférica, en los tratamientos adicionados con 0.1 ANA y 10 % coco, ambas surgieron entre la base de los brotes formados y el explante (Figura 33e).

Al final del período de inducción (75 días de cultivo), 23 explantes se oxidaron (23.9 %) de 96 que sobrevivieron, y se formaron 172 regenerantes entre brotes y plántulas (Tabla 24), y el tratamiento que obtuvo el mayor \bar{X} de brotes por explante fue el adicionado con 20 % de coco con 3.3, además de ser el que tuvo el mayor número de regenerantes con 53, seguido del adicionado con 0.1 ANA con 2.55 brotes por explante y 51 brotes (Figura 34). Los brotes tuvieron un \bar{X} de longitud de 2.2 cm (Figura 33f). Los PLB's no brotaron en este período, pero si se desarrollaron y definieron, ya que su forma era más esférica, en ambos tratamientos.

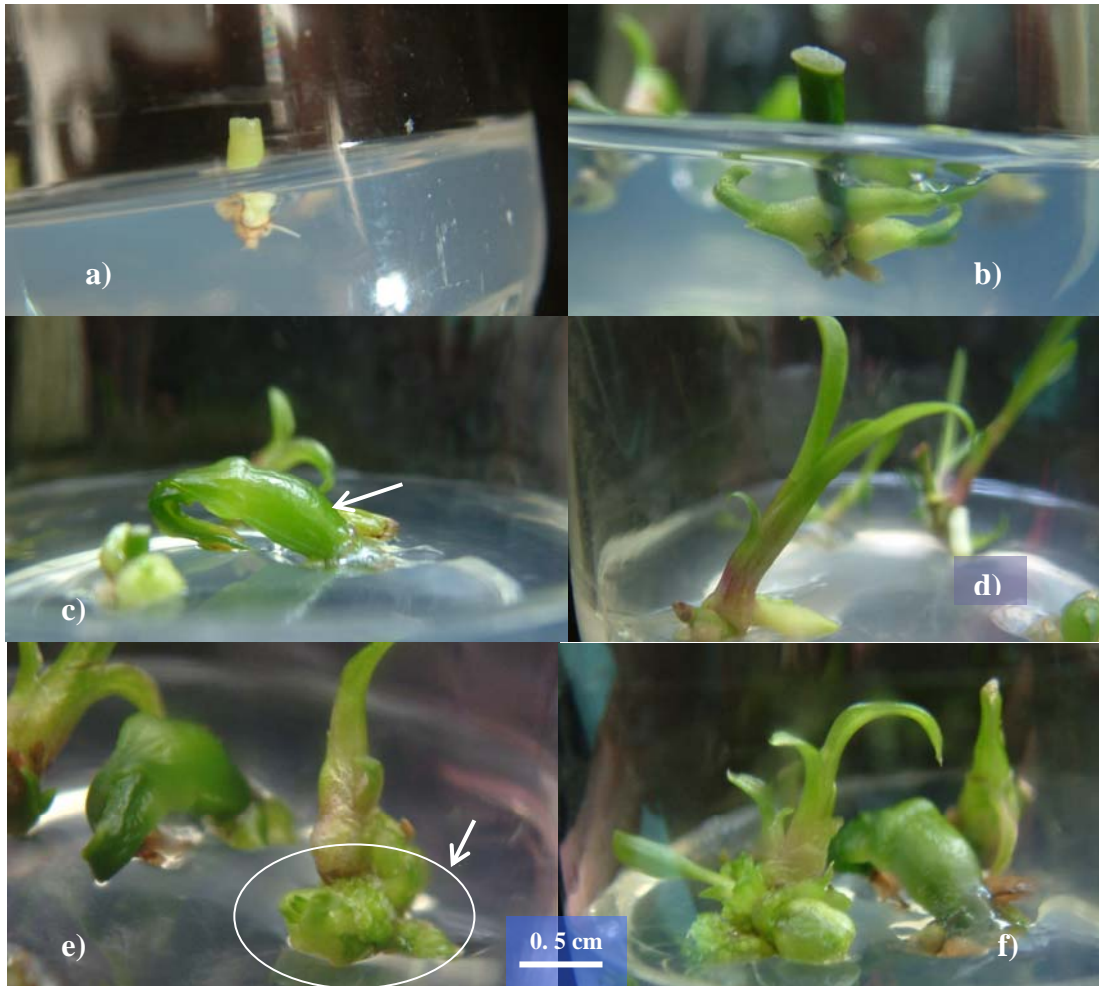


Figura 33. a) Explante al momento de la siembra; b) formación de brotes después de 10 días; c) explante hiperhidratado; d) Diferenciación de plántulas después de 30 días de cultivo; e) formación de masa de PLB's (0.1 ANA y 10 % de coco), y f) brote de 2.2 cm de longitud (\bar{X} de longitud en todos los tratamientos).

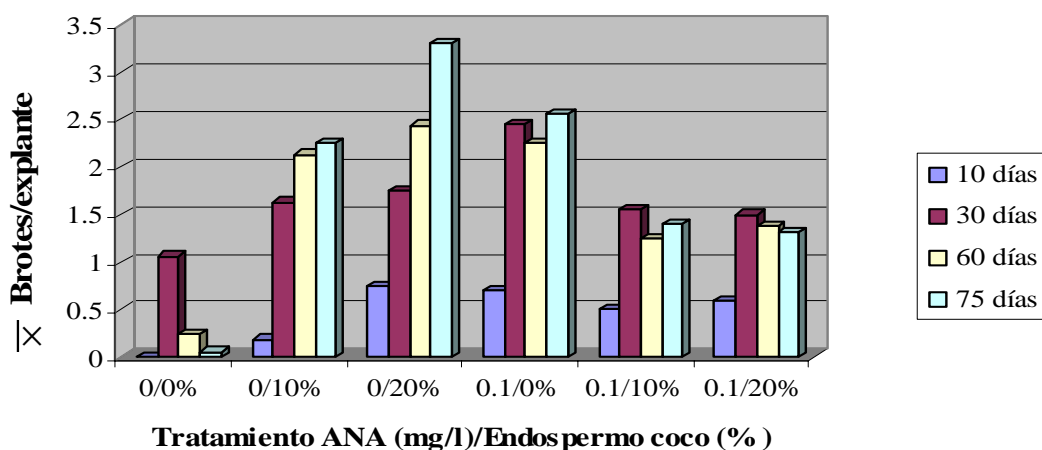


Figura 34. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS con agua de coco, durante 75 días de iniciados los cultivos.

Tabla 24. Brotes generados a partir de segmentos de tallo de *L. gouldiana*, en medio MS en frascos Gerber®, con agua de coco. Resultados a los 75 días de cultivo.

Tratamiento ANA/coco mg/L/%	No. total de brotes	Explantes sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	1	16	0.06
0/10	18	8	2.25
0/20	53	16	3.3
0.1/0	51	20	2.55
0.1/10	28	20	1.4
0.1/20	21	16	1.31

Al cabo de 105 días de cultivo, había 200 brotes, 60 de ellos en los cultivos con 0.1 ANA. Este incremento se debió a que los PLB's habían elongado sus hojas y tallo, y desarrollándose en brotes. En el tratamiento con 10 % coco todos los PLB's elongaron sus hojas. En total eran 4 brotes que medían 0.6 cm. En el tratamiento con 0.1 ANA, se diferenciaron 15 brotes que medían en \bar{X} 0.7 cm y se formaron 10 plántulas de 1.3 cm en \bar{X} de longitud (Figura 35a), quedando 5 PLB's de forma esférica (Figura 35b). En el tratamiento control se formó a partir de un explante oxidado, una masa de PLB's compacta, poco friable y de coloración verde claro; los PLB's se generaron de la base del explante (Figura 35c). En total se formaron 200 regenerantes, de los cuales 180 eran plántulas con una longitud \bar{X} de 4.2 cm. El tratamiento donde se contabilizaron más plántulas (50) fue en el adicionado con 0.1 ANA. A los 135 días de cultivo, había 225 regenerantes entre brotes y plántulas. Por otra parte todos los PLB's del tratamiento con 0.1 ANA empezaron a elongar los primordios de hoja, por lo que el único tratamiento donde no había ocurrido era el control, pero en este caso incrementaron su tamaño, número y su forma se hizo más definida tornándose esféricos, dejando de estar muy agrupados y compactos (Figura 35d).

