



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Micropropagación de *Barkeria whartoni* y *Barkeria scandens* (Orchidaceae), especies mexicanas en peligro de extinción.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ALEJANDRA VILLAFUERTE SALAZAR



DIRECTOR DE TESIS:
DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
2013



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 DEL 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

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

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

Micropropagación de Barkeria whartoni y Barkeria scandens (Orchidaceae), especies mexicanas en peligro de extinción.

realizado por **Villafuerte Salazar Alejandra** con número de cuenta **3-0523577-2** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Sonia Vázquez Santana

Propietario Dr. Eduardo Alberto Pérez García

Propietario Tutor Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Suplente Dr. Martín Mata Rosas

Suplente Dr. Alejandro Martínez Palacios

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "
Ciudad Universitaria, D. F., a 28 de septiembre de 2012
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

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.
MAG/mdm

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, hay otro desafío.

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

Sigue aunque todos esperen que abandones.

No dejes que se oxide el hierro que hay en tí.

DEDICATORIA

A **Díos** quién supo guiarme por el buen camino, por darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres **Tere** e **Ignacio** con todo mi amor y cariño por todo su apoyo y amor incondicional brindado para lograr mi formación académica.
Por darme todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos. ¡LOS AMO, SON Y SERÁN SIEMPRE UNA FUENTE INFINITA DE ADMIRACIÓN!

A mis hermanos **Carlos**, **Lupita** y principalmente a tí **Laura**, gracias por ser mi amiga y mi apoyo en todo momento, gracias por creer en mí y no dejarme sola cuando más te he necesitado .

A tí **Uriel**, por creer en mí, por todo el apoyo brindado, por la paciencia, comprensión, tolerancia, y sobretodo gracias por todo tu AMOR, ese que me motiva e inspira a seguir adelante ¡Gracias de todo corazón!

A mis sobrinos **Daniel** y **Camila**, por ser mi inspiración, Y por recordarme que siempre hay tiempo para todo. Los adoro.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente con una educación sólida y de calidad.

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por recibirme como alumna y brindarme una educación de calidad.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, por recibirme como tesista, por brindarme el apoyo, los espacios y una educación de nivel que me ha permitido crecer profesionalmente.

A todos los maestros que han contribuido en mi formación académica, por darme las herramientas para seguir esforzándome y superándome.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, por ser una extraordinaria persona, maestro y amigo, quien inculcó en mí el amor a la investigación, por su apoyo constante, por creer en mí, por conducirme por el camino de la superación y la justicia y por la dirección para la realización de esta investigación. Gracias por todos sus consejos.

Al M. en C. Octavio González Caballero a quien aprecio y respeto mucho, gracias por todo su apoyo, por todas sus enseñanzas y por forjar en mí un amor por la ciencia. Además agradezco de todo corazón su valiosa amistad, que es invaluable.

A la Dra. Estela Sandoval Zapotitla por su ayuda para la realización de los análisis histológicos de la presente investigación. Y sobre todo agradezco su enorme calidez humana, el apoyo que siempre mostró hacia mi persona, de todo corazón, gracias por todas sus enseñanzas de vida. ¡La quiero y respeto mucho!

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por las observaciones realizadas para esta tesis, y por el apoyo mostrado.

Al Dr. Eduardo A. Pérez García por las sugerencias realizadas para esta investigación, por el material bibliográfico y biológico proporcionado y por su disposición para atender todas mis dudas.

Al Dr. Martín Mata Rosas por todo el apoyo proporcionado, así como por las sugerencias proporcionadas para mejorar este trabajo. En verdad gracias.

Al Dr. Alejandro Martínez Palacios por sus acertadas sugerencias por todos los magníficos “tips” proporcionados para el cultivo de orquídeas y por todos los conocimientos brindados.

Al Biól. Gabriel Olalde Parra por ser una gran persona, amigo y maestro a quien admiro y respeto. ¡Gracias por todo el apoyo incondicional! Gracias por los consejos para mejorar académica, profesional y personalmente.

A la Biól. Bárbara Estrada y, por ser una magnífica persona y por todo su apoyo. Gracias por la amistad, cariño y afecto logrado estos años.

A la Biól. María Concepción Guzmán Ramos por ser una maravillosa persona, por su paciencia y ayuda y por las correcciones realizadas para los análisis histológicos de la presente investigación.

A mis queridas amigas Amanda Alcántara, Mayela Arguelles, Eunice, Marlenne Hernández gracias por todos los momentos compartidos durante la carrera. Las quiero mucho.

A Oscar Jiménez por los gratos momentos compartidos, por tu amistad ¡Muchas gracias!

A mis amigas y compañeras Jaqueline y Lorena, por los momentos compartidos, por la amistad lograda, las quiero mucho.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y de otras áreas del Jardín Botánico de la UNAM: Wendy, Fernando, Bertha, Mitzzi, Alejandro Villada, Héctor, Alejandra Fernández, Alfonso, Mariana, Alejandra Pérez, Gerardo, Sergio, Germán, Paulina, Alfonso, Mary Carmen, Pablo, Arturo, Hugo, Arquitecto Oscar, Julio.

ÍNDICE

Contenido	Página
Figuras	3
Tablas	5
Gráficas	7
Abreviaturas	8
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1 MARCO TEÓRICO	12
Biodiversidad	12
Características generales de la familia Orchidaceae	16
Género <i>Barkeria</i> (C. Schweinf)	24
<i>Barkeria whartonia</i> (C. Schweinf)	24
Clasificación taxonómica	25
Descripción botánica	25
Distribución geográfica e importancia ecológica	26
Situación actual de la especie	28
<i>Barkeria scandens</i> (La Llave et Lex)	29
Clasificación taxonómica	29
Descripción botánica	29
Distribución geográfica e importancia ecológica	31
Situación actual de la especie	32
Cultivo de Tejidos Vegetales	34
Factores involucrados durante la morfogénesis <i>in vitro</i>	39
Reguladores de crecimiento	40
Auxinas	40
Citocininas	41
Interacción auxina- citocinina	42
Micropropagación de orquídeas	44
2.2 JUSTIFICACIÓN	49

2.3 OBJETIVOS	50
Objetivo general	50
Objetivos particulares	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
Material biológico	51
Desinfección y siembra de las semillas de <i>B. whartonia</i>	51
Fase de Inducción de <i>B. whartonia</i>	52
Fase de inducción de <i>B. scandens</i>	54
Análisis estadísticos	57
Fase de desarrollo e individualización	57
Fase de aclimatización	57
Análisis estructural de los regenerantes	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
Desinfección del material biológico	60
Germinación asimbiótica de semillas de <i>B. whartonia</i>	61
Fase de inducción en <i>B. whartonia</i>	63
Fase de inducción en <i>B. scandens</i> :	73
Cultivo <i>in vitro</i> de secciones de hoja	75
Cultivo <i>in vitro</i> de secciones de tallo	90
Cultivo <i>in vitro</i> de ápice de raíz	102
Fase de individualización	104
Fase de aclimatización	105
Tiempo de experimentación	109
Análisis estructural de los regenerantes de <i>B. whartonia</i> y <i>B. scandens</i>	111
5. CONCLUSIONES	123
<i>B. whartonia</i>	123
<i>B. scandens</i>	124
<i>B. whartonia</i> y <i>B. scandens</i>	125
6. BIBLIOGRAFÍA	126

Figura		Página
Figura 1	Tipo de crecimiento en orquídeas: a) Simpodial, b) Monopodial	16
Figura 2	Morfología básica de la flor en orquídeas: Género <i>Cymbidium</i>	18
Figura 3	Inflorescencia de <i>Barkeria whartonia</i>	24
Figura 4	Lámina de <i>Barkeria whartonia</i> (C. Schweinf.)	27
Figura 5	<i>Barkeria whartonia</i> (Orchidaceae) <i>in situ</i> en floración	28
Figura 6	Flor <i>B. scandens</i>	29
Figura 7	Lámina de <i>Barkeria scandens</i> (C. Schweinf.)	30
Figura 8	Plantas de <i>Barkeria scandens</i> con inflorescencia	33
Figura 9	Concentraciones relativas de auxinas y citocininas que generalmente son requeridas durante la morfogénesis <i>in vitro</i>	43
Figura 10	Cápsula de <i>B. whartonia</i> dehiscente	52
Figura 11	Inducción de una respuesta morfogénica a partir de secciones longitudinales de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> , cultivadas <i>in vitro</i> en medio MS y MS 50%	54
Figura 12	Inducción de una respuesta morfogénica a partir de secciones de tallo, raíz y hoja de <i>Barkeria scandens</i> , cultivados <i>in vitro</i> en medio MS y MS 50%	56
Figura 13	Etapas del desarrollo de la germinación de <i>B. whartonia</i>	62
Figura 14	Respuesta morfogénica a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones longitudinales de protocormos de <i>B. whartonia</i> en medios MS en combinación con 1mg/L ANA y 1 mg/L BAP	65
Figura 15	Formación directa y asincrónica de PLB's en <i>Barkeria whartonia</i> a partir de secciones longitudinales de protocormos cultivados <i>in vitro</i> en medio MS 50%	65
Figura 16	Resultados a los 50, 80 y 120 días de iniciados los cultivos. a, b y c) formación de PLB's vía directa en <i>Barkeria whartonia</i> a partir de secciones longitudinales de protocormos cultivadas <i>in vitro</i> en medio MS 50%. d, e y f) Formación directa de PLB's a partir de secciones longitudinales de protocormos en medio MS en los mismos tiempos.	66
Figura 17	Oxidación de los diferentes explantes de <i>B. scandens</i> a los 180 días de inducción hormonal <i>in vitro</i>	75
Figura 18	Respuesta morfogénica a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de hojas de plántulas tipo A (1-2 cm) de <i>B.scandens</i> en medio MS al 100% con la adición de 0.5 mg/l de ANA con 2 mg/L de BAP	77
Figura 19	Respuesta morfogénica a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de hojas de plántulas tipo A (a.1, a.2, a.3 y a.4) y tipo B (b.1, b.2, b.3 y b.4) de <i>B.scandens</i> en medio MS al 100% con reguladores de crecimiento	88
Figura 20	Respuesta morfogénica a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de tallo de plántulas tipo A (a: 1, 2, 3 y 4) y tipo B (b: 1, 2, 3 y 4) de <i>B. scandens</i> en medio MS con ANA/BAP mg/L (0.5/1)	94

Figura 21	Elongación de explantes de raíz. a) <i>B. whartonia</i> b) <i>B. scandens</i> a los 90 días después de 180 días de inducción hormonal, transferidos a medio fresco sin hormonas	105
Figura 22	Acclimatización de <i>Barkeria scandens</i> : a, b, c, d. y <i>Barkeria whartonia</i> A, B, C, D	107
Figura 23	Cultivo <i>in vitro</i> de secciones longitudinales de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> en medio MS adicionado con 0.5 mg/l ANA con 1 mg/l BAP, a los 60 días de iniciados los cultivos.	112
Figura 24	Secciones longitudinales de estructuras globulares, obtenidas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> en medio MS adicionado con 0.5 mg/l ANA con 1 mg/L BAP, a los 80 días de iniciados los cultivos	113
Figura 25	Secciones longitudinales de estructuras globulares, obtenidas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> cultivadas en medio MS en 0.5/ 1 ANA/ BAP mg/L a los 80 dds	114
Figura 26	Sección longitudinal de PLB, obtenida a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> cultivadas en medio MS en 0.5/ 1 ANA/ BAP mg/L a 90- 100 dds	114
Figura 27	Secciones longitudinales de PLB's, obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> cultivadas en medio MS en 0.5/ 1 ANA/ BAP mg/L a los 120 dds.	115
Figura 28	Secciones longitudinales de estructuras globulares obtenidas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de hoja de <i>Barkeria scandens</i> en medio MS con 0.5/2 ANA/BAP mg/L a los 60 dds.	115
Figura 29	Secciones longitudinales de estructuras globulares, obtenidas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de hoja de <i>Barkeria scandens</i> en medio MS con 0.5/2 ANA/BAP mg/L a los 60, 70, 80 y 90 dds.	117
Figura 30	Secciones longitudinales de estructuras PLB's, obtenidas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de hoja de <i>Barkeria scandens</i> en medio MS con 0.5/2 ANA/BAP mg/L a los 100 dds.	118
Figura 31	Secciones longitudinales de PLB's, obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de protocormos de <i>Barkeria scandens</i> cultivadas en medio MS en 0.5/ 2 ANA/ BAP mg/L a los 120 dds.	118

Tabla		Página
Tabla 1	Algunos ejemplos de especies propagadas por cultivo de tejidos vegetales y su producción.	11
Tabla 2	Algunas orquídeas endémicas de México incluidas dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).	23
Tabla 3	Algunas especies propagadas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.	37
Tabla 4	Ejemplos de orquídeas cultivadas <i>in vitro</i> .	47
Tabla 5	PLB's generados a partir de secciones longitudinales de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> a 60 dds.	67
Tabla 6	PLB's generados a partir de secciones longitudinales de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> a 90 dds.	68
Tabla 7	PLB's generados a partir de secciones longitudinales de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> a 120 dds.	68
Tabla 8	PLB's generados a partir de secciones longitudinales de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> . a 150 dds.	69
Tabla 9	PLB's generados a partir de secciones longitudinales de protocormos de <i>Barkeria whartonia</i> a 180 dds.	70
Tabla 10	PLB's generados a partir de secciones de hojas de plántulas tipo A y B a 60 dds.	79
Tabla 11	PLB's generados a partir de secciones de hojas de plántulas tipo A y B a 120 dds.	80
Tabla 12	PLB's generados a partir de secciones de hojas de plántulas tipo A y B a 180 dds.	81
Tabla 13	PLB's generados a partir de secciones de hojas de tipo A y B con diferentes concentraciones de ANA y BAP a 180 dds.	82
Tabla 14	Promedio de PLB's obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de hoja de <i>B. scandens</i> en medio MS 50% y MS, adicionado con diferentes concentraciones de ANA y BAP a 180 dds	85

Tabla 15	PLB's generados a partir de secciones de tallo de plántulas tipo A y B <i>in vitro</i> en medio MS 50 % y MS, a 60 dds.	92
Tabla 16	PLB's generados a partir de secciones de tallo de plántulas tipo A <i>in vitro</i> en medio MS 50 % y MS, a 120 dds.	95
Tabla 17	PLB's generados a partir de secciones de tallo de plántulas tipo A y B <i>in vitro</i> en medio MS 50 % y MS, a 180 dds.	96
Tabla 18	Promedio de PLB's obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de tallo tipo A y B de <i>B. scandens</i> con diferentes concentraciones de ANA y BAP a 180 dds.	97
Tabla 19	Efecto de las diferentes concentraciones de ANA/BAP mg/L en la formación de PLB's obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de tallo de <i>B. scandens</i> de dos diferentes Medios: MS 50% y MS.	99
Tabla 20	Secuencia cronológica de desarrollo de <i>B. whartonia</i> , hasta lograr la formación de plantas completas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones longitudinales de protocormos en medio MS 50% y MS.	110
Tabla 21	Secuencia cronológica de desarrollo de <i>B. scandens</i> , hasta lograr la formación de plantas completas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de diferentes tipos de explante (tallo y hoja) en medio MS (50%) y MS	111

Gráfica		Página
Gráfica 1	Formación de PLB's a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones longitudinales de protocormos de <i>B. whartonia</i> en medio MS 50% y MS, en combinación de ANA/BAP; a 180 dds (las barras verticales denotan el error estándar).	71
Gráfica 2	Oxidación de los diferentes tipos de explantes de <i>Barkeria scandens</i> a los 180 días de inducción con reguladores del crecimiento vegetal.	75
Gráfica 3	Formación de PLB's a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de hoja tipo A y B de <i>B. scandens</i> al interactuar con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento ANA/BAP mg/L.	83
Gráfica 4	Formación de PLB's a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de hoja de <i>B. scandens</i> en medio de cultivo MS 50% y MS interactuando con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento ANA/BAP mg/L.	86
Gráfica 5	Formación de PLB's a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de tallo tipo A y B de <i>B. scandens</i> al interactuar con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento ANA/BAP mg/L.	98
Gráfica 6	Formación de PLB's a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones de tallo <i>B. scandens</i> en medio de cultivo MS 50% y MS interactuando con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento ANA/BAP mg/L.	100

ABREVIATURAS

ANA	Ácido α -naftalenacético
BAP	N ⁶ -bencilaminopurina
ANOVA	Análisis de varianza
E. E.	Error estándar
CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
LGEEPA	Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente
NOM	Norma Oficial Mexicana
SINAP	Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
MS 50%	Medio MS reducido al 50% de la concentración de las sales inorgánicas
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
PLB's	Protocorm like bodies (Cuerpos parecidos a protocormos)
dds	Días después de la siembra

1. RESUMEN.

Se logró la regeneración de plantas completas de *Barkeria whartonia* y *B. scandens*, mediante el cultivo *in vitro* de secciones longitudinales de protocormos de la primera especie y secciones de hoja y tallo de la segunda especie, al lograr la inducción de embriogénesis somática. Para la germinación de las semillas de *B. whartonia* se empleó el medio de cultivo MS, obteniéndose 90% de germinación. Los explantes empleados para ambas especies, fueron cultivadas *in vitro*, en medio MS y MS 50%, adicionados de distintas concentraciones de ácido α -naftalenacético (ANA) (0, 0.5, 1) y N⁶-bencilaminopurina (BAP) (0, 1, 2, 2.5) mg/L, ácido ascórbico, ácido cítrico (50mg/L) y carbón activado (1g/L). Se formaron embriones somáticos cuya identidad se corroboró mediante análisis estructural (histológico).