Después de los 180 días de cultivo, se formaron 307 plántulas (Tabla 25), con una longitud \bar{X} de 6.7 cm (Figura 35f). Ya no había PLB's en ningún tratamiento ya que todos al término de este período se habían desarrollado en plántulas, como los del tratamiento control, donde se registraron 5 plántulas (Figura 35e) que se formaron a partir de los PLB's. El tratamiento con mayor número de plántulas fue el adicionado con 0.1 ANA con 100 regenerantes y presentó la mayor formación del \bar{X} de brotes/explante (6.25), seguido del tratamiento con 10 % coco (4.75) y el adicionado con 20 % coco (4.5) (Figura 36)

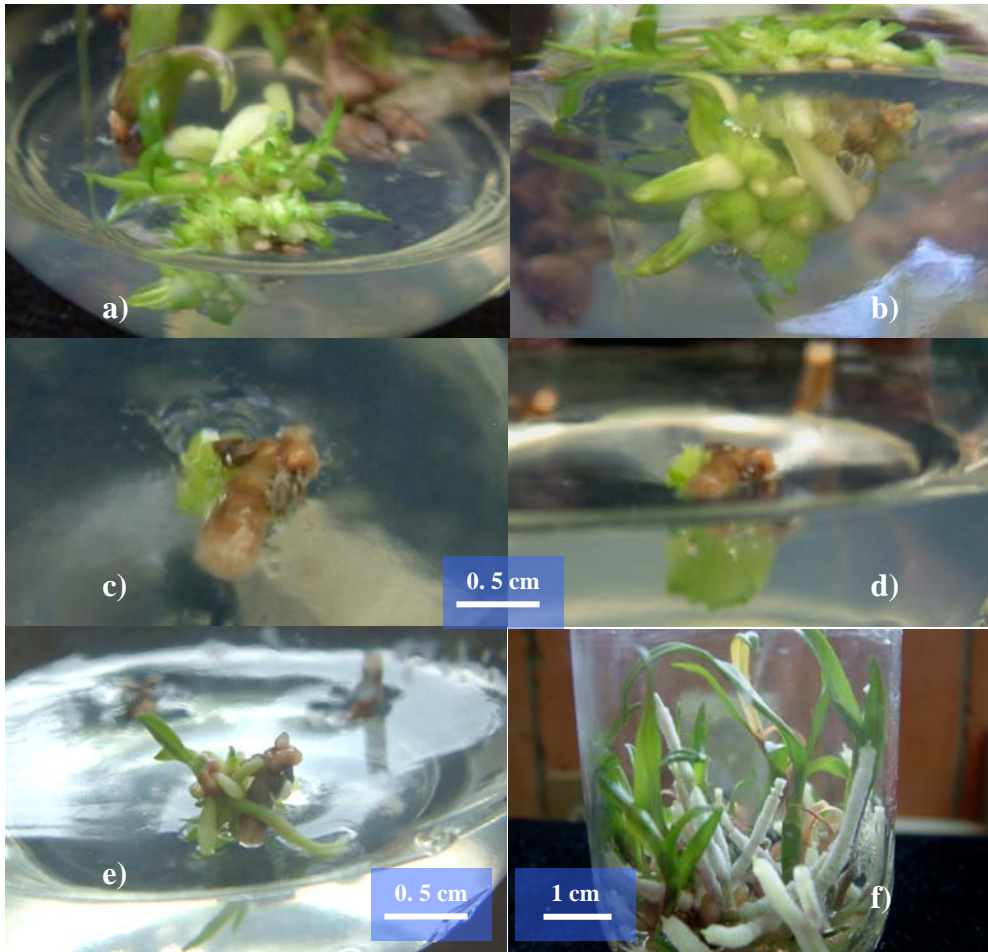


Figura 35. Después de 105 días de cultivo, a) brotes y plántulas a partir de PLB's; b) PLB's (0.1 ANA); c) PLB's (control); d) PLB's después de 135 días (control); e) plántulas a partir de PLB's (control, después de 180 días), y f) plántulas con longitud \bar{X} de 6.7 cm.

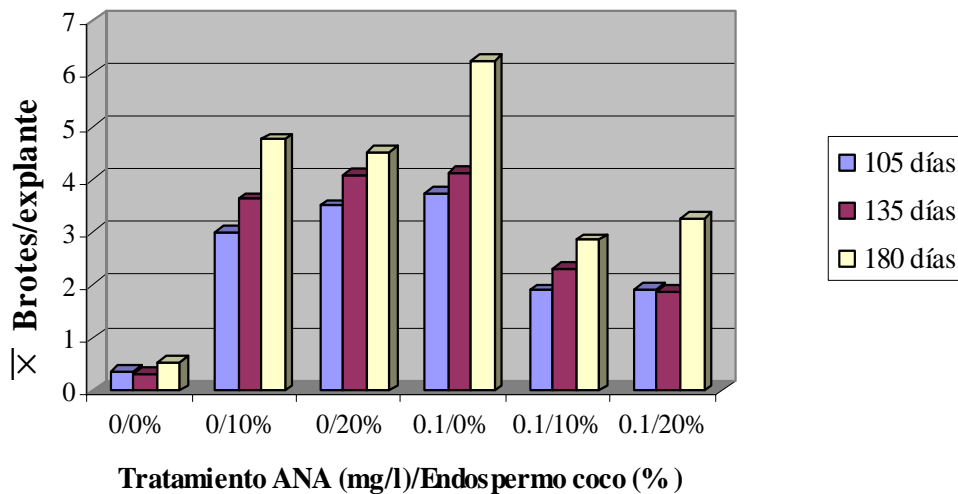


Figura 36. \bar{X} de brotes por explante, a partir de cultivos de tallo en medio MS basal con agua de coco, durante 180 días de iniciados los cultivos.

Tabla 25. Brotes generados a partir de segmentos de tallo de *L. gouldiana*, en medio MS en frascos Gerber®, con agua de coco. Resultados a los 180 días de cultivo.

Provenientes de ANA/coco mg/L/%	No. total de brotes	Explantes sobrevivientes	\bar{X} de brotes por explante
0/0	8	15	0.53
0/10	38	8	4.75
0/20	54	12	4.5
0.1/0	100	16	6.25
0.1/10	57	20	2.85
0.1/20	52	16	3.25

El tratamiento adicionado con 0.1 ANA, resultó ser el que obtuvo el mayor \bar{X} de brotes/explante, sobre los tratamientos con agua de coco. La respuesta lograda es muy similar a lo obtenido en el barrido hormonal de ANA/BA en frascos Gerber®. En ese tratamiento al término de 180 días de cultivo, se obtuvieron 7.33 brotes/explante con 0.1 ANA y 88 plántulas, mientras que en esta repetición fue de 6.25 brotes/explante, con 100 plántulas.

El segundo tratamiento con mayor \bar{X} de brotes/explante fue el adicionado con 10 % de agua de coco. Esto coincide con lo reportado por Santos y cols. (2005), al adicionar agua de coco al 10 % en el medio, se logró la proliferación de brotes a partir de cultivos de cuerpos basales de tallo. Rubluo y cols. (1989), reportaron que la germinación de semillas de *Bletia urbana* ocurría de mejor manera en el medio KC con 3 % de sacarosa y 10 % de agua de coco. Sinha y Roy (2004), reportan en concentraciones de 10-25 % de agua de coco, que la mejor concentración fue 10 % agua de coco en medio VW, con 0.5/1 mg/L ANA/BA, para un favorable desarrollo y crecimiento de protocormos en *Vanda teres*, se diferenciaron más rápido en esta concentración en brotes, además obtuvieron PLB's en la base de los brotes en crecimiento. Estos resultados concuerdan a lo obtenido en el presente estudio, debido a que en el tratamiento adicionado con 10 % de agua de coco, se obtuvieron PLB's en la base de brotes previamente formados, siendo el tercer tratamiento con el mayor \bar{X} de brotes/explante.

Contaminación

Un punto importante a analizar en los cultivos fue la contaminación. Ésta se presentó en los cultivos en cajas Petri, frascos Gerber® y en agua de coco, dentro de los primeros 10 días de iniciados los cultivos, con porcentajes de 2.8 %, 3.7 % y 1.5 %, respectivamente. Los contaminantes o patógenos fueron de tres tipos: hongos principalmente, bacterias y ácaros que son un vector de contaminación de hongos y bacterias.

La contaminación fúngica se manifestó de distintas maneras, pues se formaron colonias diversas, el color podía ser blanco, blanco-grisáceo (Figura 37a), azul o verde-azul (Figura 37b). En la forma y textura algunos hongos presentaron una textura algodonosa y voluminosa, o áspera y con poco volumen. Mientras que la contaminación bacteriana, aunque escasa, también fue diversa, la coloración se presentó de dos formas: naranja (Figura 37c), rosa (Figura 37d) y blanco, con texturas básicamente lisas y brillantes. Cabe señalar que las colonias bacterianas de coloración rosa (Figura 37d), no evitaron que ocurriera la morfogénesis. Explantes de los tres tipos y brotes formados continuaron desarrollándose e incrementaron el número de regenerantes, inclusive la elongación en los cultivos de raíz se dio en presencia de esta bacteria.

Al término del período de inducción (75 días de cultivo), el porcentaje de contaminación en cajas Petri, frascos Gerber® y en cultivos con agua de coco fue de 20.4 %, 13.3 % y 15 %, respectivamente, siendo afectados los tres tipos de explantes.

La contaminación posiblemente se debió a tres factores. El primero y que únicamente afectó a los cultivos que se desarrollaron en cajas Petri, se debió en un inicio, a que no se dejó enfriar el medio en las cajas Petri con las valvas semiabiertas, dentro de la campana de flujo laminar. Esto provocó que se condensará el vapor emitido del medio de cultivo dentro de las cajas Petri y ocasionó en manejos posteriores que por capilaridad se arrastraran patógenos desde el egapack en la unión de las valvas hacia dentro del contenedor, lo que influyó de manera determinante en los cultivos, ya que hubo como se indicó un 20.4 % de contaminación al término del período de inducción. La segunda causa de contaminación fue por posibles manejos inadecuados al momento de sembrar los explantes o de subcultivar, que si bien no se evidenciaron en los primeros días de cultivo, lo hicieron posteriormente inclusive a los 75 días de cultivo. Esto se debe a que la composición del medio varía conforme avanza el tiempo y se modifica la cantidad de nutrientes en él, lo que puede ser propicio para patógenos con

necesidades específicas. El tercer factor se debió a contaminación por ácaros que atacaron los cultivos, ya que posiblemente perforaron el sello del egapack.