Los embriones somáticos obtenidos a partir de los diferentes explantes utilizados para cada especie, se desarrollaron hasta dar lugar a la formación de plantas completas. Sin embargo y de manera general, se observó que la mayor formación de PLB's se registró al término de 180 dds, a partir de las secciones longitudinales de protocormos de *B. whartonia*, en donde se obtuvieron un promedio de 16.55 PLB's por explante, mientras que para los explantes de hoja de *B. scandens* se formaron en promedio 3.93 PLB's por explante y para tallo 6.33 PLB's por explante.

Al cultivar las secciones longitudinales de protocormos, la mejor respuesta morfogénica se obtuvo en el medio MS adicionado con 1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP, obteniéndose un promedio 48.45 ± 0.22 PLB'S por explante. Las plántulas obtenidas a partir de las diferentes secciones potencialmente regenerantes para ambas especies, fueron aclimatizadas exitosamente, obteniéndose un porcentaje de supervivencia del 80%.

El empleo del cultivo de tejidos vegetales, resultó una técnica eficiente, debido a que logró establecer un protocolo para la regeneración *in vitro* de *B. whartonia* y *B. scandens* especies endémicas y amenazadas de México, el cual proporciona una alternativa para reducir la presión que se ejerce sobre las poblaciones silvestres y que a su vez, pueda ser utilizado como modelo para la propagación masiva de otras especies de orquídeas.

2. INTRODUCCIÓN.

México es un país con una excepcional riqueza biológica, en parte debido a su ubicación geográfica, ya que se sobrepone y entrelaza con 2 regiones biogeográficas: la neártica y la neotropical (Hágsater *et al.*, 2005). A esta condición se suma una compleja historia geológica y una accidentada topografía, lo que explica la enorme variedad de condiciones ambientales que hacen posible la inmensa heterogeneidad en su diversidad biológica. En México es posible localizar 10% de las especies de plantas superiores del Planeta, y más del 40% de ellas son exclusivas del territorio nacional, es decir son especies endémicas (CONABIO, 2000). Las familias de plantas mejor representadas en México son las Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Orchidaceae, esta última con aproximadamente 1260 especies y 170 géneros (Villaseñor, 2003; Hágsater *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007) y se estima que el número final de especies estará entre 1 300 y 1 400, lo que le confiere el cuarto lugar en cuanto a riqueza de especies vegetales (Hágsater *et al.*, 2005).

Una característica sobresaliente de las orquídeas mexicanas es la alta proporción de endemismos, ya que se han registrado más de 500 especies o subespecies endémicas que corresponden a más del 40% del total de taxa registrados en el país (Soto-Arenas, 1996; Villaseñor, 2003). De éstas, 188 especies se encuentran en alguna categoría de riesgo, de acuerdo con la norma oficial vigente NOM-059-SEMARNAT-2010. Sin embargo, a nivel global, la familia completa está incluida en el Apéndice II de CITES, el cual incluye las especies que no necesariamente están amenazadas con la extinción, pero en las que el comercio debe ser controlado para evitar un uso incompatible con su supervivencia. La disminución de poblaciones de muchas especies es muy significativa lo que conlleva a una pérdida muy importante de su variabilidad genética y, con ella, la disminución de su capacidad de supervivencia. Las Orchidaceae son una de las familias más vulnerables por la destrucción y transformación de sus hábitats, crecimiento urbano desordenado, extracción masiva de plantas de poblaciones silvestres (tráfico ilegal de especies), dado su alto valor hortícola y comercial, y por las características ecológicas que presentan las especies, como sus bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y el escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales (Sarmiento y Romero, 2000).

Lo anterior, demuestra que es urgente e indispensable implementar estrategias para la conservación *in situ* y *ex situ* de esta familia. Una alternativa potencial no sólo para

mantener sino incrementar el número de individuos de ésta y otras familias de plantas son las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, que han demostrado ser de gran valor en la conservación y aprovechamiento sostenible (Tablas 1 y 3). Por estos métodos es posible obtener cientos o miles de plantas al año (Yeung, 1999). El cultivo de tejidos vegetales (CTV) ha mostrado ser de gran utilidad para el estudio, conservación y propagación rápida y masiva de diversas especies de plantas (orquídeas, cactáceas, cícadas, coníferas, agaves, entre otras), como una alternativa de manejo y aprovechamiento (Chávez *et al.*, 1992; Rubluo *et al.*, 1993; Fay, 1994; Chávez y Rubluo, 1995; Mata *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2003; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos ejemplos de especies propagadas por cultivo de tejidos vegetales, y su producción.

ESPECIE	USOS	PRODUCCIÓN	REFERENCIA
<i>Vanilla planifolia</i>	Alimenticia	500 000 plantas/año	Avtbiotech, 2010 (India)
<i>Saccharum officinarum</i>	Alimenticia	800 000 plantas/año	Vitromotz, 2010 (México)
<i>Phalaenopsis</i> spp.	Ornamental	31 4000 plantas/año 2 millones plantas/año	Winkelman, 2006 (Alemania) Avtbiotech, 2010 (India)
<i>Allium cepa</i>	Alimenticia	600 000 plantas/año	Avtbiotech, 2010 (India)
<i>Gerbera</i> spp.	Ornamental	2 millones plantas/año	Avtbiotech, 2010 (India)
<i>Solanum tuberosum</i>	Alimenticia	10 millones minitubérculos/año	Invernamex, 2010 (México)
<i>Agave salmiana</i>	Alimenticia, Bebida	25 000 plantas en 2 años	De la Peña Sobarzo <i>et al.</i> , 2008 (UNAM, México)

Fuente: González *et al.*, 2012.

Tal es el caso de *Ginkgo biloba*, árbol en peligro de extinción en la naturaleza que se logró propagar *in vitro* (Tommasi and Scaramuzzi, 2004). Así mismo, Chávez *et al.* (1998), lograron la obtención de embriones somáticos de la cícada *Ceratozamia euryphyllidia*,

utilizando hojas inmaduras por medio de esta biotecnología. También se han logrado propagar especies como *Ariocarpus kotschoubeyanus*, cactácea endémica de México (Moebius- Goldammer *et al.*, 2003), orquídeas como *Laelia speciosa*, regeneradas a partir de hojas inmaduras (Barrera, 2006), *Oncidium tigrinum* a partir de protocormos (Mata *et al.*, 2011). También se logró el cultivo *in vitro* de *Laelia gouldiana*, orquídea extinta en la naturaleza (Gómez, 2009).

B. whartonia y *B. scandens*, son orquídeas endémicas de México, que por la belleza, variedad de formas y colores de sus flores han sido muy apreciadas como ornamentales, motivo por el cual sus poblaciones silvestres han sido saqueadas para su comercio ilegal, además de que son afectadas por las actividades humanas tales como la destrucción de su hábitat (Soto y Solano, 2007), razones por las que han sido catalogadas como especies sujetas a protección especial en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010)

La presente investigación, tuvo como objetivo generar protocolos para la propagación de: *B. whartonia* y *B. scandens*, mediante el cultivo *in vitro* de explantes de protocormos de la primera especie y secciones foliares, tallo y raíces de plántulas de la segunda especie, así como corroborar la vía morfogénica mediante el análisis estructural, y proporcionar una alternativa para la regeneración y propagación masiva de plantas, con el potencial de abastecer la demanda ornamental y reducir su colecta en la naturaleza.

2.1 MARCO TEÓRICO.

Biodiversidad.

Se entiende por Biodiversidad o Diversidad Biológica, el grado de variación entre los organismos vivos y los complejos ecológicos en los que ocurren. El concepto de diversidad hace referencia al número de diferentes categorías que estos complejos expresan a múltiples niveles; desde la heterogeneidad de las estructuras químicas que son la base molecular de la herencia, hasta la variación en los ecosistemas. Por lo tanto, la biodiversidad contempla toda la riqueza o variedad de formas vivientes que existen en la biosfera, incluidas las plantas, animales, y microorganismos sostenidos como entes vivientes por una constelación

de información genética aún mayor, y distribuidos en forma compleja en los biomas o ecosistemas que caracterizan al Planeta (Dirzo, 1999).

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 y se calcula que 50 al 80% de la diversidad biológica del Planeta está concentrada en 6 a 12 países, entre este selecto grupo de países se encuentra México (Toledo y Ordóñez, 1998; CONABIO, 1998).

México ocupa una superficie de casi 2 millones de km². Esta superficie tiene una historia geológica compleja (Ferrusquía-Villafranca, 1998), la cual es responsable de su abrupta topografía; diversidad de altitudes y orografía, un amplio mosaico de climas y de tipos de vegetación que incluye prácticamente todos los registrados a nivel mundial (Rzedowski, 1978). Se estima que más del 12% de la biota del Planeta está contenida en su territorio (Toledo, 1994; Mittermeier *et al.*, 1997). Esta biota se distribuye en los seis principales hábitats terrestres del país: tropical húmedo, tropical subhúmedo, templado húmedo, templado subhúmedo, árido a semiárido y alpino (Toledo y Ordóñez, 1998). México es ubicado por diversos autores entre los cinco países con mayor riqueza biológica, considerándose un país megadiverso (Mittermeier, 1988; Akeroyd y Synge, 1992; Mittermeier y Goettsch, 1992; Neyra y Durand, 1998).

De acuerdo con Mittermeier y Goettsch (1992), el concepto de país megadiverso sólo se aplica a un número muy pequeño de países: aquéllos que contienen un porcentaje extraordinario de la biodiversidad del Planeta. México se encuentra en una categoría especial junto con Brasil, Colombia e Indonesia, países que generalmente ocupan los primeros lugares en todas las listas de diversidad biológica que se han elaborado para los diferentes taxa. México ocupa el segundo lugar en especies de reptiles y está entre los cinco primeros lugares en anfibios, mamíferos y plantas con flores (Espinosa *et al.*, 2008).

En cuanto al número de plantas fanerógamas, según Toledo Rzedowski (1993), el territorio mexicano cuenta con el 12.78% de las plantas descritas que existen actualmente en el mundo. En la República Mexicana, existen 220 familias que abarcan 2 410 géneros y cerca de 26,000 especies, con un nivel de endemismo superior al 40%. Destacan por sus niveles de endemismo la familia de las cactáceas (con 850 especies, 84% de ellas endémicas); el

género *Pinus* (con 48 especies, 43% endémicas) y las orquídeas (1 200 especies, 44% endémicas) (Hágsater *et al.*, 2005).

Las especies endémicas requieren de especial atención debido a sus distribuciones tan restringidas, ya que, en consecuencia, pueden estar en riesgo de extinción, más aun si las condiciones de su hábitat no son las adecuadas, irán disminuyendo y desaparecerán. Para ayudar a prevenir la pérdida de la biodiversidad.

Desafortunadamente, existe un gran número de factores que amenazan la biodiversidad del país. Según Toledo (1988), en los años setenta solamente el 40.8% del territorio mexicano mantenía su vegetación natural sin disturbios, lo cual indica que la enorme riqueza de la flora y fauna mexicana se halla severamente amenazada.

Actualmente, la diversidad biológica en México y a nivel mundial enfrenta una crisis de proporciones desastrosas, los ecosistemas naturales están siendo fragmentados entre otros factores por la pérdida y degradación de hábitats (cambio de uso del suelo, deforestación de la cobertura vegetal, desecación de cuerpos de agua), la sobreexplotación de especies y de los recursos que los ecosistemas generan, la introducción de especies invasoras, la contaminación de los ecosistemas, el cambio climático, el incremento en el número y densidad de la población humana y de infraestructura (construcción de carreteras, redes eléctricas y represas), así como factores económicos que estimulan un consumo superfluo, culturales, de gobernabilidad y adopción tecnológica del desarrollo agrícola, la producción industrial y urbanización (CONABIO, 2012).

La velocidad a la que se documenta la diversidad biológica, es inferior a la velocidad de pérdida de poblaciones animales y vegetales y a la velocidad de extinción de las especies (Velázquez y Romero, 1999). Actualmente se sabe también que la mala administración, y la deficiente planeación sobre el uso sostenible de los recursos naturales, así como la falta de estudios de impacto ambiental han contribuido en forma considerable a estos procesos de destrucción (Forero, 1994).

La pérdida de biodiversidad tiene graves consecuencias para la humanidad, representa inevitablemente la reducción en la población de especies, con la consecuente pérdida de diversidad genética y el incremento de la vulnerabilidad de las especies y poblaciones a enfermedades. La extinción de especies es una de las consecuencias más importantes de la pérdida de la biodiversidad. La tasa de extinción actual es muy superior a la tasa evolutiva,

y el tiempo requerido para la recuperación de la biodiversidad sobrepasa por mucho la escala de tiempo histórico de la especie humana (Raup, 1979; Wilson, 1985; citados por García *et al.*, 2004), aun cuando la extinción es un proceso natural, la extinción masiva que hoy ocurre se debe a procesos antropogénicos, durante los últimos años la tasa de extinción registrada en el mundo es más de mil veces mayor que las estimadas a partir del registro fósil (Wilson, 1988; Gentry, 1986). La disminución de los tamaños poblacionales producto de la reducción de sus áreas de distribución o de su fragmentación puede comprometer su permanencia en los ecosistemas o, simplemente, provocar su extinción en el corto o mediano plazo (Ehrlich y Ehrlich, 1992). Lo anterior ha sido llamado extinción silenciosa. De acuerdo con la “lista roja” que publicó la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) en 2004, existían a nivel mundial 15 mil 589 especies en condición de riesgo. De ellas, 5 mil 188 correspondían a vertebrados, mil 192 a invertebrados y 8 mil 321 a plantas (incluyendo musgos, helechos, hepáticas, gimnospermas y angiospermas). La mayor parte de las especies amenazadas, según el mismo reporte, ocurre en los trópicos (en los bosques tropicales y subtropicales de Centro y Sudamérica y sur de África y sureste de Asia), especialmente en zonas montañosas e islas.