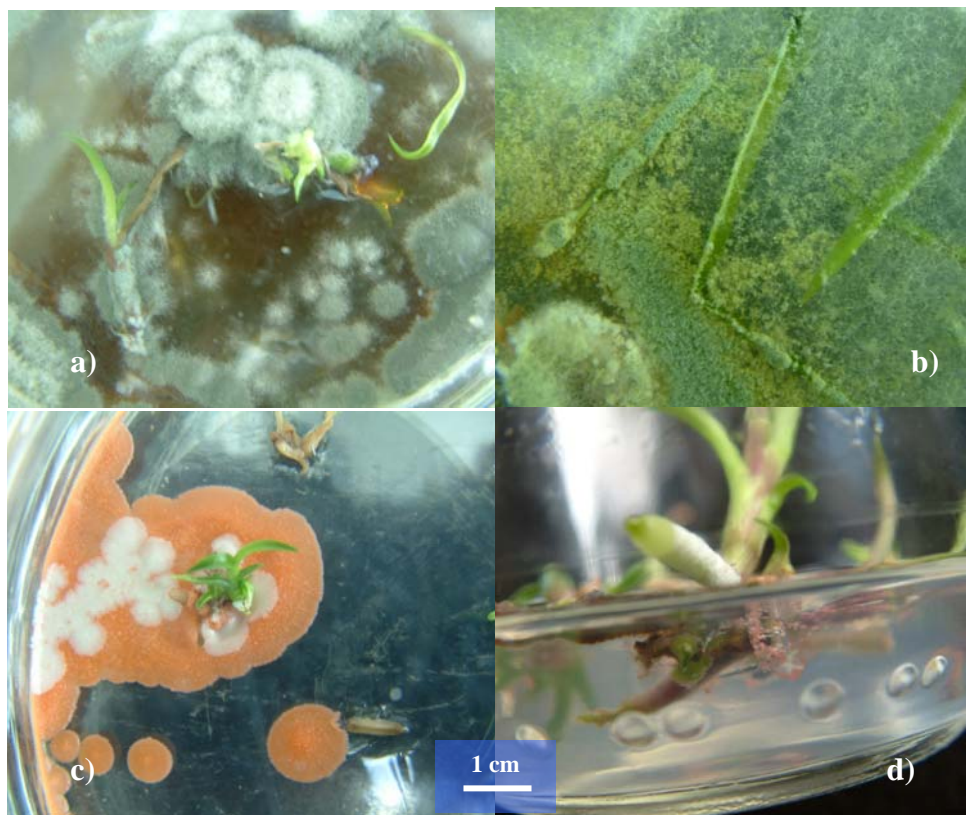


Figura 37. Contaminación fúngica: a) colonias blanco-grisáceas; b) verde-azules.
Contaminación bacteriana: color naranja, y d) rosa.

Influencia del recipiente en el cultivo *in vitro*

El tipo de recipiente empleado para la siembra influyó la respuesta de los explantes. Cuando se cultivaron explantes de tallo y hoja, que fue donde se dio una morfogénesis, en frascos Gerber® hubo un mayor \bar{X} en la respuesta morfogénica, esto se observa al comparar el \bar{X} de brotes por explante de tallo o de hoja del mejor tratamiento y el \bar{X} total o global del tipo de explante, en los dos tipos de recipientes empleados para siembra (Tabla 26). Esto se hace todavía más evidente cuando se comparan los \bar{X} 's de brotes/explante de los mejores tratamientos de cada recipiente; en los cultivos de tallos en frascos Gerber®, tuvieron un \bar{X} de brotes por explante de 4.38 y 7.33 a los 75 y 180 días de cultivo respectivamente, ambos con 0.1 ANA, mientras que en cultivos de tallo en cajas Petri al mismo tiempos fue de 2.4 y 4.5 con 0.1/1 respectivamente (Tabla 26). Cabe mencionar que en los cultivos de ápices de raíz en

frascos Gerber®, aunque no hubo regeneración, sí se obtuvo elongación, a diferencia de cajas Petri, donde no ocurrió.

Tabla 26. Resumen de resultados al final del período de inducción (75 días) y al final del período de multiplicación (105 días), para los diferentes explantes cultivados en frascos Gerber® y cajas Petri.

	Cultivos en Frascos Gerber®		Cultivos en Cajas Petri	
	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja
\bar{X} brotes/explante (75 días de inducción)	1.56	0.13	1.14	0.12
\bar{X} más alto de brotes/explante (75 días de inducción)	4.38 (0.1 ANA)	0.56 (0.5/1 ANA/BA)	2.4 (1 BA)	0.4 (0.1 ANA y Control)
\bar{X} brotes/explante (180 días de cultivo)	2.48	0.43	2.08	0.56
\bar{X} más alto de brotes/explante (180 días de cultivo)	7.33 (0.1 ANA)	2.88 (0.5/1 ANA/BA)	4.5 (0.1/1 ANA/BA)	1.0 (0.1 ANA y 0.1/1 ANA/BA)

Los factores que influyeron en el cultivo fueron: el agente solidificante; los reguladores del crecimiento; el medio de cultivo; el material y la forma como se sellaron los recipientes; el tipo de explante, y el recipiente empleado en la siembra, y como las condiciones de incubación anteriores fueron las mismas en ambos cultivos a excepción del recipiente empleado, entonces la diferencia que hubo en cuanto a la respuesta morfogénica puede atribuirse al tipo de recipiente empleado (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994). La respuesta morfogénica está influenciada por la atmósfera *in vitro* presente en cada recipiente donde se cultivó, es decir, la atmósfera presente en ambos recipientes era diferente. Éste es un factor determinante en los procesos morfogénicos y está condicionado como ya se mencionó por el tipo y tamaño de recipiente seleccionado, así como también el sistema de cobertura del mismo (Biddington, 1992). Por que hay componentes como O₂, CO₂, etileno, acetaldehído y otros compuestos hidrocarbonados que pueden ser los responsables en la diferencia que hay en los \bar{X} 's de brotes/explante, considerando el mejor tratamiento y en el promedio de todos los tratamientos según el tipo de recipiente empleado (Thorpe, 1998; Radice, 1998).

Estos factores participan de diferentes maneras y uno de los que más influyen es el etileno. Éste es un hidrocarburo gaseoso, que tiene profundos efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Wang *et al.*, 2002; Schaller y Kieber, 2002), su producción puede deberse a

estímulos ambientales como estrés y heridas, debidas en este caso a la disección de los tejidos para conseguir los explantes (Wang *et al.*, 2002). Su acción es muy variada y depende de la especie que se esté estudiando, así como a las condiciones de luz y oscuridad, pero en general, puede estimular la producción de brotes o inhibirla (Radice, 1998).

Así como el etileno influye en procesos de morfogénesis, también el oxígeno. Éste determina en parte el crecimiento de los cultivos, además de ser necesaria una buena aireación para obtener cualquier tipo de proceso morfogénico. En alfalfa se ha visto que se puede obtener un incremento de biomasa a partir de suspensiones celulares embriogénicas cuando la solución se satura con 70% de oxígeno (Radice, 1998).

En el presente estudio, el efecto que tuvo la atmósfera *in vitro* de un frasco Gerber® de 100 mL de volumen, para *L. gouldiana*, considerando los 20 mL de medio de cultivo que se adicionaron y los 4 explantes por frasco, pareció estimular la brotación en cultivos de tallo y hoja, así como la elongación en cultivos de ápice de raíz. De hecho Arditti (1977), recomendaba que en cultivos de yemas laterales de *Cattleya*, una especie cercana biológicamente al género *Laelia*, se emplearan recipientes como matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 20 mL de medio, lo que es similar a las condiciones ensayadas en este estudio en relación a frascos Gerber®. En estudios posteriores se podrían evaluar y cuantificar los componentes de la atmósfera *in vitro*, para saber qué componentes difieren en cada recipiente, así como de la cantidad en volumen de los mismos presente en ambos tipos de recipientes.

Aclimatización

Después de 15 meses de cultivo (450 días), las plántulas de *L. gouldiana* obtenidas de cultivos en frascos Gerber® a partir de segmentos de tallo y hoja, fueron aclimatizadas. Eran plántulas que tenían en \bar{X} 3 hojas, el tallo medía de 0.8 a 1.5 cm de largo por 0.4 cm de ancho y 4 raíces vigorosas de 5 a 7 cm de longitud (Figura 39a). Los riegos se realizaron de manera espaciada, ya que *L. gouldiana* es una planta muy bien adaptada al estrés hídrico y no tolera una humedad elevada (Soto, 2002). Las tres mezclas de sustratos que se ensayaron (Tabla 27), al inicio tenían una consistencia suave (Figura 39 b, c, d).

Tabla 27. Combinación de mezclas y número de plántulas al inicio de la aclimatización.

Combinación de sustratos	Proporción v/v	Número de plántulas
Peat moss/fibra de coco/agrolita	3:3:1 v/v/v	75
Peat moss/agrolita	3:1 v/v	75
Fibra de coco/agrolita	3:1 v/v	75

Después de los 30 días de aclimatización en charolas de plástico completamente cerradas, hubo una supervivencia de las plántulas en las tres mezclas del 100 %, y éstas generaron nuevos brotes producto del desarrollo que se había iniciado *in vitro* (Figura 39e). La combinación de sustratos en que se logró un mayor número de plántulas fue fibra de coco/agrolita (97), 22 brotes más que al inicio de la aclimatización (Tabla 28). Ese incremento en el número de brotes tan rápido en los sustratos, se debió al ritmo de crecimiento que tenían las plántulas cuando estaban *in vitro*, ya que en estas condiciones los recursos como nutrientes minerales, agua y condiciones atmosféricas son más fácilmente asimilables para la planta, lo que permite un crecimiento más rápido. A los 60 días de aclimatización hubo un descenso en el número de individuos en la mezcla de peat moss/fibra de coco/agrolita, murieron 16 plántulas, lo mismo ocurrió en la mezcla de fibra de coco/agrolita, donde murieron 20 plántulas. Todo lo contrario en la mezcla de peat moss/agrolita, donde continuó el incremento en el número de plántulas de 86 a 100 nuevos individuos (Tabla 28). El descenso en el número de plántulas, se debió a problemas de contaminación fúngica, ya que se observó la presencia de hongos o no estaban bien esterilizados (Figura 39f).

Después de 90 días de aclimatización, empezó a descender también el número de plántulas de la mezcla con peat moss/agrolita de 100 individuos a 93, de igual manera continuó la muerte de plántulas en las otras dos mezclas. Este descenso continuó hasta los 150 días de aclimatización (Figura 38), siendo menor en la mezcla de peat moss/agrolita, donde sólo se murieron 5 plántulas del período comprendido del día 120 al día 150.

El mayor porcentaje de supervivencia de las plantas al final de 150 días, fue en peat moss/agrolita (98.7 %). Esto coincide con lo reportado por Sierra (2006), para *Laelia*

autumnalis, donde se evaluaron varias mezclas de sustratos en la aclimatización de plántulas, resultando la mezcla de peat moss/agrolita la que tuvo el mayor índice de supervivencia al cabo de 90 días (63.3 %), así como el mayor incremento en biomasa de hojas, raíces y tallos. Cabe señalar que en todas las combinaciones de sustratos empleadas hubo pérdida de plántulas, al igual que en el presente estudio. Por otro lado De la Cruz (2006) reportó que la mejor mezcla para aclimatizar *Prosthechea vitellina*, fue la que contenía corteza de encino/peat moss, ya que la mezcla que contenía agrolita retenía sales. En plántulas de *Euchile mariae*, después de 35 días de aclimatización sobrevivieron el 100 % de las plántulas, en montaje sobre tronco en una mezcla de peat moss/agrolita (3:1 v/v). El peat moss con o sin agrolita, es un buen sustrato, ya que propicia un buen desarrollo de raíces y pseudobulbos, por la capacidad que tiene de retener humedad, además permite una buena aireación en las raíces (Chávez, 2008).

Hay otros sustratos que permiten aclimatizar plántulas provenientes de cultivos *in vitro*, como troncos de tepozán. Barrera (2006), registró un 100% de supervivencia en plantas de *Laelia speciosa*, establecidas sobre troncos de tepozán. Por lo que en futuras investigaciones es factible emplear otros sustratos así como otras combinaciones de los mismos.

Cabe mencionar que hay pocos trabajos en donde se evalúe la aclimatización después de un período tan largo, como lo hecho en este estudio, uno de ellos es el reportado por Sinha y Roy (2004), en *Vanda teres*, donde después de 2 años, reportaron que en las plantas propagadas, ocurrió la floración. Otro trabajo que abarcó un período largo de monitoreo fue el realizado por Rubluo y cols. (1989). Ellos reportaron una supervivencia de 100 % de plántulas de *Bletia urbana*, bajo condiciones de invernadero y posteriormente monitorearon la supervivencia en su ambiente natural, donde 135 plantas fueron sembradas y monitoreadas por 90 días con 56 % de supervivencia. Después de un año 15 % de las plántulas comenzaron a crecer y formaron nuevas hojas y bulbos.

Es necesaria la realización de más trabajos como estos para monitorear cuál es la supervivencia de plantas regeneradas *in vitro* y de ser posible llevar a cabo su reintroducción a sus hábitats naturales.

Tabla 28. Porcentaje de supervivencia de plantas propagadas *in vitro* de *L. gouldiana* en tres sustratos diferentes, después de 150 días de aclimatización.

Combinación de sustratos Tiempo de Aclimatización (días)	Peat moss/fibra de coco/agrolita	Peat moss/agrolita	Fibra de coco/agrolita
	No. plántulas /Supervivencia % (brotes nuevos %)	No. plántulas /Supervivencia % (brotes nuevos %)	No. plántulas /Supervivencia % (brotes nuevos %)
1	75/100 %	75/100 %	75/100 %
30	89/100% (18.7%)	86/100% (14.7%)	97/100% (29.3%)
60	73/97.3 %	100/100% (33.3%)	79/100% (5.3%)
90	54/72 %	93/100% (24%)	58/77.3 %
120	25/33.3 %	79/100% (5.3%))	36/48 %
150	21/28 %	74/98.7 %	20/26.7 %

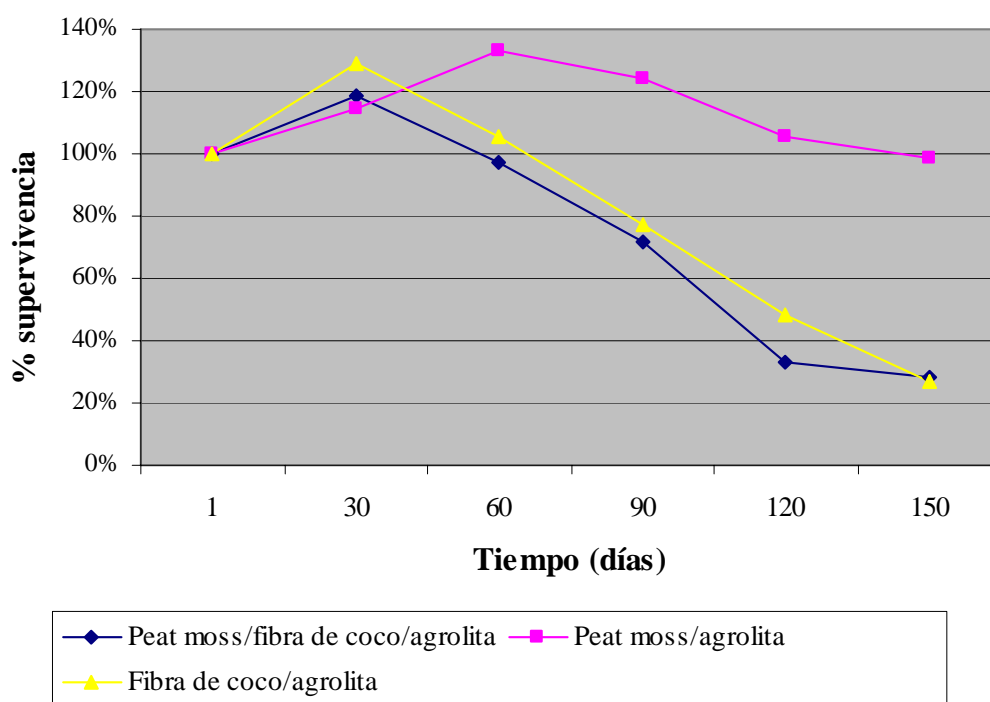


Figura 38. Porcentaje de supervivencia adicionando los brotes nuevos en las tres combinaciones de sustratos a lo largo de 150 días de aclimatización.