En el caso particular de México, de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010, el grupo taxonómico con un mayor número de especies en condiciones de riesgo es el de las plantas (tanto angiospermas como gimnospermas), con 939 especies. Dentro de ellas, las familias con mayores números de especies en riesgo son las de las cactáceas (285 especies), orquídeas (189 especies), palmas (64 especies) y agaves (39 especies) siendo la familia Orchidaceae el segundo grupo de plantas que se encuentra más amenazado, superado únicamente por la familia Cactaceae (SEMARNAT, 2010).

Características generales de la familia Orchidaceae.

Las orquídeas son plantas herbáceas perennes, de hábito epífita, terrestre, litófilo, semiacuático, saprófito y raramente subterráneo (restringidas a Australia). Presentan una estructura básica a la de muchas otras monocotiledóneas. Están constituidas por vástagos organizados en uno de los hábitos de crecimiento; en el primero de ellos el desarrollo se da mediante la extensión vegetativa a partir de un meristemo apical que da lugar a un solo eje principal (monopodial). Entre las orquídeas mexicanas este tipo de crecimiento se presenta principalmente en las vainillas, en los géneros *Campylocentrum*, *Dendrophylax* y *Dichaea* y en algunas especies de *Epidendrum*. En el segundo el eje está formado por una serie de vástagos generados de manera consecutiva a partir de meristemos o yemas de renuevo situadas basal, lateral o apicalmente en el vástago anterior, el conjunto de vástagos forma un eje compuesto (simpodial) Fig.1. En los géneros *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium*, *Cymbidium* se aprecia este tipo de crecimiento (Bell y Bryan, 1991).

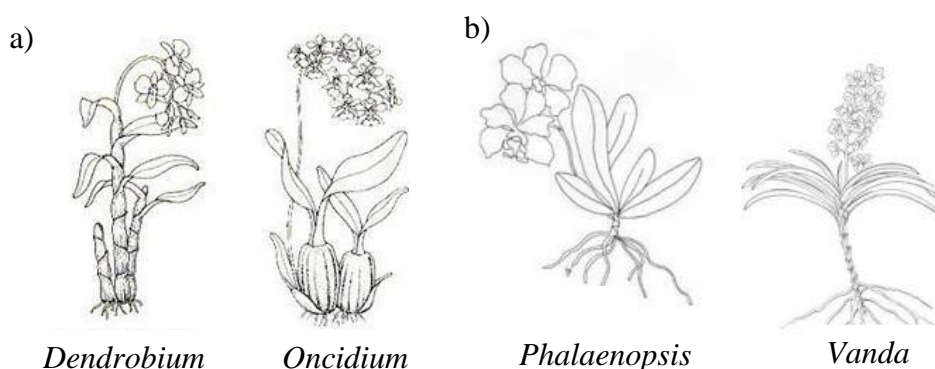


Figura 1. Tipo de crecimiento en orquídeas: a) Simpodial, b) Monopodial.

Los tallos de las orquídeas son comparables a una caña o carrizo. Pueden ser caulescentes o acaules. Las orquídeas con tallo caulescentes 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* (Hágsater *et al.*, 2005). 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. Las orquídeas acaules tienen 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 útiles como 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 vástagos (Hágsater *et al.*, 2005).

Las raíces de las orquídeas son órganos que presentan diferentes adaptaciones. Tienen las funciones de absorber agua, nutrientes y fijar la planta al suelo o a materia orgánica acumulada en troncos. Son simples o ramificadas, carnosas y con un diámetro aproximado de entre 1 y 10 mm dependiendo de la especie. Por lo general son circulares con corte transversal (Hágsater *et al.*, 2005). La porción más externa de la raíz es la epidermis, que suele formar un tejido esponjoso constituido por células que al madurar mueren y pierden el citoplasma, quedando sólo sus paredes parcialmente engrosadas, está cubierta de células muertas llamada velamen puede tener entre una y ocho células de grosor y es lo que le confiere el aspecto blanquecino característico a muchas raíces de orquídeas epífitas como *Barkeria scandens* y *Laelia autumnalis* (Hágsater *et al.*, 2005).

Las hojas 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, forma ovalada y de color generalmente verde (De la Cruz, 2006). Estos órganos pueden ser filiformes y hasta orbiculares, membranosas o coriáceas e incluso pueden almacenar agua (Dressler, 1981). 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 presentan 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 (Hágsater *et al.*, 2005).

La flor está constituida por los sépalos (3) generalmente coloreados, al igual que los pétalos y pueden estar libres o más o menos unidos formando un tubo. El sépalo dorsal difiere generalmente en la forma de los laterales, los cuáles son más o menos oblicuos y pueden

estar libres uno del otro o adheridos frecuentemente por la base, Fig. 2. De los tres pétalos, dos son semejantes morfológicamente y el tercero llamado labelo está modificado, su posición inferior corresponde al giro del pedicelo o de éste y el ovario (resupinación) (Hágsater *et al.*, 2005). El labelo generalmente difiere en forma, tamaño y coloración de los otros pétalos, la superficie interna generalmente está adornada con papilas o lamelas y la base puede ser pequeña o muy amplia formando un nectario. Las flores de las orquídeas por lo general son hermafroditas y portan tanto órganos sexuales masculinos (estambres y sus anteras) como femeninos (ovario, estilo y estigma), para constituir una estructura única llamada columna o ginostemio. En muchas especies un lóbulo estigmático llamado rostelo, se proyecta sobre la superficie estigmática que permite adherir los polinios a los insectos. La antera puede estar dividida y contener 2,4, 6 y 8 polinios y se ubica en una cavidad llamada clinandrio. Tienen ovario ínfero con 1-3 divisiones que puede ser inconspicuo o notorio (Hágsater *et al.*, 2005).

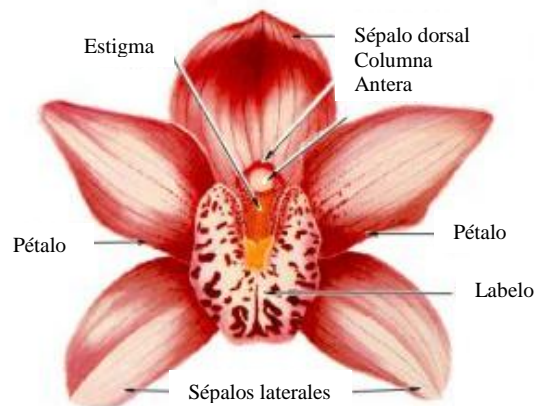


Figura 2. Morfología básica de la flor en orquídeas: Género *Cymbidium*.

Entre las características más notables de las orquídeas está el tamaño y estructura de las semillas. Tienen un peso promedio de 3 a 14 μg y miden de 0.4 a 1.25 mm de longitud y de 0.08 a 0.27 mm de ancho, la semilla contiene un pequeño embrión esférico o piriforme dentro de una testa membranosa, frecuentemente transparente o bien pigmentada. La mayoría de las especies tienen embriones relativamente indiferenciados, sin cotiledones, ni endospermo, lo cual se considera una característica de grupos avanzados evolutivamente. El número de semillas producido por fruto varía con el género y la especie, fluctúan de 1

300 a 4 000 000 (Chávez, 1980; Arditti, 1992), Chávez (1980) reportó para frutos de *Bletia urbana* entre 92 625 y 117 200 semillas. Hay algunas semillas 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 cotiledón 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 tienen complejas formas de vida y reproducción, dependen en la naturaleza de simbiosis con hongos, como los del género *Rhizoctonia* o *Tulasnella*, para así poder germinar de manera natural y lograr el desarrollo de las poblaciones de plántulas, ya que al carecer la mayoría de las semillas de reservas nutritiva 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 para lograr una germinación simbiótica (Rangel, 1995). En esta relación las semillas son micoheterótrofas obligadas, los hongos micorrízicos le proveen de nutrientes, tales como carbohidratos y minerales, mientras que los hongos obtienen por parte de la planta vitaminas y fitohormonas (Arditti, 1992; Hágsater *et al.*, 2005).

Una vez que la semilla madura y sale del fruto, sí llega a un ambiente con las condiciones fisicoquímicas y humedad adecuadas, en el que además se encuentre el hongo apropiado, la germinación se inicia y el embrión absorbe agua a través de la cubierta seminal, como consecuencia aumenta de tamaño debido al incremento en el volumen de las células. Después se inicia la división celular en la región anterior, lo que provoca la ruptura de la cubierta seminal, dando lugar a una estructura cónica esférica llamada protocormo. Éste continúa su desarrollo, hasta que se hace evidente el primer primordio foliar como una pequeña protuberancia. Sobre la superficie inferior del protocormo, rodeando su periferia, aparecen pelos absorbentes o rizoides, posteriormente emergerá la raíz verdadera a partir de esa zona, generalmente después de la formación de algunas hojas dando como resultado el desarrollo paulatino de una plántula (Arditti, 1967; Dressler, 1981; Luna, *et al.*, 2004).

Entre las plantas con flores, la familia Orchidaceae es una de las más grandes y la más evolucionada, cuenta con 800 géneros y 30,000 especies a nivel mundial y están

distribuidas por todo el mundo, a excepción de las zonas desérticas extremas. (Chase *et al.*, 2003). Presenta una distribución cosmopolita, crecen en casi todas las latitudes y altitudes, desde el norte de Suecia y Alaska hasta América y la isla Macquarie (Asia), aunque por lo general presentan mayor diversidad en los ambientes tropicales y subtropicales (Cribb *et al.*, 2003).

En México la mayor concentración de orquídeas, se encuentra en las regiones situadas al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y las del Golfo hasta las regiones que rebasan los 3 500 msnm, distribuidas principalmente en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, regiones al sur de Puebla, San Luis Potosí y por supuesto, también se les encuentra en Michoacán, gracias a la gran diversidad de climas y tipos de vegetación existentes en dichos estados (Martínez, 1991).

Históricamente, las orquídeas han sufrido el deterioro de sus poblaciones naturales por la deforestación, la fragmentación y sobre todo la extracción masiva de plantas (Sosa y Platas, 1998; Koopowitz, 2001; Koopowitz *et al.*, 2003), la extracción es motivada por su alto valor hortícola y comercial, ya que poseen flores muy atractivas y de gran variedad, lo que en general promueve su colecta ilegal. Por ejemplo, un estudio realizado por Flores y Valencia (2007), en los mercados de flores del estado de Veracruz, se encontró que el precio de las plantas silvestres que se ofrecían variaba de acuerdo al tamaño de la planta, el número de tallos, varas florales etc., sin embargo los precios variaban: \$23 ± 41 por planta; además, ciertas especies podían venderse en pequeños grupos (e.g., todas las orquídeas del género *Lepanthes*, *Pleurothallis*, y *Trichosalpinx*), mientras que otras especies como *Laelia anceps* Lindl., eran altamente valuadas (\$500), dadas las características fenotípicas que esta especie mostraba (Flores y Valencia, 2007).

En México, la colecta y venta de orquídeas silvestres está regulada por las leyes. Sin embargo, la extracción para venta local e internacional es uno de los mayores problemas para la conservación de este grupo. Se estima que el tráfico ilegal de orquídeas en México entre 1993 y 1996 fue de 9 a 12 millones de plantas, mientras que legalmente sólo se comercializaron 152 000 de ellas (Flores y Brewster, 2002). Además de la extracción de individuos completos, el corte de flores puede tener consecuencias críticas en la producción

de semillas de las poblaciones silvestres, incluso en algunos sitios las poblaciones están en declive por el bajo o escaso reclutamiento de nuevos individuos (Hernández, 1992), tal es el caso de *Rossioglossum grande* orquídea que proviene de la sierra madre de Chiapas, donde crece en pocos bosques de neblina, pues fue muy recolectada, y su hábitat original ha sido fuertemente impactado por las actividades agropecuarias, por lo que ahora está prácticamente extinta en su estado silvestre en el territorio mexicano (com. pers. Dr. Eduardo A. Pérez García, 2010). Un ejemplo típico de la extracción de orquídeas es el de *Laelia speciosa*, la cual produce flores grandes, de 10 a 16 cm de diámetro, y se considera una de las especies más hermosas del género y la orquídea silvestre más ampliamente recolectada en México por su valor ornamental y cultural (Halbinger, 1993; Soto, 1996). Se estima que sólo en el estado de Michoacán anualmente se extraen alrededor de 6 000 plantas o segmentos de plantas (lo cual en general también tiene consecuencias letales para la planta) (Ávila Díaz y Oyama, 2002). Se considera que el número de flores con uno o dos pseudobulbos vendidas en la ciudad de México es del orden de miles a cientos de miles cada temporada, ya que, en la época de máxima floración, se estima que se venden alrededor de 1 500 flores diariamente (Ávila Díaz y Oyama, 2002).

Esta censurable actitud lucrativa e ilegal aún es común y lamentablemente continuará en tanto aficionados coleccionistas y gente sin una conciencia ecológica, traten de adquirir plantas extraídas directamente de la naturaleza por cualquier medio y a cualquier precio, adquiriéndolas muchas veces con los habitantes de las zonas en donde crecen estas plantas, provocando así la alteración del ambiente y la extinción de las mismas.

Por lo tanto la conservación de más de 1 260 especies de orquídeas que tienen una distribución extremadamente heterogénea (60% se concentra en el bosque de neblina, que ocupa solo 1% del territorio) en un país en desarrollo con más de 100 millones de habitantes es complicado y todo un reto. Más del 10% de la riqueza de orquídeas con que cuenta México está en peligro de extinguirse. Tan sólo en los dos últimos siglos se tiene registrada la extinción de dos especies de orquídeas en el país y a partir de 1998 se han extinguido al menos 22 más. Ejemplo de esto es *Laelia gouldiana*, especie endémica mexicana, la cual está extinta en la naturaleza (Sarmiento y Romero, 2002). Es previsible que esta tendencia siga en aumento como un reflejo de serios problemas de educación, sociales, económicos que afectan la condición ambiental que enfrenta el país.

A nivel mundial, existe una legislación para asegurar la conservación y regular el comercio internacional de especies silvestres susceptibles a la extinción: la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES); sin embargo, el CITES no prohíbe completamente el comercio de la fauna y flora silvestres, sino que lo regula con el objetivo de evitar que lleguen a extinguirse estas especies como resultado de su explotación no sustentable (IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 1996).

Hágsater *et al.* (2005) realizaron un análisis de las bases para la conservación y generaron lineamientos para una estrategia de Conservación *in situ* de las orquídeas de México. No obstante la clara validez de sus argumentos, se debe insistir sobre el sector gubernamental, empresarial y directamente a los pobladores de las comunidades para señalarles la recomendación a seguir para la conservación de sus recursos locales y de grandes áreas naturales.

En México se han decretado 174 Áreas Naturales Protegidas (ANP), las cuales suman 25 millones de hectáreas, los planes de manejo para las ANP para hacerlas sustentables distan de ser aplicadas y lamentablemente no es raro ver que son reforestadas con especies exóticas (CONANP, 2010). Existe una ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección Ambiental (LGEEPA), una Ley General de Vida Silvestre, y una Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) que categoriza diversos organismos, entre ellos, las orquídeas, que dependiendo de su rareza y grado de amenaza las clasifica en: peligro de extinción, raras, amenazadas y sujetas a protección especial (la NOM-059-SEMARNAT-2010). Actualmente 189 especies de orquídeas están incluidas dentro de esta norma, bajo alguna categoría de riesgo. En esta ley se considera que una especie está extinta en la naturaleza, 14 especies están catalogadas en peligro de extinción, 64 Amenazadas y 110 sujetas a protección especial (entre ellas *Barkeria whartonia* y *B. scandens*) (SEMARNAT, 2010), ejemplos de estas orquídeas son las que se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunas orquídeas endémicas de México incluidas dentro de la NOM- 059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

Especie	Categoría de riesgo
<i>Barkeria scandens</i>	Protección especial.
<i>Barkeria whartoniana</i>	Protección especial.
<i>Encyclia atrorubens</i>	Protección especial.
<i>Encyclia lorata</i>	Protección especial.
<i>Encyclia pollardiana</i>	Protección especial.
<i>Kraenzlinella hintonii</i>	Protección especial.
<i>Cuitlauzina pendula</i>	Amenazada
<i>Encyclia adenocaula</i>	Amenazada
<i>Euchile mariae</i>	Amenazada
<i>Mormodes porphyrophlebia</i>	Amenazada
<i>Oncidium incurvum</i>	Amenazada
<i>Rhynchostele cervantesii</i>	Amenazada
<i>Rossioglossum splendens</i>	Amenazada
<i>Trichocentrum stramineum</i>	Amenazada
<i>Encyclia kienastii</i>	Peligro de extinción.
<i>Laelia anceps dawsonii</i>	Peligro de extinción.
<i>Mexipedium xerophyticum</i>	Peligro de extinción.
<i>Mormodes uncia</i>	Peligro de extinción.
<i>Laelia gouldiana</i>	<i>Extinta</i>

No obstante que en los últimos años en México ha habido un avance en la legislación y normatividad en cuestiones ambientales, en la consolidación de un sistema de áreas naturales protegidas, en el apoyo a las instituciones encargadas de la documentación de la biodiversidad y en el impulso a los programas de manejo sustentable de los recursos naturales, persisten muchos problemas (vacíos legales, como la normatividad en el uso de las especies que no están en las categorías de riesgo, la regulación de los viveros, las colecciones y el manejo de especies exóticas) que dificultan su consolidación, supervivencia, vigilancia, y en algunos casos es excesiva la regulación o hay vacíos legales (Hágsater *et al.*, 2005)

Género *Barkeria* (Knowles y Wetc., 1838)

Género relativamente pequeño con aproximadamente 15 especies, esencialmente mexicano, aunque un par de especies se encuentran en Centroamérica. Presenta flores atractivas por lo que ha sido buscado por los cultivadores de orquídeas. Hierbas epífitas o litófitas; tallos angostos, cubiertos por vainas; hojas deciduas, distribuidas a lo largo o en la mitad apical de los pseudobulbos, lanceoladas a ovadas; inflorescencia apical, racimosa, multiflora; ovario pedicelado; flores vistosas, rosadas a violeta-púrpura, o blancas; sépalos y pétalos similares, subiguales, los pétalos más anchos; labelo libre o unido a la columna en su porción basal, entero; disco ornamentado; columna paralela o divergente al labelo, con alas membranosas o carnosas, extendidas a cada lado del estigma; antera terminal, bilocular-polinios 4, cerosos, subiguales; cápsula elipsoide a cilíndrica (Halbinger, 1972; Thien, 1970).

***Barkeria whartonia* (C.Schweinf.) Soto Arenas (Soto y Solano, 2007)**

B. whartonia (Fig. 3) es una orquídea microendémica de México, que habita en el estado de Oaxaca. Según los datos obtenidos de la NOM-059-SEMARNAT-2010, actualmente es una especie escasa, sujeta a protección especial y por consiguiente vulnerable a desaparecer en la naturaleza, es una orquídea apreciada, por la peculiar belleza y rareza de sus flores (Angulo, 2008).



Figura 3. Inflorescencia de *Barkeria whartonia*. Fotografía tomada por: Eduardo A. Pérez García.

Clasificación Taxonómica (Soto y Solano, 2007).

REINO: Plantae
DIVISIÓN: Magnoliophyta
CLASE: Liliopsidae
SUBCLASE: Liliidae
ORDEN: Orchidales
FAMILIA: Orchidaceae
SUBFAMILIA: Epidendroideae
GÉNERO: *Barkeria*
ESPECIE: *B. whartonia* (C.Schweinf.) Soto Arenas.

Basónimo / Nombre original:

Epidendrum whartonianum C. Schweinf., 1948

Descripción botánica.

Hierba rupícola o epífita, escandente hasta de 70 cm de alto. Raíces carnosas, teretes. Tallos engrosados, ligeramente comprimidos, con 3-11 entrenudos, 7-24 cm de largo; cubiertos con vainas escariosas, blanco-grisáceas, apesadas. Hojas 4-7, deciduas, coriáceo-subcarnosas, verde claro, de 4.5-12.5 x 1.8-2.8 cm. Inflorescencia apical, un racimo o una panícula, con 1-5 ramas, cada rama con 2-15 flores, sublaxa, con un pedúnculo muy alargado, de 1.3-2 mm de grosor, 13-30 cm de largo, cubierto por vainas tubulares, delgadas, escariosas. Flores atractivas, sin aroma, color rosado-lila, desde muy pálido hasta intenso, labelo más claro con el ápice oscuro y quillas amarillo claro, brillante, con puntorrayas basales, muy pequeños, púrpura oscuro; el tercio apical con rayas púrpura, paralelas a, o sobre las quillas; columna con la superficie dorsal crema-verde, profusamente manchada de púrpura, superficie ventral verde. Ovario pedicelado, casi recto, verde-cobrizo. Brácteas florales angostamente triangulares, acuminadas, escarioso-papiráceas. Labelo fusionado basalmente a la columna cerca de 2 mm, formando un nectario seco que penetra unos 4 mm en el ápice del ovario; entero, ampliamente triangulocordiforme, base truncada a cordada, ápice subagudo a obtuso, margen ligeramente repando y plegado, los márgenes basales alzados y abrazando la base de la columna, los márgenes laterales reflexos, rectos o ligeramente arqueados, de 12-15 x 9.5-15 mm; callo formado por 2 quillas oblongas, carnosas, blanco-crema que limitan una depresión elíptica y terminan en 3 quillas paralelas, la media llegando hasta el ápice, más altas distalmente, 9.7-11 mm de largo, Fig. 4. Columna recta o ligeramente incurvada, subtrígona, dorsiventralmente

comprimida, espatulado-flabeliforme, muy ancha por 2 alas semielípticas; 5-6 x 1.8-2.2 mm. Polinario con 4 polinios en 2 pares; unidos a caudículas. Cápsula elipsoide, de 33 x 11 mm (Withner, 1998; Wood, 1988: citados por Soto y Solano, 2007).

En el campo el Dr. Eduardo A. Pérez García (com. pers.) ha observado que las semillas generalmente germinan sobre árboles, con segmentos desprendidos pueden continuar su crecimiento sobre las piedras (Soto y Solano, 2007). Aunque no siempre existente, ésta es una forma de expansión clonal importante en esta especie. Es probable que todas las especies de *Barkeria* pasen por un periodo casi "áfilo" en las primeras etapas de su vida. Al igual que muchas otras orquídeas epífitas, esta especie tiene un periodo de crecimiento activo durante la temporada lluviosa de mayo a octubre. La floración en campo se presenta de noviembre a enero. Las plantas empiezan a perder sus hojas en octubre-noviembre y llegan a estar completamente deciduas en la primavera. La inflorescencia emerge del último tallo, ya desarrollado, Figura 3. Las cápsulas tardan en madurar 4-5 meses y las semillas se dispersan durante la temporada seca, en marzo y abril (Soto y Solano, 2007).

Distribución geográfica e importancia ecológica.

B. whartonia, se distribuye únicamente en la región de Nizanda-Mazahua, y en el cerro Timbón, cerca de la Chivela, ambas localidades en el Municipio de Asunción Ixtaltepec, Oaxaca, es una especie de hábito rupícola o epífita. Tiene una distribución notablemente agregada, es decir, su crecimiento siempre es grupal, se conoce exclusivamente de la selva baja caducifolia, donde está limitada a un microhábitat específico. Se ha localizado en altitudes de 200 a 400 m.s.n.m (Pérez- García, 2001). Sobre su biología floral no se tienen observaciones sobre la polinización. *B. lindleyana*, de Costa Rica, que está cercanamente relacionada a esta especie, es polinizada por abejas carpinteras (*Xylocopa tabaniformis*) (Van der Pijl y Dodson, 1966). Estos autores reportan una eficiencia de polinización cercana a 20%, y visitas múltiples por el mismo individuo de abeja, lo que sugiere que debe existir una recompensa de néctar. En esta especie el nectario es aparentemente seco. El Dr. Eduardo A. Pérez García (com. pers.) indica que la producción de cápsulas es relativamente frecuente, sobre todo en cultivo, con la mayor parte de las inflorescencias con alguna cápsula (Soto y Solano, 2007).

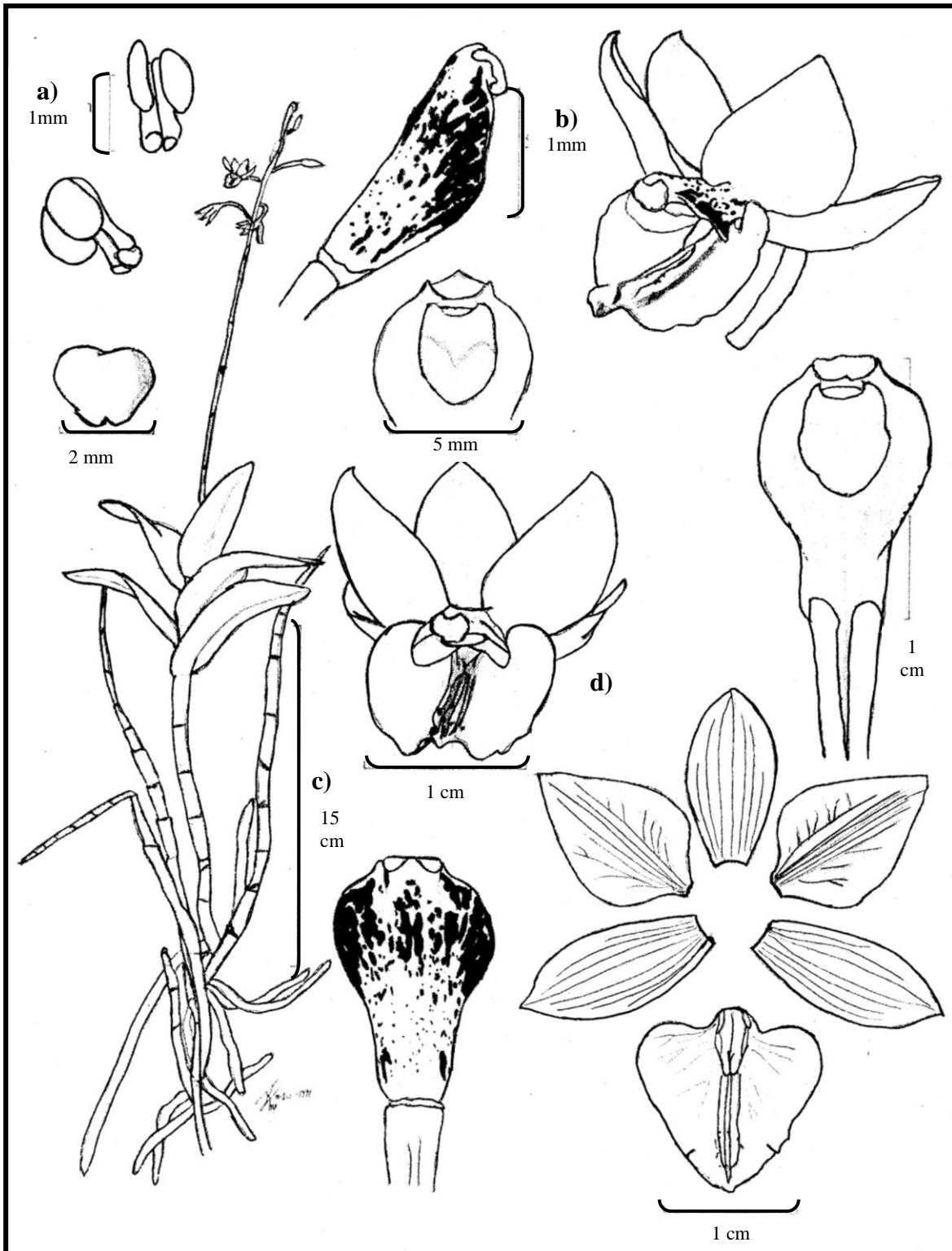


Figura 4. Lámina de *Barkeria whartonianana* (C. Schweinf.) tomada de Soto y Solano, 2007: a) Antera y rostelo con sus polinias, b) columna, c) planta completa con órganos vegetativos y reproductivos, d) flor y e) sépalos, pétalos y labio ó labelo

Es muy probable que en condiciones naturales las plántulas pasen por una etapa de mayor crecimiento radicular. En otras especies de *Barkeria* se han observado plántulas cuya biomasa está formada casi enteramente por raíces y aunque tienen tallos incipientes, éstos son inicialmente muy pequeños y la mayor parte del tiempo carecen de hojas. Las raíces carnosas almacenan agua y son fotosintéticas (Soto y Solano, 2007).

Situación actual de la especie.

Existen dos factores de riesgo para la conservación a mediano plazo de esta especie. Uno de ellos es la destrucción de su hábitat por parte de la industria cementera que explota los afloramientos de caliza puros donde se localiza esta especie. Explotaciones de este tipo han destruido colonias de *B. whartonia* en La Pedrera (Pérez-García, 2001).

La otra amenaza para su hábitat sería el proyecto para construcción del corredor transístmico. El hábitat se localiza en la parte más baja del Istmo de Tehuantepec y este sería el sitio preferente para la construcción del corredor (Pérez-García, 2001) (Fig. 5).



Figura 5. *Barkeria whartonia* (Orchidaceae) *in situ* en floración, creciendo sobre el cactus columnar: *Neobuxbaumia scoparia* (Cactaceae), en el estado de Oaxaca. Fotografía tomada por: Eduardo A. Pérez García.

Por tales motivos, el estado actual de esta especie está en peligro; sin embargo a pesar de su situación, prácticamente no se cultiva a partir de semilla y aún no existen métodos de propagación masiva.

***Barkeria scandens* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb (1977).**

B. scandens (Fig.6) es una orquídea endémica de México, que habita en los estados de Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Según los datos registrados en la NOM-059-SEMARNAT-2010, actualmente es una especie escasa, sujeta a protección especial y por consiguiente vulnerable a desaparecer en la naturaleza, pues es una orquídea apreciada por coleccionistas de todo el mundo, por la peculiar belleza de sus flores.