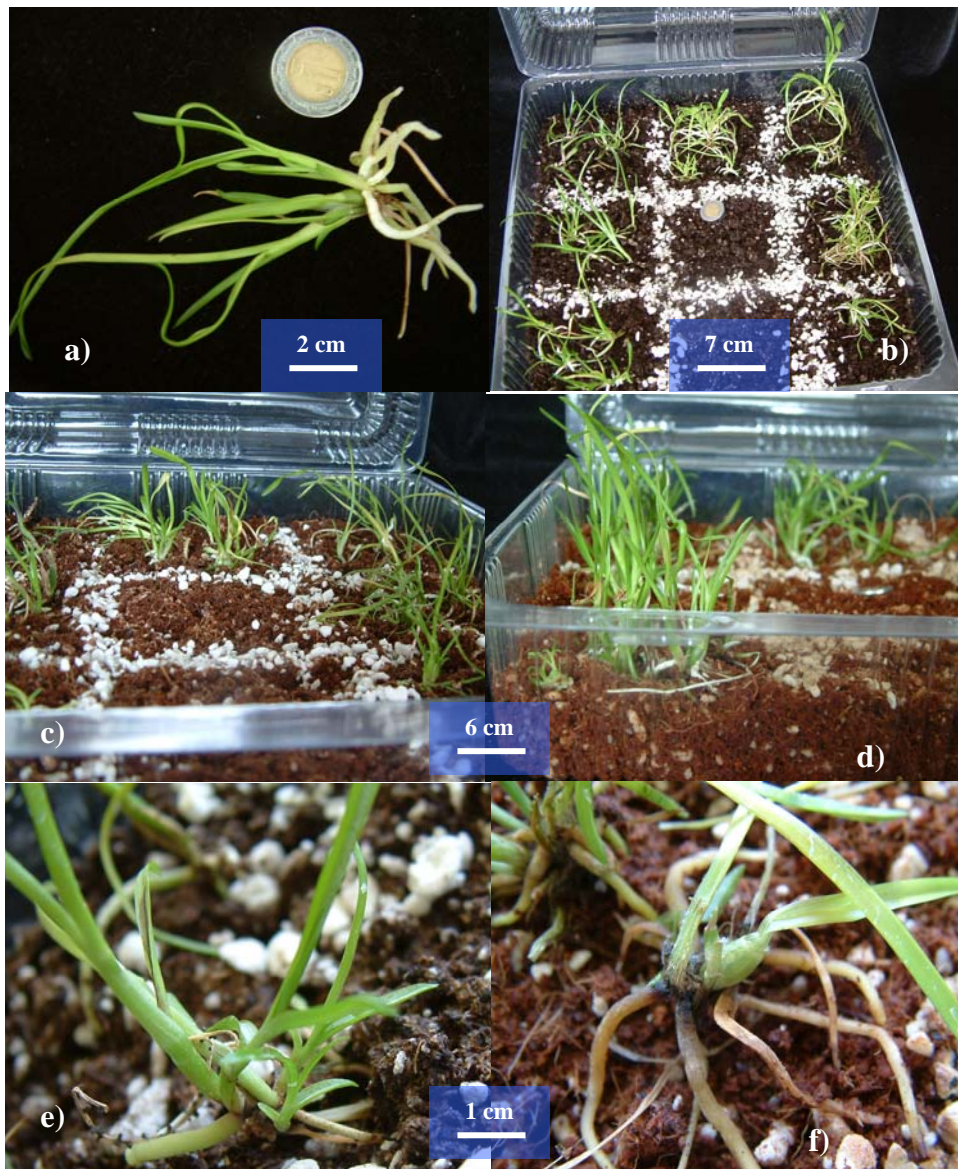


Figura 39. a) Plántula *ex vitro*. Mezclas de sustratos al inicio de la aclimatización, b) peat moss/agrolita; c) fibra de coco/peat moss/agrolita; d) fibra de coco/agrolita; e) formación de brotes a partir de yemas laterales, después de 30 días de aclimatización, y f) plántula con raíces contaminadas por hongos.

Duración total del cultivo *in vitro* y de la producción de plántulas de *Laelia gouldiana*

El presente estudio comprendió el cultivo de segmentos de hojas, tallos y ápices de raíz, en dos tipos de recipientes de cultivo, cajas Petri y frascos Gerber®, además del cultivo con agua de coco, con la obtención final de 999 regenerantes, que se desarrollaron en plántulas completas, a lo largo de 550 días de cultivo entre todos los cultivos. La aclimatización duró 150 días, en la cual se utilizaron plántulas que tenían 450 días de cultivo (15 meses), provenientes del cultivo en frascos Gerber®. En total desde el inicio de los cultivos hasta el final de la aclimatización, fueron 610 días de trabajo (Figura 40 y Apéndice 2). El método a seguir para propagar a *L. gouldiana*, de acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo del presente estudio, sería el cultivo de tallos en medio MS 50 % adicionado con 0.1 mg/L ANA en frascos Gerber®, durante 75 días y su posterior subcultivo a medio MS 50 % basal. Trascorridos de 12 a 15 meses desde el inicio del cultivo se procedería a aclimatizar las plántulas en una combinación de peat moss/agrolita 3:1 (v/v).

Este estudio es un protocolo eficiente para la propagación *in vitro* de *Laelia gouldiana*, orquídea endémica de México y extinta en la naturaleza, que puede ser empleado en la propagación de otras especies del mismo género o de la familia en general, que tengan problemas con su reproducción o que simplemente ésta ya no sea posible, como es el caso de *L. gouldiana*. Además de ser una eficiente estrategia para lograr la formación de plantas completas en un tiempo relativamente corto y más rápido a comparación de lo que ocurre en condiciones naturales, con lo que se podrá producir una gran cantidad de plantas en poco tiempo para efectos de conservación y aprovechamiento del recurso.

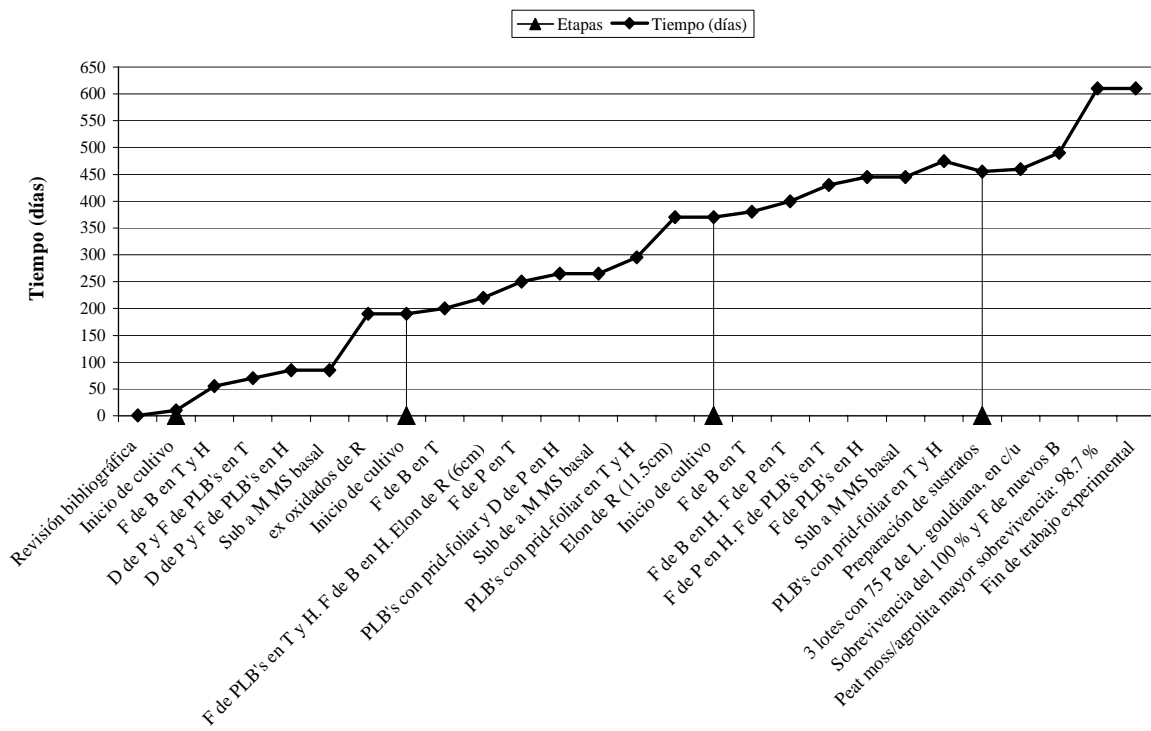


Figura 40. Cronograma del cultivo *in vitro* de *Laelia gouldiana*.

Abreviaturas

B:	brotos
T:	tallos
H:	hojas
D:	desarrollo
P:	plántulas
F:	formación
Sub:	subcultivo
ex:	explantes
R:	raíz
M:	medio
Elon:	elongación
prid:	primordio

7. Conclusiones

Cultivos de raíz

- ★ En ápice de raíz se obtuvo elongación, ésta no estuvo asociada a la presencia de reguladores del crecimiento.
- ★ La mayor elongación del ápice de raíz después de 75 días de cultivo se obtuvo en presencia de 0.5/0.5 mg/L ANA/BA, en frasco Gerber® (Tabla 11).
- ★ A los 180 días de cultivo la mayor elongación ocurrió en el tratamiento libre de reguladores (11.5 cm de longitud) (Tabla 12)
- ★ La oxidación en ápices de raíz fue menor con 0.5/1 mg/L ANA/BA en cajas Petri (Tabla 10).

Cultivos de hoja

- ★ En cajas Petri, el mayor número de brotes/tratamiento (8 brotes) a los 75 días se obtuvo en 0.1 mg/L ANA y en el tratamiento libre de reguladores (Tabla 13).
- ★ A los 180 días de cultivo en cajas Petri el mayor número de brotes/tratamiento (20) se obtuvo con 0.1 mg/L ANA y sin reguladores (Tabla 14).
- ★ En frascos Gerber® se obtuvieron PLB's únicamente con 0.5/1 mg/L ANA/BA, a partir de los 60 días.
- ★ En frascos Gerber® la mayor formación de brotes/tratamiento después de 75 y 180 días de cultivo ocurrió con 0.5/1 mg/L ANA/BA, (9 y 23 brotes respectivamente) (Tabla 15 y 16).

Cultivos de tallo

- ★ En cajas Petri el mayor número de brotes/tratamiento se logró sin reguladores (32 brotes), seguido del tratamiento 0.5 mg/L BA (30 brotes) después de 75 días de cultivo (Tabla 17).
- ★ A los 180 días de cultivo se obtuvo en cajas Petri la mayor formación de brotes/tratamiento de los provenientes de 0.1/1 mg/L ANA/BA (Tabla 19).
- ★ La mayor formación de PLB's en cajas Petri ocurrió a los 60 días de cultivo en 0.5 mg/L BA.