Clasificación Taxonómica (Soto y Solano, 2007).

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsidae

SUBCLASE: Liliidae

ORDEN: Orchidales

FAMILIA: Orchidaceae

SUBFAMILIA: Epidendroideae

GENERO: *Barkeria*

ESPECIE: *Barkeria scandens*.

(La Llave & Lex.) Dressler & Halb., 1977

Basónimo / Nombre original: *Pachyphyllum scandens* La Llave & Lex., 1825.

Sinónimo: *Barkeria cyclotella* (Rchb. f.) Rchb. f., 1880

Epidendrum lindleyanum. (Bateman ex Lindl.) Rchb. f., 1862

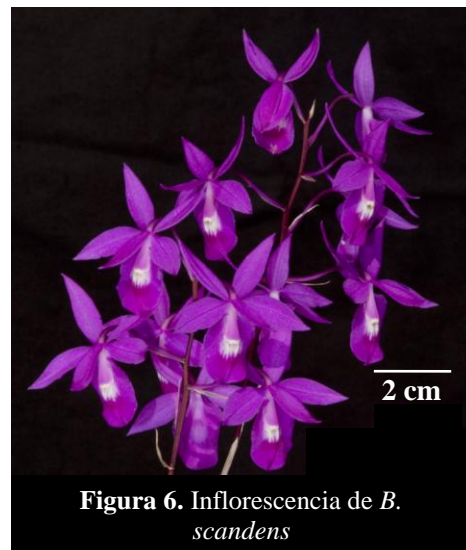


Figura 6. Inflorescencia de *B. scandens*

Descripción botánica.

Hierba epífita, decidua, escandente o subcespitosa, a veces formando grandes matas, de 20-60(-100) cm de alto. Raíces masivas, engrosadas, usualmente sencillas, carnosas, blancas, de 2-5 mm de diámetro. Tallos producidos 1-3 cm arriba de la base del tallo anterior, de manera que forma simpodios ascendentes; tallos cilíndricos, ligeramente engrosados, sin formar pseudobulbos definidos, de 7-16(-25) cm de largo, 2.5-5 mm de grosor; cubiertos por vainas apesadas.

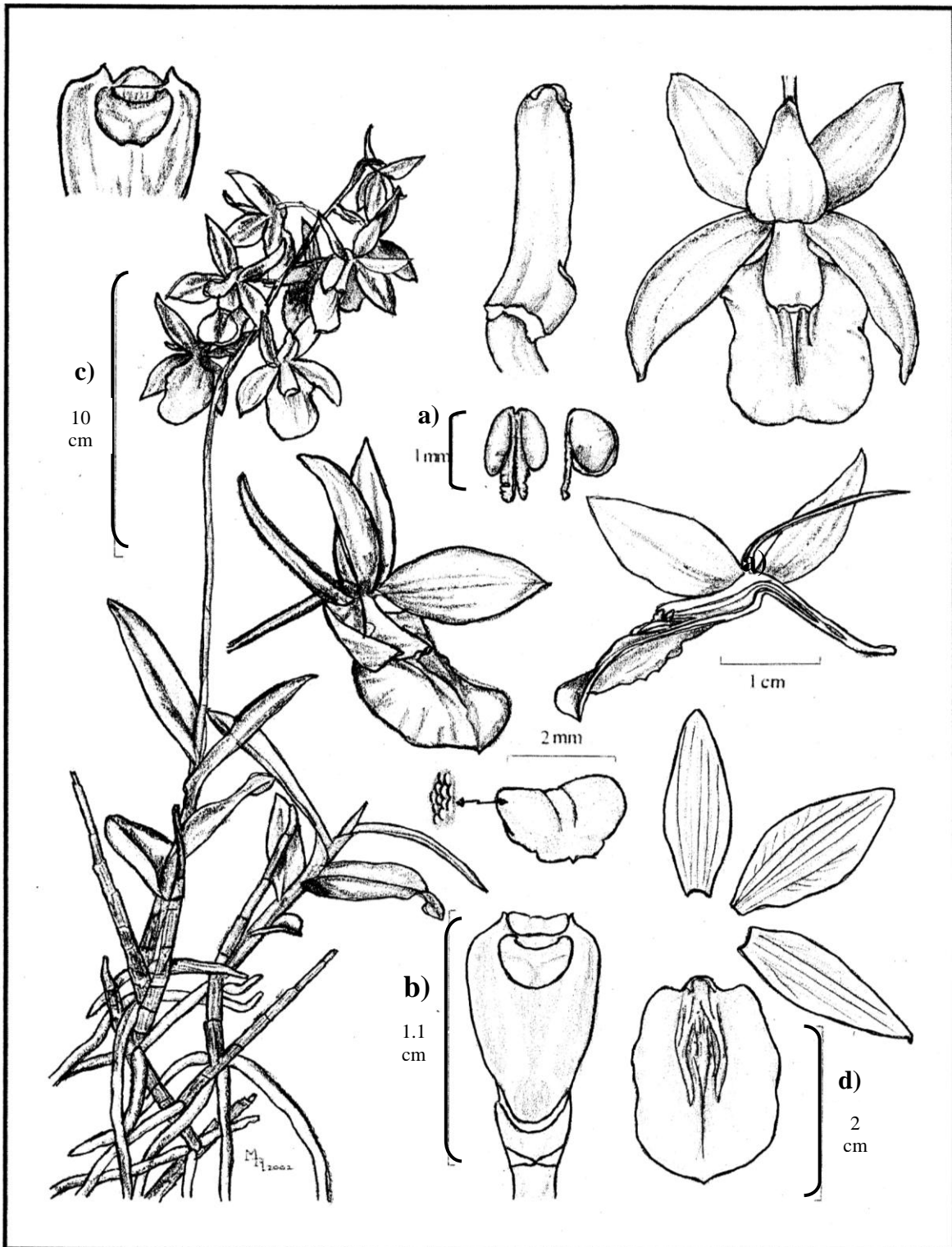


Figura 7. Lámina de *Barkeria scandens* (La Llave & Lex.) tomada de Soto y Solano, 2007: a) Polinias, b) columna, c) planta con sus órganos vegetativos y reproductivos, d) sépalos, pétalos y labio ó labelo

Hojas 3-7, dísticas, algo agrupadas en la mitad superior y mayores hacia el ápice del tallo; láminas largamente ovado-elípticas o lanceoladas, agudas a subacuminadas, la base obtusa-subcordada, algo carnosas, verdes difuminadas de morado.

Inflorescencia apical, racemosa, con frecuencia conspicuamente recta y erecta, de 10-55(-75) cm de largo; pedúnculo alargado, muy delgado, subterete, de 5-6 entrenudos, cubierto en la base por brácteas escariosas, imbricadas, fuertemente apesadas, distantes arriba; púrpura oscuro, 10-35 cm de largo, 1.5-3 mm de grosor; raquis con 3-18 flores. Brácteas florales abrazadoras, triangulares, acuminadas, escariosas, 5-18 x 1-2(-3) mm. Ovario pedicelado, extendido, abruptamente doblado cerca del ápice, subterete, algo engrosado distalmente, liso, oscuramente sulcado, magenta-púrpura, 19-31 mm de largo, 1-1.2 mm de grosor. Flores muy vistosas (Fig. 7), tépalos de color magenta intenso (muy raramente púrpura opaco o blancas), labelo del mismo color, con un área difusa algo más oscura cerca del ápice y con las quillas y el área alrededor y debajo de la columna de color crema, con rayas púrpura; columna más pálida, antera crema-amarillenta; sin aroma evidente. Labelo dirigido hacia abajo junto con la columna. Las flores son alógamas, florecen de septiembre a noviembre, Las cápsulas maduran en unos 4-5 meses. Las cápsulas están maduras en la primavera (Soto y Solano, 2007).

Distribución geográfica e importancia ecológica.

B. scandens puede ser tanto rupícola como epífita. Se ha localizado en altitudes de 1200 a 1950 msnm. En la selva baja caducifolia y en el matorral subtropical se comporta generalmente como rupícola, forma grandes matas.

Frecuentemente se establece en paredones y acantilados. En el matorral de *Clusia-Oreopanax-Roupala*, mucho más húmedo, crece preferentemente como epífita de ramillas, en arbustos de una especie de *Randia* (Rubiaceae). Se tienen muy pocas observaciones sobre la polinización de *Barkeria*. El nectario es aparentemente seco. No ha podido determinarse con certeza si es o no un sistema de polinización por engaño (Soto y Solano, 2007).

Situación actual de la especie

La belleza de esta especie la ha vuelto muy conocida y ha sido altamente apreciada por su valor ornamental, lo que ha conducido a que gran parte de estas plantas estén siendo sobrecolectadas para satisfacer la demanda comercial y aunado a esto, existe una continua perturbación de su hábitat natural, por la deforestación, el pastoreo, y la fragmentación del hábitat (Soto y Solano, 2007). Los ejemplares nativos de Guerrero y Oaxaca se encuentran sujetos a protección especial, sin embargo los de Michoacán, están en una situación más crítica, debido a una sobrecolecta en sus ambientes naturales, si no se toman las medidas adecuadas de conservación, muy probablemente se extinguirán (Soto y Solano, 2007).

El problema de conservación de *B. scandens* y otras especies vistosas de orquídeas como *Laelia speciosa*, *Euchile karwinskii* o *B. whartonia* no se ha resuelto, y es evidente que, aun cuando las autoridades no fueran permisivas respecto a la venta de estas plantas en los mercados de las ciudades mexicanas no se resolvería el problema.

Uno de los aspectos más importantes asociados a la extinción de las especies es la pérdida del hábitat en el cual se pueden mantener sus poblaciones (McNeely *et al.*, 1990). La conversión del uso de suelo debido a la deforestación, así como la identificación de tasas de deforestación alarmantes en distintas localidades de México ha sido señalada como una de las principales amenazas para la biodiversidad (Dirzo y García, 1992; Trejo y Dirzo, 2000; Bray *et al.*, 2004) y es inadmisibile que después de tantos años de esfuerzos conservacionistas las autoridades y especialmente la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) no haya tomado cartas en el asunto, en proporción y trascendencia de lo que representa este problema.

El gran potencial de esta especie no podrá ser desarrollado si no se detiene su comercio ilegal en los mercados mexicanos, pues ningún productor serio podría competir con los precios ridículamente bajos de un tallo colectado en el campo. Actualmente *B. scandens* se vende en los mercados a un precio que va de 20 a 50 pesos, un manojo de 6-8 tallos (Flores y Valencia, 2007), En Michoacán es ampliamente colectada para ofrecerla en los mercados de algunas ciudades del estado (Cd. Hidalgo, Tuxpan y Zitácuaro), así como en los de la Cd. de México. Las inflorescencias se remueven junto con todo el brote de crecimiento de ese año, incluyendo las raíces aéreas, de esta manera se forman grandes manojos de cientos de tallos con inflorescencias para llevarlos a los mercados. A principios de la década de

1990, en un día de principios de Noviembre, se podían observar en el Mercado de Jamaica de la Cd. de México, miles de tallos con inflorescencia. Estos tallos se utilizan para hacer ramilletes que adornan casas y restaurantes. Una vez terminada la floración se desechan. Las poblaciones de *B. scandens* de Michoacán están indudablemente sobrecolectadas y destinadas a desaparecer (Soto y Solano, 2007).

Para que esta especie pueda ser aprovechada adecuadamente es indispensable: a) regular la colecta en campo para que el saqueo de estos ejemplares disminuya, b) llevar a cabo campañas de educación ambiental en zonas donde la(s) especie (s) tengan algún uso cultural enfatizando su importancia, c) lograr métodos de propagación tradicionales (propagación vegetativa por hijuelos), d) optimizar métodos de micropropagación para minimizar costos y tiempo en la producción, haciendo rentable y sustentable su aprovechamiento.



Figura 8. Plantas de *Barkeria scandens* con inflorescencia. Fotografía tomada por Eduardo A. Pérez García.

En Europa y principalmente en Alemania, se cultiva *B. scandens* en muy pequeña escala y las flores son utilizadas para flor cortada. En México sólo se cultiva en un vivero de orquídeas: Orquídeas Río Verde, Toluca, Estado de México, en pequeña escala.

Por tal motivo es ineludible llevar a cabo una técnica eficiente que ayude a la propagación masiva de especies que están vulnerables a desaparecer. Siendo el cultivo de tejidos vegetales, una herramienta biotecnológica útil, pues gracias a esta tecnología ha sido posible propagar especies de orquídeas y conservarlas con éxito, tal es el caso de *Euchile mariae* (Suárez, 2006), *Vanilla planifolia* (Rojas, 2007) y *Laelia gouldiana* (Gómez, 2009).

Cultivo de Tejidos Vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales (CTV), es una rama de la biotecnología que permite el establecimiento y desarrollo de células, tejidos u órganos *in vitro*, basado en el principio de totipotencialidad celular, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta madre sin importar su función, posición o el grado de diferenciación con la capacidad de llevar a cabo procesos como la dediferenciación (transformación y pérdida de las características de especialización de un tipo celular para dar lugar a células de tipo meristemático) y rediferenciarse para regenerar una nueva planta, miles o millones, para ello se requiere: a) un medio de cultivo capaz de suministrar todos los iones minerales esenciales, b) suplementos orgánicos: aminoácidos y vitaminas, c) una fuente de carbono (principalmente sacarosa), d) reguladores del crecimiento vegetal, e) temperatura, f) humedad, g) pH, h) luz (calidad y duración) bajo condiciones asépticas (Ferl y Paul, 2000; Gamborg, 2002).

Por medio de esta biotecnología ha sido posible estudiar procesos como la citodiferenciación, la formación de órganos y/o embriones somáticos (Thorpe, 1990; 2001), la morfogénesis puede ser estudiada en forma descriptiva, fisiológica, bioquímica o molecular. Esta capacidad para la formación de órganos, tejidos y embriones regenerados *de novo*, puede ser aprovechada para regenerar nuevas plantas en forma clonal (Thorpe, 1990).

Murashige (1974; 1979), encontró que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas *in vitro* de la siguiente manera:

Etapa I. Iniciación o establecimiento (se establece el cultivo inicial o primario).

Etapa II. Multiplicación celular (células en suspensión, callogénesis, organogénesis, embriogénesis).

Etapa III. Enraizamiento, subcultivo (para aquellas especies en las que se logró una embriogénesis somática) o etapa de pretrasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo

Etapa IV. Transferencia final al medio ambiente (aclimatización) (Krikorian, 1991).
Aclimatación y aclimatización son términos que describen el proceso de adaptación de un organismo a un cambio ambiental. Aclimatación es el proceso regulado por la naturaleza y aclimatización el regulado por el hombre (Brainerd y Fuchigami, 1981). La transferencia y aclimatización *ex vitro* es la última fase, pero frecuentemente la más crítica e importante, para que un sistema de micropropagación pueda ser considerado eficiente (Kadleček *et al.*, 2001). En esta etapa un número substancial de las plantas micropropagadas no logran sobrevivir a la transferencia en condiciones *ex vitro*, por lo que esta fase resulta extremadamente importante y debe llevarse a cabo con extremos cuidados para evitar una pérdida considerable de plántulas, ya que presentan ciertas diferencias con las plantas producidas en invernadero o en condiciones naturales (George y Sherrington, 1984; Hazarika, 2003).