- ★ La mayor cantidad de PLB's se logró en frascos Gerber® con 0.1 mg/L ANA, después de 75 días de cultivo (22 PLB's).
- ★ El mayor número de brotes/explante en frascos Gerber®, se logró con 0.1 mg/L ANA, después de 75 y 180 días de cultivo (70 y 88 brotes respectivamente) (Tabla 20 y 21).
- ★ La oxidación fue menor en el tratamiento con 0.1 mg/L ANA, después de 75 días de cultivo (Tabla 18).

- ★ De los tres tipos de explantes empleados, el segmento de tallo mostró un mayor potencial de regeneración, con 0.1 mg/L ANA y un \bar{X} de 4.38 y 7.33 brotes/explante después de 75 y 180 días de cultivo respectivamente en frascos Gerber® (Tabla 9, 20 y 21).
- ★ El tipo de recipiente, más efectivo que permitió promover respuestas morfogénicas, fueron los frascos Gerber®, en los cultivos de tallo y hoja (Tabla 9).

Cultivos de hoja con agua de coco

- ★ El mayor número de brotes/tratamiento, después de 75 días de cultivo, se logró con 0.1 mg/L/10 % ANA/coco (8 brotes) (Tabla 22).
- ★ El mayor número de brotes/tratamiento ocurrió con 0.1 mg/L/20 % ANA/coco y con 0.1 mg/L/10 % ANA/coco (22 y 21 brotes respectivamente) después de 180 días (Tabla 23).

Cultivos de tallo con agua de coco

- ★ La mayor formación de brotes con agua de coco, fue con 20 % coco, después de 75 días de cultivo (53 brotes) (Tabla 24).
- ★ Después de 180 días de cultivo fue con 0.1 mg/L ANA (100 brotes) (Tabla 25).
- ★ PLB's con agua de coco se formaron con 10 % coco en frascos Gerber® a los 60 días (Figura 33e).

Aclimatización

- ★ El método empleado en la aclimatización de plántulas de *L. gouldiana*, se vio favorecido con la combinación de sustratos de peat moss/agrolita (3:1v/v).
- ★ Las plántulas después de 150 días de aclimatización tuvieron una sobrevivencia de 98.7 % con peat moss/agrolita (3:1v/v) (Tabla 28).

- ★ Se logró establecer un protocolo eficiente para la regeneración de *Laelia gouldiana*, especie endémica de México y extinta en la naturaleza, los resultados vislumbran una opción para el estudio, la conservación y el aprovechamiento sostenible, de ésta y otras especies de orquídeas en peligro de extinción, o de difícil propagación sexual.

8. Apéndices

APÉNDICE 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) 1962.

N°	Componentes	g/l	g/10 l
1	MACRONUTRIENTES		
	(NH ₄)NO ₃	1.65	16.5
	KNO ₃	1.9	19
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.37	3.7
	KH ₂ PO ₄	0.17	1.7
2	CALCIO		
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.44	4.4
3	MICRONUTRIENTES		
	MnSO ₄ * H ₂ O	0.01689	0.1689
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.0086	0.086
	H ₃ BO ₃	0.0062	0.062
	KI	0.00083	0.0083
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.00025	0.0025
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.000025	0.00025
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.000025	0.00025
4	FIERRO		
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278	0.278
	Na ₂ EDTA	0.0373	0.373
5	VITAMINAS		
	Tiamina * HCl	0.0001	0.001
	Ácido Nicotínico	0.0005	0.005
	Piridoxina * HCl	0.0005	0.005
6	INOSITOL	0.10	1.0
7	GLICINA	0.002	0.02
8	CARBOHIDRATOS (Sacarosa)	30.0	
	GELIFICANTE (Phytigel)	5.0	

pH: 5.7

Nota. Los stocks que se diluyen al 50 % son: Macronutrientes, micronutrientes, calcio, fierro, vitaminas, inositol y glicina. La fuente de carbohidratos y el gelificante permanecen al 100 %.

APÉNDICE 2. Cronograma de actividades y tiempos de respuesta del: Cultivo *in vitro* de *Laelia gouldiana*, para lograr la formación de plantas completas a partir de ápices de raíz y segmentos de tallo y hoja en medio MS.

Actividades	Etapas	Tiempo (días)
Revisión bibliográfica, durante todo el experimento		A lo largo de la realización del presente estudio
Inicio de cultivo de explantes	Cultivos en cajas Petri	10
Aparición de brotes en tallos y hojas		55
Desarrollo de plántulas y formación de PLB's en tallos		70
Desarrollo de plántulas y formación de PLB's en hojas		85
Subcultivo de explantes y regenerantes a medio MS basal		85
Todos los explantes oxidados en cultivos de raíz		190
Inicio de cultivo de explantes	Cultivos en frascos Gerber®	190
Formación de brotes en tallos de yemas y nudos		200
Formación de PLB's en tallos y hojas. Formación de brotes en hojas. Elongación de raíz hasta 6 cm		220
Formación de plántulas en tallos		250
PLB's con primordios foliares y desarrollo de plántulas en hoja		265
Subcultivo de explantes y regenerantes a medio MS basal		265
PLB's con primordios foliares en tallo		295
Elongación de raíz alcanzando longitud de 11.5 cm	370	
Inicio de cultivo de explantes	Cultivos con agua de coco	370
Formación de brotes en tallo		380
Formación de brotes en hoja. Formación de plántulas en tallo		400
Formación de plántulas en hoja. Formación de PLB's en tallo		430
Formación de PLB's en hoja		445
Subcultivo de explantes y regenerantes a medio MS basal		445
PLB's con primordios foliares en tallos y hojas		475
Preparación de sustratos	Aclimatización	455
Tres lotes con 75 plántulas de <i>L. gouldiana</i> , en c/u		460
Sobrevivencia del 100 % y formación de nuevos brotes		490
Peat moss/agrolita mayor sobrevivencia: 98.7 %		610
Fin de trabajo experimental		610

9. Literatura citada

- ★ Aharoni, N., Anderson, J. D. y Lieberman, M. 1979. Production and action of ethylene in senescing leaf discs effect of indoleacetic acid, kinetin, silver ion, and carbon dioxide. *Plant Physiology* 64: 805-809.
- ★ Alvarado, C.U. 2000. Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices. Informe de proyecto de graduación para optar por el grado de bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de biología. 89 p.
- ★ Álvarez, J.S. 1993. Contribución de la Sociedad Mexicana de Botánica a la Investigación y Conservación de la Biodiversidad. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 44: 51-57.
- ★ Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review* 33:1-97.
- ★ Arditti, J. 1977. Orchid Biology. Reviews and Perspectives I. Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press. Ithaca and London, United Kingdom. 310 p.
- ★ Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA. 691 p.
- ★ Arditti, J. y Ernst, R. 1993. *Micropropagation of Orchids*. Wiley Interscience. New York. 682 p.
- ★ Ávila, D.I. y Oyama, K. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94 (2): 184-193.
- ★ Baksha, R., Akhter, M., Khatun, R. y Munshi, J. 2005. Micropropagation of *Aloe barbadensis* Mill. through *in vitro* culture of shoot tip explants. *Plant Tissue Culture & Biotechnology* 15 (2): 121-126.
- ★ Balch, E.P.M., Pérez, M.E., Villalobos, E., Meza, E., Morones, L. y Lizalde, H. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacto by axillary proliferation. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 34:131-135.
- ★ Ball, E., Arditti, J. y Churchill, M. 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. *Orchid Review* 79: 281-288.

- ★ Basker, S., y Narmatha-Bai, V. 2006. Micropropagation of *Coelogyne stricta* (D. Don) Schltr. Via pseudobulb segment cultures. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* (6): 31-35.
- ★ Barba, A., Luna, R. y Romero, A. 2002. Orquideología Básica. Biotemas. U.I.B.V.FES. Zaragoza. UNAM. México.
- ★ Barrera, V.D. 2006. Regeneración *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., (Orchidaceae) a partir de hojas inmaduras y callo. Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México (En proceso).
- ★ Biddington, N. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulators* 11:173-187.
- ★ Biondi, S., Scaramagli, S., Capitán, F., Marino, G., Altamura, M.M. y Torrigiani, P. 1998. Ethylene involvement in vegetative bud formation in tobacco thin layers. *Protoplasma* 202: 134-144.
- ★ Borkowska, B. 2003. Citocininas. En: *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas*. Vol. 1. Propiedades y Acción. Ediciones Mundi-Prensa, México, D.F. 93-122.
- ★ Buddendorf-Joosten, J. y Woltering, E. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 15: 1-16.
- ★ Cahuantzi, A. 1998. Propagación *in vitro* de *Oncidium cavendishianum* Batem (Orchidaceae) a partir de explantes de la inflorescencia. Tesis de Licenciatura Biología. FES Iztacala. UNAM. México. 43 p.
- ★ Chase, M., Hanson, L., Albert, V., Whitten, M., y Williams, N. 2005. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95: 191-199.
- ★ Chávez, A. 1980. Cultivo asimbiótico de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Ángel. Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 81 p.
- ★ Chávez, V. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Stanhopea tigrina* (Bateman) (Orchidaceae) en distintas etapas de desarrollo. Tesis de Ingeniería en Agronomía. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. 69 p.