En condiciones *in vitro* las plantas fijan poco CO₂, debido a que la mayor parte de los carbohidratos que necesitan para su crecimiento y desarrollo los obtienen de la sacarosa proporcionada por el medio de cultivo, por lo que no son dependientes de su propia fotosíntesis, convirtiéndose así en plantas mixotróficas. En algunas ocasiones los cloroplastos no están completamente desarrollados, los estomas tienen baja funcionalidad y las ceras cuticulares y epicuticulares de las hojas son muy delgadas, por lo que al cambiarlas a un ambiente más agresivo tienen que pasar a una nutrición completamente autótrofa, motivo por el cual un porcentaje muy alto de plántulas, no logra su establecimiento *ex vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999). Es entonces cuando necesitan un sustrato que les permita realizar el cambio de condiciones ambientales, de manera gradual, y continuar el desarrollo de su sistema radicular y vegetativo para completar su establecimiento (Thompson, 1977; citado por Salazar, 2003).

Años posteriores Krikorian (1991), decidió agregar una etapa inicial, antes de lo descrito por Murashige, a la que denominó Etapa 0.

Etapa 0. Etapa inicial, que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pre-tratamiento (desinfección del material biológico) (Krikorian, 1991). Es necesario llevar a cabo la desinfección superficial del material biológico, para esto se emplean distintos compuestos químicos, actualmente es casi generalizado el empleo del etanol y de hipoclorito de sodio (NaOCl) (Sweet y Bolton, 1979). El mecanismo de acción del hipoclorito se basa en la inactivación de las reacciones enzimáticas, de ácidos nucleicos y desnaturalización de proteínas de las células de las bacterias, compuestos vitales para ellas. El hipoclorito de sodio al disolverse en agua produce el ion ClO^- que inmediatamente destruye a las bacterias por oxidación (Negroni, 2009).

Para el caso específico de semillas individuales de orquídeas se utilizan concentraciones del 10 al 30% de hipoclorito de sodio en tiempos de exposición de 5 a 20 min (Constabel y Shyluk, 1994; Santos *et al.*, 2005). Este agente desinfectante es comúnmente usado por su efectividad y fácil adquisición (Sweet y Bolton, 1979). La sensibilidad de los explantes utilizados varía ante las distintas concentraciones y tiempo de inmersión en el agente desinfectante (George y Sherrington, 1984).

El CTV constituye dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha proporcionado. Sus aplicaciones son múltiples, van desde los estudios teóricos para la resolución de problemas básicos y aplicados sobre fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos (hongos y/o bacterias), la micropropagación, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, selección *in vitro* y la ingeniería genética (Thorpe, 1990; Jiménez, 1998). Posibilita el mantenimiento *in vitro* de los recursos genéticos (cualquier parte reproductiva de las plantas), con una alta viabilidad y capacidad de regeneración, objetivos que se logran mediante la selección apropiada del inóculo y al manejo de los componentes del medio de cultivo y algunos factores químicos y físicos (Rublúo, 1985).

Entre las ventajas de esta tecnología, se pueden mencionar las siguientes: a) se requiere poco espacio para la preservación de una gran cantidad de material, b) el germoplasma se puede mantener libre de insectos, bacterias, hongos patógenos y virus; lo que facilita el

intercambio internacional de los materiales, c) cuando se requiere, permite una propagación masiva y d) los costos una vez iniciado el sistema, se abaten fácilmente (Stushnoff and Fear, 1985; Henshaw, 1975). Dentro de los grupos de plantas que se han micropropagado en distintos jardines botánicos por medio de cultivos de tejidos se encuentran cactáceas, orquídeas, cícadas, agaves, coníferas y compuestas: entre otras, como las que se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Algunas especies propagadas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *RCV: Reguladores del Crecimiento Vegetal

Especie	Explante	Medio y RCV*	Vía de regeneración.	Referencia.
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i> (Cactaceae)	Tubérculos de plantas germinadas <i>in vitro</i> .	de MS, ANA y BA.	Organogénesis y embriogénesis somática directa e indirecta.	Moebius <i>et al.</i> , 2003.
<i>Stanhopea tigrina</i> , <i>Laelia anceps</i> (Orchidaceae)	Semillas	MS	Embriogénesis cigótica y somática	Tinoco y Mata, 2007.
<i>Ceratozamia euryphyllidia</i> , <i>Ceratozamia mexicana</i> (Zamiaceae)	Megagametofitos, embriones cigóticos y hojas inmaduras.	Litz, Kin y 2,4-D	Embriogénesis somática	Chávez <i>et al.</i> , 1992; Chávez <i>et al.</i> , 1998.
<i>Agave victoriae-reginae</i> (Agavaceae)	Segmentos de tallo y yemas axilares.	de MS, BA y 2,4-D	Organogénesis y embriogénesis somática indirecta.	Martínez <i>et al.</i> , 2003.
<i>Dendrobium tosaense</i> (Orchidaceae)	Semillas	MS	Embriogénesis cigótica	Shu- Fung <i>et al.</i> , 2004.
<i>Vanilla planifolia</i> <i>Vanilla pompona</i> (Orchidaceae)	Semillas	MS	Embriogénesis cigótica	Menchaca <i>et al.</i> , 2011.
<i>Epidendrum veroscriptum</i> , <i>Cattleya</i> x Esbetts (Orchidaceae)	Semillas	MS	Embriogénesis cigótica y somática	Tinoco y Mata, 2007.

<i>Lycaste aromatica.</i> (Orchidaceae)	Semillas	MS 50%	Embriones somáticos	Scheffknecht <i>et al.</i> , 2009.
<i>Solanum tuberosum</i> (Solanaceae)	Discos de tubérculo	White's modificado, zeatina y AIA.	Brotos	Kikuta y Okazawa, 1984.
<i>Aloe barbadensis</i> (Liliaceae)	Ápices de tallo	MS, BA y ANA	Brotos	Baksha <i>et al.</i> , 2005
<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	Nucelas de semillas	B5 y MS 2,4-D	Embriones somáticos	Rivera <i>et al.</i> , 2004

Es importante notar, que aún cuando existen muchas ventajas en CTV, también existe una serie de desventajas, es necesaria una infraestructura especializada y costosa, se requieren métodos específicos para obtener resultados óptimos de cada especie y variedad, así como personal capacitado. A pesar de que se pueden producir un gran número de plantas, a veces tienen características indeseables (George *et al.*, 2008).

Con el fin de que los explantes sobrevivan *in vitro*, éstos tienen que ser cultivados en un medio que contiene sacarosa o alguna otra fuente de carbono, por lo que inicialmente no son capaces de producir su propio alimento mediante la fotosíntesis y tienen que someterse a un período de transición, de una condición mixótrofica a una autótrofa antes de que sean capaces de crecer independiente. Recientemente se han propuesto métodos que permitan la producción de plantas autótrofas *in vitro* (Kozai and Smith, 1995).

Algunas plantas, particularmente especies tropicales, contienen concentraciones elevadas de sustancias fenólicas, y en cultivo *in vitro* son oxidadas cuando las células son heridas o están en proceso de senecer, y adquieren un color marrón o negro, en la mayoría de los casos, esta oxidación inhibe la proliferación celular (George *et al.*, 2008)

En relación a la estabilidad genética, se ha mencionado que es posible encontrar anomalías citogenéticas en plantas regeneradas por medio del cultivo de tejidos (Nwankwo & Krikorian *et al.*, 1983; D'Amato y Bayliss, 1985), y bajo condiciones de almacenamiento o subcultivos continuos de multiplicación prolongado, la probabilidad de que estas anomalías ocurran es mayor (Withers, 1980).

Factores involucrados durante la morfogénesis *in vitro*:

Planta donadora del explante: el estado fisiológico y la edad de la planta fuente de explantes influyen en la morfogénesis. En general mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*.

El explante: Como regla general, se puede admitir que las plantas jóvenes son las que proporcionan los inóculos más reactivos, ya que la totipotencialidad disminuye con la edad, el tamaño del fragmento cultivado es muy importante; en efecto, mientras más grande es el inóculo, más determinantes serán los equilibrios endógenos. En contraste un inóculo pequeño será orientado con mayor facilidad por las sustancias que contiene el medio de cultivo (George *et al.*, 2008). En el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, o también cuando se desee realizar una propagación clonal, los meristemos tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de éstos (Calva y Ríos, 1999; Seabrook, 1980; Street, 1977).

Factores físicos: La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28° C. La luz es un factor fundamental en la morfogénesis, involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad.

Medio de cultivo: el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y forma física (Villalobos y Thorpe, 1991). Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación; en general se le adicionan macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, una fuente de carbono (sacarosa) y el agente gelificante (en caso de medios semisólidos), así como sustancias reguladoras del crecimiento, y otros compuestos (Roca y Mroginski, 1991). 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. En la actualidad es uno de los más usados por el amplio intervalo de especies vegetales que crecen adecuadamente en él (Razdan, 2003).

Reguladores de crecimiento.

Las fitohormonas y sus inhibidores son sustancias producidas por las plantas y regulan su respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad, ayudando de esta manera a regular y coordinar los procesos esenciales para el desarrollo normal de las plantas (Doerner, 2000; Crozier *et al.*, 2000). Este tipo de sustancias se pueden dividir principalmente en auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico y el ácido salicílico.

Sin embargo las auxinas y citocininas son por mucho, las más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis en cultivo *in vitro* (George *et al.*, 2008).

Auxinas

Son compuestos que tienen un núcleo indólico, éste se sintetiza a partir del aminoácido Triptófano por la vía shikímica (Pérez *et al.*, 1999). El efecto de las auxinas está estrechamente ligado al alargamiento celular, que se explica por sus efectos sobre la celulosa-sintetasa, el aumento de la plasticidad parietal y el aumento de la absorción de agua. Las auxinas también tienen un efecto marcado sobre la división celular citocinesis (George *et al.*, 2008). Las auxinas participan en muchos procesos del desarrollo vegetal: crecimiento, dominancia apical, enraizamiento, partenocarpia, tropismos, abscisión. Uno de los reguladores más utilizados en la formación de raíces es el ácido naftalenacético (ANA) debido a que no causa efectos fitotóxicos (Pierik, 1990; Salisbury and Ross, 2000).

En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces, promover la formación de brotes adventicios, inducción de callo y frecuentemente organogénesis en cultivos en suspensión, la adición de auxinas exógenas al medio de cultivo, generalmente es esencial para iniciar la formación de embriones somáticos *in vitro*; no obstante para lograr el crecimiento y desarrollo de éstos se requiere un medio libre de auxinas, debido a que altos niveles de éstos pueden inhibir el desarrollo y crecimiento del meristemo apical (Razdan, 2002). En función de otros reguladores del crecimiento presentes en el medio, la concentración de auxina puede cambiar el tipo de crecimiento, alterando la programación genética y la fisiología de las células y/o tejido, regresándolas a un estado de división y desdiferenciación celular, para diferenciarse hacia una organogénesis o embriogénesis (Terzi and Loschiavo, 1990).

Salisbury y Ros (2000) afirman que las auxinas o cualquier otro tipo de fitoregulador son fisiológicamente funcionales cuando se encuentran en pequeñas cantidades, y que una alta concentración de estas sustancias ejerce un efecto negativo sobre las plantas porque su exceso, en lugar de inducir una respuesta específica por parte del tejido vegetal, produce toxicidad en el mismo.

Las auxinas más utilizadas son: ácido indol 3-butírico (AIB), ácido 3-indolacético (AIA), ácido α -naftalenacético (ANA), y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), las primeras dos son hormonas naturales es decir, sintetizadas por la planta y las siguientes dos son hormonas sintéticas. El AIB y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callo (Jiménez, 2005).

En cultivo *in vitro*, la elección y concentración de auxina depende de: a) el tipo de crecimiento y/o desarrollo requerido, b) la tasa de absorción y transporte de la auxina en el tejido inicial, c) la inactivación (oxidación y/o conjugación) de la auxina en el medio y el explante, d) los niveles naturales y la síntesis endógena dentro del explante, e) la sensibilidad del tejido a la auxina (y a otras hormonas también) y f) la interacción, si existe, entre las auxinas aplicadas y las endógenas (George *et al.*, 2008).

Citocininas

Las citocininas generalmente son derivados de la adenina, sin embargo también pueden provenir de la fenilurea como el Thidiazurón (TDZ), estimulan la división y diferenciación celular que afecta a una amplia gama de procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, entre los que cabe citar la iniciación del desarrollo del cloroplasto, fotosíntesis, la expansión de los cotiledones.

Algunos de los efectos fisiológicos de la citocinina sobre las plantas o microorganismos son los siguientes: activación de la división celular en algunos microorganismos, formación de yemas en hojas separadas de la planta y en algunos musgos, estimulación de la formación de tubérculo en la papa, inducción de iniciación del crecimiento en los tallos y ramas, rompimiento del letargo de las yemas y semillas en muchas especies (Salisbury and Ross, 2000).

En cultivo *in vitro* inducen la formación de brotes (Salisbury and Ross, 2000; Azcón- Bieto y Talon, 2001; Martínez, 2002), poseen la propiedad específica de provocar el crecimiento

de cultivos de tejidos en forma de callo, y en algunas plantas si se hacen flotar secciones o discos de hojas sobre soluciones de citocininas en la oscuridad, retrasan la pérdida de clorofila de la hoja. De las citocininas, la más activa es la N6-(2-isopentenil) adenina; sin embargo, las más utilizadas en cultivo de células vegetales son la 6-bencilaminopurina (BAP) y la kinetina (Kin) (Street, 1977; Crozier *et al.*, 2000). En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citocininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical.

Interacción auxina- citocinina.

Skoog and Miller (1957) encontraron que la formación de brotes puede ser inducida en callo de Tabaco usando relativamente bajos niveles de auxina y altos niveles de citocinina en el medio de cultivo. Desde este descubrimiento se sabe que muchos aspectos de diferenciación celular, organogénesis o embriogénesis en cultivo de órganos y tejidos, son controlados por la interacción entre las concentraciones de citocininas y auxinas.

Por tanto, el balance entre auxinas y citocininas en cultivo *in vitro*, suele ser determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido (Pérez *et al.*, 1999), por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de propagación (Pérez, 1998) (Fig.9).

En las orquídeas, en algunos trabajos, se reporta que la combinación de auxinas como el ANA y el 2,4-D y citocininas como la Kin o la BAP, 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, 1984). El uso de reguladores de crecimiento como alternativa para el incremento de proliferación de brotes y/ó embriones, ha probado la influencia que ejercen diferentes dosis de auxinas y citocininas en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) en diferentes géneros como *Cattleya aurantiaca* (Mauro *et al.*, 1994; Torres y Mogollón, 2000; Krapiec *et al.*, 2003), *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* y *D. moschatum* (Nayak *et al.*, 1997), *Phalaenopsis* sp. (Kosir *et al.*, 2004), *Vanda spathulata* (Decrose *et al.*, 2003), *Catasetum fimbriatum* (Peres *et al.*, 2001), entre otros.

De acuerdo con George y Sherrington (1984), las respuestas que pueden esperarse del tejido ante el balance de auxinas y citocininas son las siguientes:

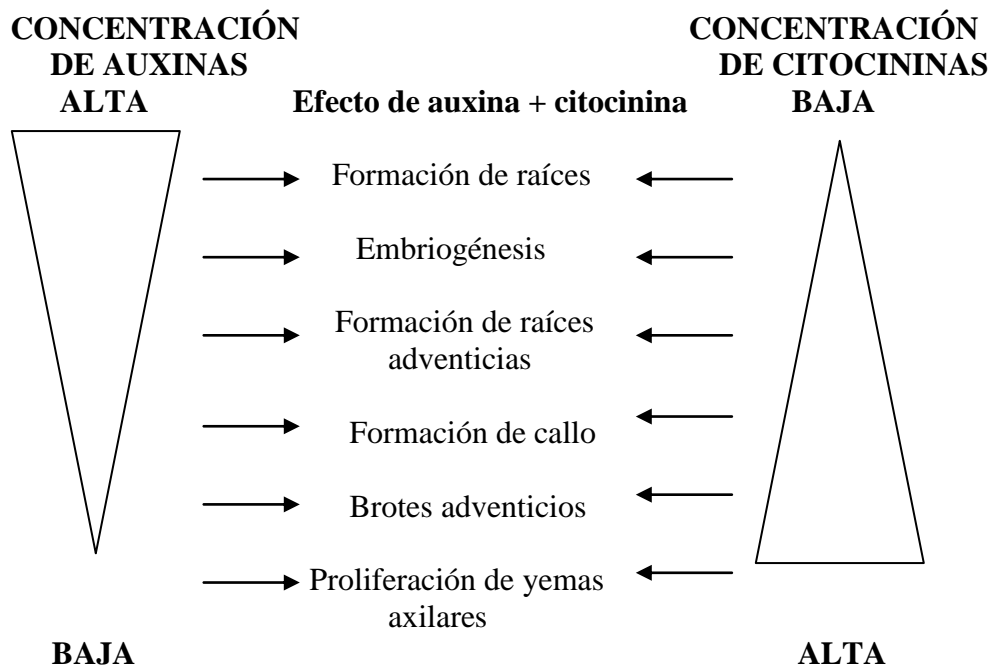


Figura 9. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas que generalmente son requeridas durante la morfogénesis *in vitro*.

George y Sherrington (1984), mencionaron que existen dos vías diferentes para lograr la regeneración de plantas *in vitro*: la organogénesis y la embriogénesis. Éstas pueden ocurrir de manera directa a partir del explante inicial o bien indirectamente mediante la previa formación de callo que es un tejido parenquimatoso, indiferenciado, sin estructura, y posteriormente se puede diferenciar hacia una estructura organizada. 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 ocurra según la especie empleada, por ejemplo Mata *et al.* (2011) logró la micropopagación de brotes y PLB's de *Oncidium tigrinum*, a partir de protocormos completos, cultivados en medio MS y KC, con diferentes concentraciones hormonales, la brotación múltiple se logró en todos los tratamientos, y la embriogénesis, sólo se dio en algunos casos, en concentraciones que iban de 0.1 ANA con 1-2 BAP mg/l.

Micropropagación de orquídeas.

Estructuralmente, los embriones de las orquídeas carecen de endospermo. El embrión está integrado por una masa de células, que son muy similares unas con otras y no es evidente ningún tejido especializado. Las principales reservas alimenticias de las semillas están almacenadas en el propio embrión. Sin embargo, las semillas de las orquídeas carecen de un mecanismo metabólico apropiado para utilizar sus propias reservas durante la germinación (Luna *et al.*, 2004). Por tanto, en la naturaleza necesitan ser infestadas por un hongo micorrízico, que produce enzimas hidrolíticas (endopoligalacturonasas, protopectinasas, celulasas y otras hidrolasas) que son capaces de romper las macromoléculas, y de esta forma permiten que el embrión de las orquídeas asimile los nutrientes que necesita para su germinación. Así, Noel Bernard (1899), fue el primero en descubrir de forma accidental que los hongos juegan un papel importante en la germinación de las semillas de orquídea, primero en *Neotia nidus-avis* y después en otras orquídeas, incluyendo *Phalaenopsis* (Arditti, 1992). Posteriormente, al morir Bernard, Hans Burgeff desarrolló un método simbiótico para la germinación de semillas de orquídeas, el cual consistía en inocular en tubos de cultivo las semillas junto con el hongo, en un medio de cultivo que contenía un extracto de los tubérculos de *Ophrys*, llamado “salep”. A pesar de que su método no fue exitoso se utilizó por un tiempo (Stewart 1988). De tal forma, que entre 1841 y 1921, éste fue el único método para lograr la germinación de las semillas de orquídeas, hasta que en 1922, Knudson analizó el “salep” y encontró que éste consistía de 48% de mucílago, 27% de almidón y 5% de proteínas, algunos azúcares y minerales solubles (Arditti, 1967). A partir de esto, Knudson demostró que era posible la germinación de las semillas sobre un medio de cultivo simple que contuviera minerales y azúcares, sin necesitar la presencia del hongo. La investigación desarrollada por Knudson revolucionó el mundo de la propagación de las orquídeas, ya que permitió que semillas de *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, y de muchas otras orquídeas, pudieran germinar de manera asimbiótica *in vitro*, en un medio de cultivo que denominó solución B, el cual fue una modificación de la formulación propuesta por W. Pfeffer (Arditti, 1992).

Años más tarde, Knudson estableció que las semillas de orquídeas deben germinar en un medio sólido, constituido por una mezcla balanceada de minerales y una fuente de sacarosa, dando como resultado la formulación del medio Knudson C en 1946 (Arditti, 1967). De

esta manera, Knudson fue el primero en dar a conocer un medio exitoso para la germinación asimbiótica de las semillas de orquídeas, el cual es ampliamente utilizado hoy en día, con sólo algunas pequeñas modificaciones en su composición. Sin embargo, el medio de cultivo MS que originalmente fue diseñado para maximizar el crecimiento de callo en tabaco, se ha observado que también favorece la germinación y desarrollo de diferentes especies de orquídeas, debido a que es el medio de cultivo con la concentración más alta de sales minerales, concentración 136 veces más elevada que el contenido de sales minerales presentes en el tronco de un árbol. Además, éste contiene altas concentraciones de nitrógeno en forma de amonio y nitrato (Arditti y Ernst, 1984; Razdan, 2002).

El cultivo asimbiótico *in vitro* tiene varias ventajas: se tienen más posibilidades de éxito en la germinación de las semillas que en condiciones naturales, debido a que es posible sustituir la acción del hongo por un medio nutritivo (germinación asimbiótica). Además, la germinación y desarrollo tienen lugar más rápidamente *in vitro*, ya que se realiza en un ambiente acondicionado, y sin competencia con hongos y bacterias (Pierik, 1990).

La primera propagación clonal de orquídeas, por medio del cultivo de tejidos vegetales, fue desarrollada por Gavino Rotor en 1949, quien cultivó secciones de nudos (cada uno con una yema) de inflorescencias de *Phalaenopsis*, utilizando el medio Knudson C, con la finalidad de que a partir de cada yema se pudieran formar plantas completas. Después de 14-60 días de cultivo, logró la formación de brotes con hojas, los cuales formaron raíces una vez formadas 2-3 hojas. Solamente 7 de las 65 yemas utilizadas como explantes murieron durante el cultivo. De esta forma, Rotor inició la micropropagación de orquídeas y fue el primero en publicar un reporte científico de la multiplicación clonal de una planta superior *in vitro*, utilizando un medio nutritivo, explantes y condiciones asépticas (Arditti y Krikorian, 1996).

Sin embargo, el acontecimiento que revolucionó la propagación clonal de orquídeas fue en 1960, con George Morel, quien introdujo la técnica del cultivo de meristemos como una forma de propagación vegetativa. Morel, intentó obtener plantas de *Cymbidium* libres de virus por medio del cultivo de meristemos, para lo cual aisló meristemos apicales *in vitro*, a partir de los cuales obtuvo cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) que eran extremadamente idénticos a los que se forman después de la germinación de las semillas, encontrando que era posible producir de 6-8 nuevos protocormos, a partir de uno inicial en

alrededor de seis semanas. De esta forma, Morel produjo millares de plantas en un año, a partir de un único ápice (meristemo apical con algunos primordios foliares), convirtiéndose así el cultivo de meristemas en la primera aplicación comercial para la propagación vegetativa *in vitro* (Pierik, 1990). Arditti (1977), empleando el mismo sistema que Morel, reportó que a partir de una sola yema de *Cymbidium* es posible obtener en un año cuatro millones de plantas. Este método, que originalmente se desarrolló para *Cymbidium*, se modificó más tarde y se utilizó para *Cattleya* y muchos otros géneros más de orquídeas. En la actualidad, la técnica desarrollada por Morel se realiza a gran escala en todo el mundo y ha sido aplicada exitosamente para la producción comercial de ciertas orquídeas. La producción de grandes cantidades de plantas de calidad, el establecimiento de nuevos híbridos y la multiplicación y preservación de germoplasma son algunos de los beneficios que han derivado de la aplicación de esta tecnología (Sagawa, 1991). A partir de esto, con el paso de los años se han desarrollado algunos otros métodos, para la propagación de orquídeas *in vitro*, empleándose diferentes tipos de explantes, tales como protocormos, meristemas de raíz, hojas, yemas, tallos, inflorescencias y rizomas, entre otros (Tabla 4). Murashige en 1974, enumeró 22 géneros de orquídeas que podían propagarse mediante el cultivo de tejidos vegetales, mientras que, Arditti en 1977 registró el cultivo para 35 géneros, incluyendo algunos híbridos intergenéricos (Goh, 1990). Posteriormente, Sagawa y Kunisaki (1984), señalaron numerosas técnicas para la propagación clonal de orquídeas, y Arditti y Ernst en 1993, reportaron el protocolo de propagación para 83 géneros de orquídeas, utilizando diferentes explantes como raíces, hojas, inflorescencias, yemas florales, tallos, protoplastos y meristemas, entre otros.

El cultivo de tejidos se ha venido utilizando para la producción comercial de orquídeas, principalmente para los géneros *Phalaenopsis*, *Oncidium*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, y *Paphiopedilum*, tal es el caso de Taiwán, donde se ha visto incrementada la producción de orquídeas del 51% en 1998 al 85% para el año 2000 (Pan, 2007).

La productividad en la micropropagación de muchas especies y cultivares de orquídeas ha sido base de la próspera industria mundial productora de vitroplantas (Murashige, 1974). Sin embargo se ha observado que la tasa de multiplicación, y con ello el rendimiento de los cultivos, depende en gran medida de la metodología utilizada (Murashige, 1974) Tabla 4.

La micropropagación de las orquídeas se puede dividir en dos grupos importantes, basados principalmente en el objetivo de trabajo y la fuente del explante: micropropagación por semillas, tiene ciertas ventajas: 1) a partir de su germinación, es posible obtener plantas libres de patógenos (hongos, bacterias), 2) se incrementa la diversidad genética de las plantas formadas, puesto que cada una surge a partir de la fusión de un par de gametos distintos, 3) es posible inducir brotación múltiple en un estado precoz de desarrollo, con una tasa de multiplicación alta, debido a su bajo grado de diferenciación celular en un tejido con alto grado de estabilidad genética y 4) se incrementan notoriamente los porcentajes de germinación en comparación con las técnicas convencionales, con las que en ocasiones no se logra una germinación o el porcentaje es muy bajo debido a la dormancia de las semillas, o a que presentan requerimientos específicos (George y Sherrington, 1984; Martínez, 1985; Fay, 1994; Rodríguez, 2000). En condiciones naturales la germinación de orquídeas es muy baja (alrededor del 5% del total producido en una cápsula). La germinación de semillas *in vitro* fortifica los esfuerzos de conservación de orquídeas al ofrecer una mayor cantidad de plantas a un menor precio, tratando de desalentar el saqueo de individuos silvestres (Kuan y González, 1993). A partir de esto, con el paso del tiempo se han desarrollado algunos otros métodos, para la propagación de orquídeas *in vitro*, empleándose diferentes tipos de explantes (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplos de orquídeas cultivadas *in vitro*.

RCV: Reguladores del Crecimiento Vegetal

Género/ Especie.	Explante.	Medios de Cultivo y RCV	Respuesta.	Objetivo	Referencia.
<i>Cattleya</i>	Meristemo de Raíz.	Vacin y Went, suplementado con 2,4-D y ANA	Formación de PLB's **	Comercial	Kerbauy, 1991
<i>Cattleya mossiae</i>	Tallo.	MS, suplementado con BAP y TDZ	Formación de brotes *	Conservación	Torres y Mogollón, 2000.
<i>Laelia anceps subsp.</i>	Protocormos y Callo	MS, suplementado con ANA,	Formación de PLBs. **	Conservación	Lee <i>et al.</i> , 2010.

<i>dawsonii.</i>		BAP, Kin y AIA			
<i>Laelia speciosa</i>	Hojas jóvenes.	MS modificado, suplementado con ANA y 2iP	Formación de brotes **	Conservación	Barrera, 2006
<i>Laelia eyermaniana</i>	Semillas, Protocormos	MS 50%, MS	Formación de Protocormos y PLB's	Conservación	Nava <i>et al.</i> , 2011.
<i>Prosthechea mariae</i>	Hojas jóvenes Y protocormos.	MS suplementado con BAP y ANA	Formación de PLB's * y **	Conservación	Santos y Álvarez, 2009
<i>Oncidium bifolium</i>	Secciones de láminas foliares	MS 50%, TDZ y 2-4D	Formación de brotes y PLB'S**	Comercial	Flachsland <i>et al.</i> , 2006
<i>Trichocentrum stramineum</i>	Protocormos y ápices de tallo	Knudson, 2.4-D y K.	Formación de PLB's.*	Conservación	Rangel, 1995.
<i>Phalaenopsis</i>	Hoja	Vacin y Went, 2,4-D y BAP	Formación de PLB's.*	Comercial.	Ishii <i>et al.</i> , 1998.
<i>Epidendrum elongatum</i>	Semillas	MS suplementado con AIA y BAP	Protocormos	Conservación.	Pedroza, 2009
<i>Bletia urbana</i>	Protocormos	MS y KC, ANA y BA.	Formación de PLB's*	Conservación	Martínez, 1991.
<i>Dendrobium</i> híbrido (Sonia 17 y 28)	Hojas	MS, BAP	Formación de PLB's**	Comercial	Martin and Madassery, 2006
<i>Vanilla planifolia</i>	Hojas	MS, ANA y BAP	Formación de PLB's *	Comercial	Janarthanam and Seshadri, 2008.
<i>Aerides maculosum</i> Lindl.	Hojas	MS, BAP	Formación de PLB's*	Conservación y Comercial.	Murthy and Pyati, 2001

(*)= Vía directa (**)=Vía indirecta

Lo ideal sería que todas las especies de plantas se conservaran *in situ*; sin embargo esto no es viable en los casos en que quedan muy pocos o ningún individuo silvestre. Por lo tanto, un programa combinado de conservación *in situ* y *ex situ* es generalmente la mejor forma de proteger especies que están en alguna categoría de riesgo.

Aunado a esto, los métodos convencionales no cubren la intensa demanda de esta familia de plantas. Por esto, resulta indispensable establecer estrategias eficientes para la conservación tanto *in situ* como *ex situ* de estas especies, en las que la presión en su ambiente natural se incrementa diariamente (IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 1996).