- ★ Chen, J., Chang, C. y Chang, W.C. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Reports* 19:143-149.
- ★ Chen, J. y Chang, W. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* "Gower Ramsey". *Plant Growth Regulation* 34 (2): 229-232.
- ★ Chen, T., Chen, J. y Chang, W.C. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* 76: 11-15.
- ★ Chen, J. y Chang, C. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum* 50 (2): 169-173.
- ★ Chen, U.C., Hsia, C.H., Yeh, M.S., Agrawal, D.C. y Tsay, H.S. 2006. *In vitro* micropropagation and ex vitro acclimation of *Bupleurum kaoi* an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 42: 128-133.
- ★ Churchill, M., Ball, E. y Arditti, J. 1973. Tissue culture of orchids. I. Methods for leaf tips. *New Phytologist* 72: 161-166.
- ★ CIMS (Centro de Inteligencia sobre Mercados Sostenibles). 2005. Prospección rápida del mercado de la unión europea de Orquídeas *in vitro*. Preparado para fundación Bolivia exporta Programa Nacional de Biocomercio Sostenible. 41 p.
- ★ Coenen, C. y Lomax, T. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Elsevier Science Ltd.* 2 (9): 351-355.
- ★ CONABIO, 1998. *La diversidad biológica de México: Estudio de País*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 341 p.
- ★ CONANP, 2003. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán. México. 208 p.
- ★ Constabel, F., y Shyluk, J. 1998. Initiation, nutrition, and maintenance of plant cell and tissue cultures. En: Indra K. Vasil y Trevor A. Thorpe (eds.). *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, Holanda. 3-15.
- ★ Cribb, P., Kell, S., Dixon, K. y Barrett, R. 2003. Orchid Conservation: a global perspective. En: Dixon, K.W., Kell, S. P., Barret, R. L, and Cribb, P. J (eds.). *Orchid Conservation*. *Natural History Publications*, Kota Kinabalu, Sabah. 1-24.

- ★ Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, Nueva York. 1262 p.
- ★ De la Cruz, R. 2006. Micropropagación y adaptación a condiciones ambientales de: *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 21-32.
- ★ Drake, P.M.W., John, A., Power, J.B. y Davey, M.R. 1997. Cytokinin pulse-mediated shoot organogenesis from cotyledons of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] and high frequency *in vitro* rooting of shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 147–151.
- ★ Dressler, R. 1981. *The Orchids*. Natural history and classification. Harvard University Press. London 332 p.
- ★ Dressler, R. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Theodore R. Dudley (eds.), Portland, Oregon, 313 p.
- ★ Elizondo, J. 2000. Germinación de semillas de especies nacionales de orquídea en medio de cultivo naturales. Informe de práctica de especialidad. Escuela de Biología, Instituto tecnológico de Costa Rica 25-42.
- ★ Flachsland, E., Terada, G. y Mroginski, L. 2001. Regeneración de protocormos y yemas de *Oncidium bifolium* Sims. por cultivo *in vitro* de láminas foliares. Página en red: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2001/5-Agrarias/A-028.pdf> (21 de Octubre, 2009).
- ★ Flores, O. y Gerez, P. 1994. Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso de suelo. CONABIO, UNAM, México. 439 p.
- ★ Geetha, S. y Shetty, S.A. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current Science* 79 (6): 886-889.
- ★ George, E. y Sherrington, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstone, England. 709 p.
- ★ Guerrant, E., Havens, K. y Maunder, M. 2004. *Ex situ* plant conservation supporting species survival in the wild. Página en red: http://www.bgci.org/ourwork/ex_situ/
- ★ González, A., Rodríguez, R. y Sánchez, R. 1991. Ethylene and *in vitro* rooting of hazelnut (*Corylus avellana*) cotyledons. *Physiologia Plantarum* 81 (2): 227-233.
- ★ Halbinger, F y Soto, M. 1997. *Laelias of México*. Orquídea. Asociación Mexicana de Orquideología A. C. México. 135-139.

- ★ Hágsater, E., Soto, M.Á., Salazar, G.A., Jiménez, R., López, M.A. y Dressler, R.L. 2005. *Las Orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México, D. F. 302 p.
- ★ Hazarika, B. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85 (12): 1704-1710.
- ★ Hurtado, D. y Merino, M. 1987. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Ed. Trillas, México 232 p.
- ★ Islam, M., Dembele, D. y Keller, E. 2005. Influence of explant, temperatura and different culture vessels on *in vitro* culture for germoplasm maintenance of four mint accessions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81: 123-130
- ★ Jankiewicz, L. 2003. *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas*. Volumen I. Propiedades y Acción. Ed. Mundi-Prensa. México, D.F. 21-55.
- ★ Jezek, Z. 2005. *La enciclopedia de las orquídeas*. Ed. LIBSA, Madrid. 304 p.
- ★ Jo, M., Ham, I., Park, S., Seo, G., Han, G. y Woo, I. 2006. Effect of plant growth regulators on clonal production through basal stem explant culture of *Phalaenopsis* hybrid. *Acta Horticulturae* (ISHS) 764:279-284.
- ★ Kadlecěk, P., Tichá, I., Haisel, D., Capková, V. y Schäfer, C. 2001. Important of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161: 695-701.
- ★ Kakimoto, T. 2003. Biosynthesis of cytokinins. *Journal Plant Research* 116: 233-239.
- ★ Kane, M. y Philman, N. 1992. Effect of culture vessel type on *in vitro* multiplication of *Pontederia cordata* L. *Proceedings Florida State Horticultural Society* 105: 213-215.
- ★ Kebebew, A., Gaj, M.D. y Maluszynski, M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus culture of tef, *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter. *Plant Cell Reports* 18: 154-158.
- ★ Kieber, J.J. 2002. Cytokinins. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. 1-25.
- ★ Kikuta, Y. y Okazawa, Y. 1984. Control of root and shoot-bud formation from potato tuber tissue cultures *in vitro*. *Plant Physiology* 61: 8-12.
- ★ Kim, K.S. y Jang, G.W. 2004. Micropropagation of *Drosera peltata*, a tuberous sundew, by shoot tip culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 211-214.
- ★ Kim, M., y Kim, J. 2003. Micropropagation of *Dendrobium* hybrids through shoot tip culture. ISHS Acta Horticulturae 624: XXVI International Horticultural Congress:

Elegant Science in Floriculture. Página en red: <http://www.actahort.org/books/624/624-73.htm>

- ★ Kintzios, S., Drossopoulos, J.B. y Lympopoulos, Ch. 2001. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 55-62.
- ★ Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- ★ Krapiec, P.V., Milaneze, M.A. y Pires da Silva Machado, M.F. 2003. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*. Maringá 25 (1): 179-182.
- ★ Machakova, I., Zazimalora, E. y George, E.F. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. En: E. F. George; M. A. Hall, y Geert-Jan De Klek (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. 175-204.
- ★ Manzanilla, M.A. 2004. Inducción de embriogénesis somática de tejido nucelar de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L.). Tesis Maestría en Ciencias, Área Biotecnología. Universidad de Colima. 109 p.
- ★ Mata-Rosas, M. y Salazar-Rojas, V. M. 2009. Propagation and establishment of three endangered Mexican orchids from protocorms. *Horticultural Science* 44 (5): 1395-1399.
- ★ Martínez, C. 1970. *Pegamentos, gomas y resinas en el México prehispánico*. Resistol, S. A. México. 69 p.
- ★ McNeely, J.A. 1990. *Conserving the World's Biological Diversity*. Gland, Switzerland, and Washington, D.C. World Conservation Union and World Resources Institute.
- ★ Mok, D. y Mok, M. 2001. Cytokinin metabolism y action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:89-118.
- ★ Monette, P.L. 1983. Influence of size of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in a liquid medium. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2: 327-332.
- ★ Morel, G.M. 1974. *Clonal multiplication of orchids*. En: Withner C. L. (ed.) *The orchids: Scientific Studies*. John Wiley & Sons, New York. 169-222.
- ★ Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.

- ★ Murthy, H. y Pyati, A. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lind. (Orchidaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 37: 223-226.
- ★ Navarro, U.S. y Vera, E.R. 1987. *Historia del cultivo de tejidos vegetales*, 1-15. En: Hurtado M., Daniel V. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México. 232 p.
- ★ Nayak, N., Patnaik, S. y Rath, S. 1997a. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and Mccann. *Plant Cell Reports* 16:583-586.
- ★ Nayak, N., Rath, S. y Patnaik, S. 1997b. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Scientia Horticulturae* 71 (3-4): 243-250.
- ★ Nguyen, H. y Tran D. 2006. *In vitro* propagation of *Dendrobium* orchid, through thin stem section culture. Página en red: <http://www.hcmuaf.edu.vn/cpb/phtqt/biotech2006/papers/nonghoc/TC-THNhat.pdf>.
- ★ Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Ástot, C., Dolezal, K. y Sandberg, G. 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *PNAS* 101 (21): 8039-8044.
- ★ Nowak, B., Miczynski, K. y Hudy, L. 2004. Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of “Wegierka Zwyczajna” plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76: 255-260.
- ★ Ogasawara, N., Hanchishi, S., Suzuki, C. y Takago, H. 1995. The growth and CO₂ exchange of *Cymbidium* protocorm-like bodies related to sugar in the culture medium. *Acta Horticulturae. Environmental Control in Plant Tissue Culture* 393: 85-90.
- ★ Padrón, H. 2006. Germinación asimbiótica *in vitro* de *Govenia capitata* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 109p.
- ★ Paek, K. Y. y Yeung, E. C. 1991. The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N6-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24 (2): 65-71.
- ★ Pang, J. L., Wang, L. L., Hu, J. Q., Xiang, T. H. y Liang, H. M. 2006. Synergistic promotion of gibberellin and cytokinin on direct regeneration of floral buds from *in*

- vitro* cultures of sepal segments in *Sinningia speciosa* Hiern. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 42:450–454.
- ★ Park, S., Murthy, H. y Paek, K. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 38:168-172.
 - ★ Park, S., Murthy, H. y Paek, K. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science* 164: 919-923.
 - ★ Pastelín-Solano, M.C., Castañeda-Castro, O., Pastelín-Méndez, P. y Pastelín-Méndez, J. L. 2005. Micropropagación de Ginger (*Alpinia purpurata pink*). En: Héctor González Rosas y Carmen Jacinto Hernández (eds.). Asociación Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal, A. C. México, D. F. 26-30
 - ★ Peres, L. y Kerbauy, G. 1999. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). *Plant Cell Reports* 18:1002-1006.
 - ★ Pérez, E., Ramírez, M., Núñez, P. y Ochoa, A. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179 p.
 - ★ Philip, V. y Nainar, S. 1988. *In vitro* transformation of root meristem to shoot and plantlets in *Vanilla planifolia*. *Annals of Botany* 61: 193-199.
 - ★ Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa, Madrid. 326 p.
 - ★ Pindel, A. y Pindel, Z. 2004. Initiation of *in vitro* cultures of chosen endangered European species of orchids. *Folia Horticulturae Annals* 16(2): 111-117.
 - ★ Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadlecěk, P., Haisel, D. y Plzákova, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biología Plantarum* 42 (4): 481-497.
 - ★ Possiel, W., Saunier, R., y Meganck, R. 1995. *In situ* conservation of biodiversity. En: Richard E. Saunier and Richard A. Meganck (eds.). Conservation of Biodiversity and the New Regional Planning. Organization of American States and the IUCN, The World Conservation Union y Commission of the European Communities.
 - ★ Radice, S. 1998. Herramientas básicas. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Parte II. 30-32.
 - ★ Ramírez, J. 1996. Orquídeas de México. *Biodiversitas*. Boletín Bimestral de la Comunidad Nacional del Conocimiento (CONABIO) 2 (5): 1-5.

- ★ Ramos, T. y Carneiro, I. 2007. Multiplicacao *in vitro* de *Cattleya x mesquittae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. *Pesquisa. Agropecuaria Tropical* 37 (1): 10-15.
- ★ Razdan, M. K. 2003. *Introduction to plant tissue culture*. Science Publishers, Inc, 2° ed. Enfield, NH, USA. 3-59.
- ★ Rojas, F. 2007. Regeneración *in vitro* de *Vanilla planifolia* G. Jackson, en Andrews (Orchidaceae), especie endémica mexicana. Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 79 p.
- ★ Rubluo, A., Chávez, V. y Martínez, A. 1989. *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana* 4 (2): 68-73 p.
- ★ Sagawa, Y. 1991. Clonal Propagation of orchids. En: *Plant cell Tissue Culture Manual C1*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 1-7.
- ★ Santos-Díaz, M.S., Méndez-Ontiveros, R. y Arredondo-Gómez, A. 2003. *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 39 (5): 480-484.
- ★ Santos-Hernández, L., Martínez-García, M., Campos, J. E. y Aguirre-León, E. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *HortScience* 40 (2): 439-442.
- ★ Saunier, R. y Meganck, R. 1995. Introduction. En: Richard E. Saunier and Richard A. Meganck (eds.). *Conservation of Biodiversity and the New Regional Planning*. Organization of American States and the IUCN, The World Conservation Union y Commission of the European Communities.
- ★ Schaller, E. y Kieber, J. 2002. Ethylene. *The Arabidopsis Book*. *American Society of Plant Biologists* doi: 10.1199/tab.oo71. 1-4.
- ★ SEMARNAT, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. 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 (6 de marzo 2002). México, D.F.
- ★ Sheelavantmath, S., Murthy, H., Pyati, A., Ashok-Kumar, H. y Ravishankar, B. 2000. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. Through rhizome section culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60 (2): 151-154.

- ★ Shefferson, R., Proper, J., Beissinger, S. y Simms, E. 2003. Life history trade-offs in a rare orchid: the costs of flowering, dormancy, and sprouting. *Ecology* 84 (5): 1199–1206.
- ★ Shiau, Y., Nalawade, S., Hsia, C., Mulabagal, V. y Tsay, H. 2005. *In vitro* propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall. Ex Lindl., from axenic nodal segments. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 41: 666-670.
- ★ Sinha, P. y Roy, S. 2004. Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. through *in vitro* culture. *Plant Tissue Culture* 14(1): 55-61.
- ★ Sierra, H. 2006. Germinación *in vitro* y adaptación a condiciones *ex vitro* de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lexarza) Lindl (Orchidaceae.). Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México, D. F. 117 p.
- ★ Soto, M. 2002. *Laelia gouldiana* Rchb. f. En: Hágsater, E. y Soto, M. (eds.). Icones Orchidacearum, parte 5-6. Asociación Mexicana de Orquideología. A.C.México. Plate 598.
- ★ Soto, A. 1996. México. En: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids-Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK. 53-58.
- ★ Soto, M. y Hágsater, E. 1990. *Algunas ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado preliminar de los taxa amenazados*. En: José L. Camarillo R. y Fermín Rivera A. (eds.). Áreas naturales protegidas en México y especies en extinción. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM. México, D.F. 155-172.
- ★ Suárez, I. 2006. Regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (ORCHIDACEAE), especie endémica de México. Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 143 p.
- ★ Sujatha, M. y Reddy, T. P. 1998. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell Reports* 17: 561-566.
- ★ Takejiro, T., Takayuri, S. y Michhio, T. 2006. Effects of culture vessel on *in vitro* morphogenesis in shoot formation of *Solanum melongena* L. and *S. integrifolium* Poir. *Journal of Society of High Technology in Africulture* 18 (2): 110-114.
- ★ Teixeira, J., Chan, M., Chai, M. y Tanaka, M. 2006. Priming abiotic factors for optimal hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) PLB and callus induction, plantlet formation, and their subsequent cytogenetic stability analysis. *Scientia Horticulturae* 109 (4): 368-378.

- ★ Téllez, A. 2003. *La etnobotánica de la familia Orchidaceae en México*. 163-169 p. En: Montufar, L. A. (ed.). *Estudios etnobiológicos. Pasado y presente de México*. INAH-Conaculta. México.
- ★ Thorpe, T.A. 1998. Morphogenesis and Regeneration. En: Indra K. Vasil y Trevor A. Thorpe (eds.). *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, Holanda. 17-36.
- ★ Tinoco, M. 2006. Adquisición de competencia para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya x esbetts* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 127p.
- ★ Tisserat, B. y Jones, D. 1999. *Plant cell culture protocols*. En: *Methods in molecular biology*. Robert D. Hall (eds.). Humana Press. Totoma, New Jersey 111: 127-133.
- ★ Toledo, V. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo* 14 (81): 17-30.
- ★ Toledo, V. y Ordóñez, M. 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. En: Ramamoorthy, T., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (eds.). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. 792 p.
- ★ Torres, J. y Mogollón, N. 2000. Micropropagación de *Cattleya mossiae* Parker ex Hook, mediante brotación axilar inducida por tidiazurón. *Bioagro* 12 (1): 10-14.
- ★ Vaasa, A y Rosenberg, V. 2004. Preservation of the rare terrestrial orchids *in vitro*. *Acta Universitatis Latviensis. Biology* 676: 243–246.
- ★ Vacin, E., y Went, F. 1949. Some pH changes in nutrient solution. *Botanical Gazette* 110: 605-613.
- ★ Vaz, A., Kerbauy, G. y Figueiredo-Ribeiro, R. 1998. Changes in soluble carbohydrates and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 54: 105-111.
- ★ Wang, K., Li, H. y Ecker, J. 2002. Ethylene biosynthesis and signalling networks. *Plant Cellular Agricola* 14: 131-133.
- ★ Wiard, L.A. 1987. *An introduction to the Orchids of Mexico*. Comstock Publishing Associates. USA. 239 p.

- ★ Williams, B. 1973. *Orchid Grower`s Manual*. Strauss y Cramer GmbH. Alemania. 425-440.
- ★ Withner, C. 1974. *Development in Orchid Physiology*. En: *The Orchids Scientific Studies* (eds.) Withner. Wiley. New York. 129-168.
- ★ Withner, C. y Krieger, R. 1985. *The Orchids*. Scientific Studies. Publishing Company. Florida.
- ★ Wright, N.P. 1958. Orquídeas de México. Ed. Foirnier, S. A. México, D. F. 23 p.
- ★ Yo, H. y Goh, J. C. 2001. Molecular genetics of reproductive biology in orchids. *Plant Physiology* 127 (4): 1390-1393.
- ★ Zaid, A. 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures-A review. En: *In vitro* problems related to mass propagation. *Acta Horticulturae* 212: 561-564.