De esta forma, se puede aplicar un plan de conservación integral que combine estudios genéticos, de biología reproductiva y de cultivo *in vitro*, que proporcione material para efectuar su reintroducción, aumentar las poblaciones, realizar investigaciones y desarrollar programas educativos

2.2 JUSTIFICACIÓN.

Barkeria scandens y *B. whartoniana* son especies endémicas de México, con un alto riesgo de que sus poblaciones silvestres sean constantemente alteradas, por la destrucción de su hábitat y la colecta y comercio ilegal de ejemplares reproductivos, razones que han conducido a que se encuentren catalogadas como especies sujetas a protección especial por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, (SEMARNAT, 2010). No obstante esta crítica situación y su continuo saqueo y venta ilegal, no se cultivan de forma masiva, es por eso la búsqueda de alternativas para su propagación y conservación. El cultivo *in vitro* ha demostrado ser una herramienta muy útil para la conservación de especies, raras o amenazadas ya que permite la obtención de gran cantidad de plantas disponibles, tanto para su eventual reintroducción, como para satisfacer la demanda comercial y disminuir en gran medida la presión de colecta ilegal de orquídeas en estado silvestre. En este sentido, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales deben aplicarse como una herramienta de gran utilidad para el estudio, propagación y conservación de estas especies.

En esta investigación se sugiere una estrategia de conservación de *B. scandens* y *B. whartoniana*, que fomente el estudio y propagación *in vitro* de otras especies de orquídeas

que se encuentren en una situación similar, con la finalidad de reducir la presión en las poblaciones silvestres.

2.3 OBJETIVOS.

Objetivo general:

Establecer condiciones para la propagación *in vitro* de *Barkeria whartonia* y *B. scandens*.

Objetivos particulares:

- Lograr la germinación asimbiótica de semillas de *B. whartonia* *in vitro*.
- Explorar la respuesta morfogénica de secciones longitudinales de protocormos cultivados *in vitro* de *B. whartonia*.
- Explorar la respuesta morfogénica de secciones de hojas, tallos y raíces cultivados *in vitro* de *B. scandens*.
- Determinar las concentraciones de los reguladores de crecimiento para la regeneración *in vitro* de *B. whartonia* a partir de secciones longitudinales de protocormos.
- Determinar las concentraciones de los reguladores de crecimiento para la regeneración *in vitro* de *B. scandens* a partir de secciones de hoja, tallo y raíz.
- Determinar la identidad de los regenerantes obtenidos por medio de estudios estructurales.
- Establecer las condiciones para la aclimatización de las plántulas generadas *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico:

El material biológico que se utilizó fueron plántulas de *B. scandens* obtenidas a medio año de germinación *in vitro* en medio MS (1962) adicionado con carbono activado 1 mg/L. Se utilizaron dos tamaños de plántulas; con un tamaño aproximado de 1-2 cm y plántulas de 3-4 cm de altura (Fig. 10).

En el caso de *B. whartoni*, se utilizó una cápsula dehiscente que fue colectada el 22 de Junio de 2011 en el municipio de Nizanda, Oaxaca por el Dr. Eduardo A. Pérez García.

La cápsula fue colocada en un sobre de papel estraza y almacenada durante 15 d (días) en refrigeración a 6°C hasta su utilización.

Desinfección y siembra de las semillas de *B. whartoni*.

Para determinar el total de semillas sembradas se cuantificó el número de semillas en 10 lotes por conteo directo, estandarizando 166 semillas por cada 1 mg. Concluyendo un total de 1660 semillas en 10 mg, sembradas en 10 frascos (1 mg/frasco).

Para la desinfección de las semillas, estas se colocaron en una jeringa 3 ml con una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) 30% (v/v) durante 10 minutos y manteniendo a las semillas en agitación constante. Bajo condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada. Terminado el proceso de desinfección, se sembraron las semillas *in vitro* en medio de cultivo con sales inorgánicas y vitaminas del medio Murashige y Skoog (1962) (MS), 2 mg/L de glicina, 100 mg/L de inositol, 30 g/L de sacarosa (medio MS). El pH del medio se ajustó a 5.7 utilizando un potenciómetro y soluciones de NaOH y HCl a 0.1, 0.5 y 1N. Posteriormente se agregó a los medios 3.7 g/L de gelrite. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 25 ± 2°C, fotoperiodo 16h/8h, luz/oscuridad. El medio fue esterilizado en un autoclave a 121°C y 1.5 Kg/cm² durante 17 min. El medio de cultivo para la inducción de *B. whartoni* y *B. scandens* fue medido (pH) y esterilizado de la misma manera. Para evaluar el porcentaje de germinación, se cuantificó el número de semillas no germinadas después de que la mayor parte de las semillas ya habían germinado, esta cantidad se restó del número inicial de semillas obteniendo el porcentaje de germinación.

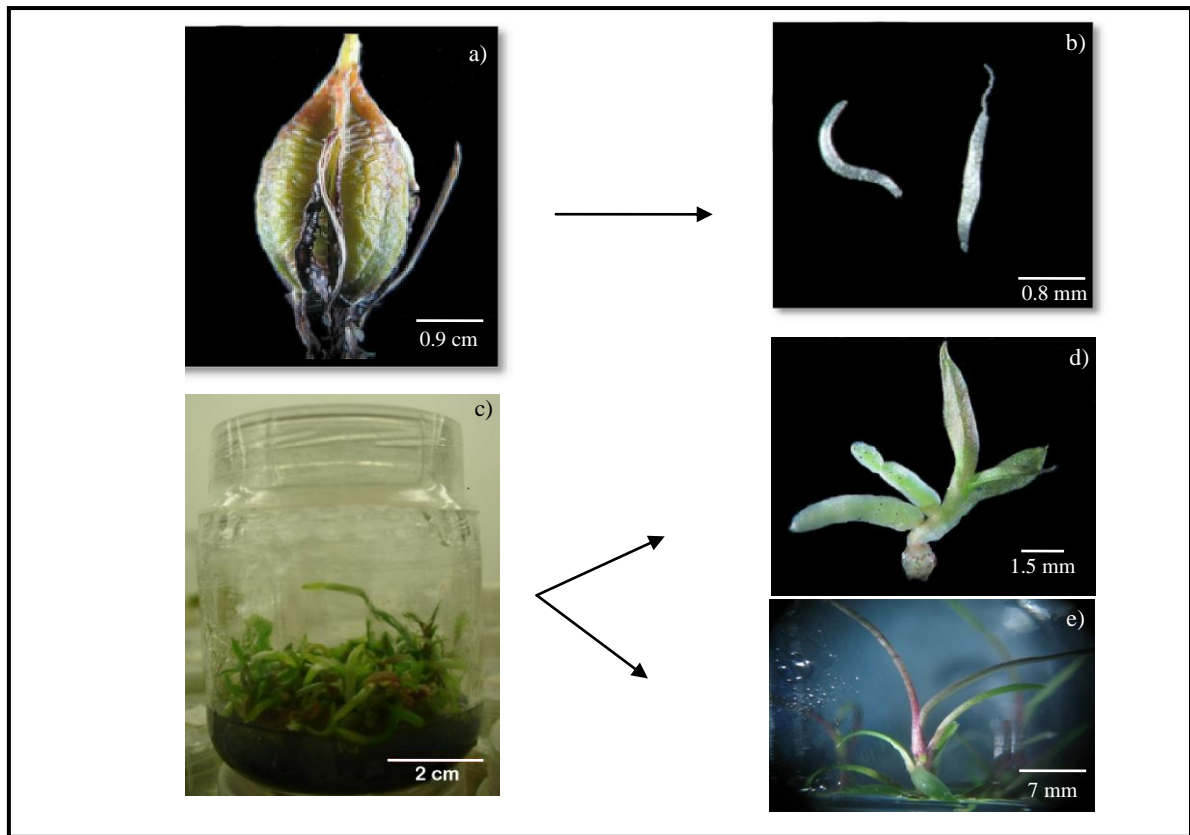


Figura 10. a) Cápsula de *B. whartonianana* dehiscente. b) Semillas de *B. whartonianana*. c) Plántulas de *B. scandens* *in vitro*. d) Plántula (1-2 cm) de *B. scandens*. e) Plántula (3-4 cm) de *B. scandens*.

Fase de inducción de *Barkeria whartonianana*.

Se ha reportado en diferentes experimentos realizados en orquídeas, que el medio Murashige y Skoog (MS) favorece la obtención de respuestas morfológicas en comparación con otros medios de cultivo (Kishi y Takagi, 1997; Hernández *et al.*, 2001; Bhadra y Hossain, 2003: citados por Baltazar, 2004; Suárez, 2006) Tablas 3 y 4. Con base en estas observaciones se eligió el MS para realizar la fase de inducción de *B. whartonianana* y *B. scandens*.

A partir de la germinación de las semillas, se obtuvieron estructuras esféricas de color verde denominadas protocormos (Fig. 11a); una vez que los protocormos presentaron una fase de desarrollo más avanzada, caracterizada por presentar un diámetro de 5 mm y la presencia de primordios foliares (2 mm de longitud) (Fig. 11b), fueron empleados como explantes para inducirlos en medio con reguladores de crecimiento. Bajo condiciones

asépticas dentro de una campana de flujo laminar, los protocormos se colocaron en una caja de Petri para diseccionarse longitudinalmente.

Las secciones de protocormos, fueron sembradas en frascos de vidrio de 125 ml de capacidad conteniendo 25 ml de medio. Dos medios fueron usados: 1) sales inorgánicas y vitaminas del medio Murashige y Skoog (1962) (MS), 2 mg/L de glicina, 100 mg/L de inositol, 30 g/L de sacarosa (medio MS); y 2) el mismo medio pero con una reducción de las sales inorgánicas al 50%. Ambos medios fueron suplementados con antioxidantes: ácido ascórbico y ácido cítrico (50 mg/L c/u), carbono activado (1g/L) y distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: ANA y BAP (Fig. 10d). El pH del medio se ajustó a 5.7 utilizando un potenciómetro y soluciones de NaOH y HCl a 0.1, 0.5 y 1N. Posteriormente se agregó a los medios 3.7 g/L de gelrite. La siembra de los explantes se realizó colocando la superficie del corte del explante siempre en contacto con el medio de cultivo. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 16h/8h, luz/oscuridad. El material biológico se subcultivo cada 20 dds durante la fase de inducción. Se evaluó su crecimiento a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 dds de incubación, después de haber hecho la siembra. Se cuantificó con ayuda de un microscopio estereoscópico el número de regenerantes formados en cada tratamiento, calculando la media aritmética y su desviación estándar al final del tiempo de inducción con reguladores del crecimiento registrándolo en la tabla de resultados a los 180 dds.

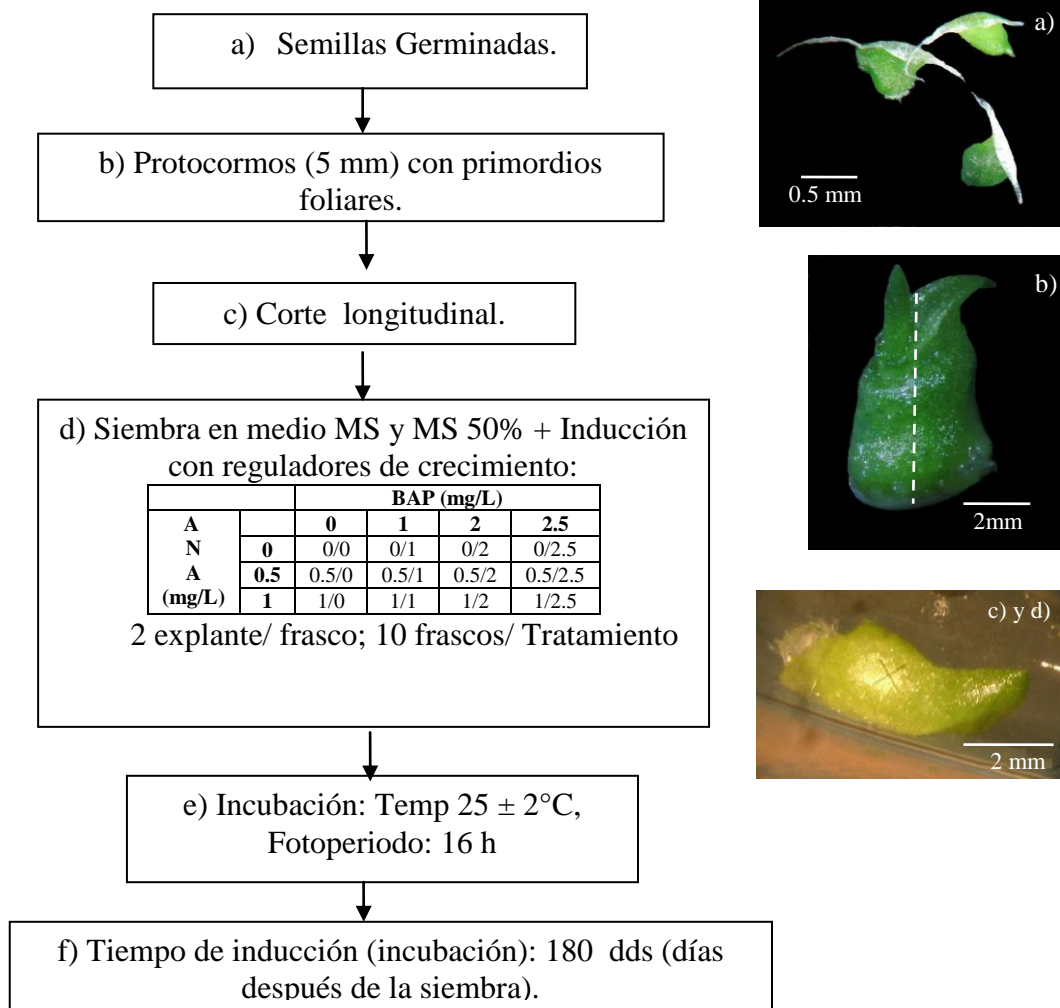


Figura 11. Inducción de una respuesta morfogénica a partir de secciones longitudinales de protocormos de *Barkeria whartonianana*, cultivadas *in vitro* en medio MS y MS 50%.

Fase de inducción de *Barkeria scandens*.

Bajo condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar a partir de plántulas de *B. scandens* obtenidas previamente mediante la germinación de semilla; se seleccionaron dos tipos: plántulas con 1-2 cm de altura (tipo A), y de 3-4 cm de altura (tipo B). Con ayuda de una espátula se colocaron en una caja de Petri en donde se procedió a seccionarlas obteniendo explantes de: 1) hoja (segmentos de 5 mm (tipo A) y 8 mm (tipo B), 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), 2) tallo (la porción que se escogió, fue la parte más próxima a la base del mismo, ya que aquí se encuentran yemas axilares o

meristemas laterales que dan origen a nuevos brotes, éstos midieron aproximadamente 5 mm (tipo A) y 10 mm (tipo B) y 3) ápices de raíz (se seleccionaron raíces de aproximadamente 5 mm (tipo A) y 8 mm (tipo B) en desarrollo y más próximas al tallo, tomando las porciones más distales, es decir, los ápices).

Los diferentes explantes (Fig. 12) se sembraron en frascos de vidrio de 125 ml de capacidad con 25 ml de medio, usando los mismos medios que en la fase de inducción de *B. whartonianana*. La siembra de los explantes se realizó colocando la superficie del corte del explante siempre en contacto con el medio de cultivo. El material biológico se subcultivó cada 20 d durante la fase de inducción. Se evaluó su crecimiento a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 d de incubación, después de haber hecho la siembra. Se cuantificó con ayuda de un microscopio estereoscópico el número de regenerantes formados en cada tratamiento, calculando la media aritmética y su desviación estándar al final del tiempo de inducción con reguladores del crecimiento registrándolo en la tabla de resultados a los 180 dds.

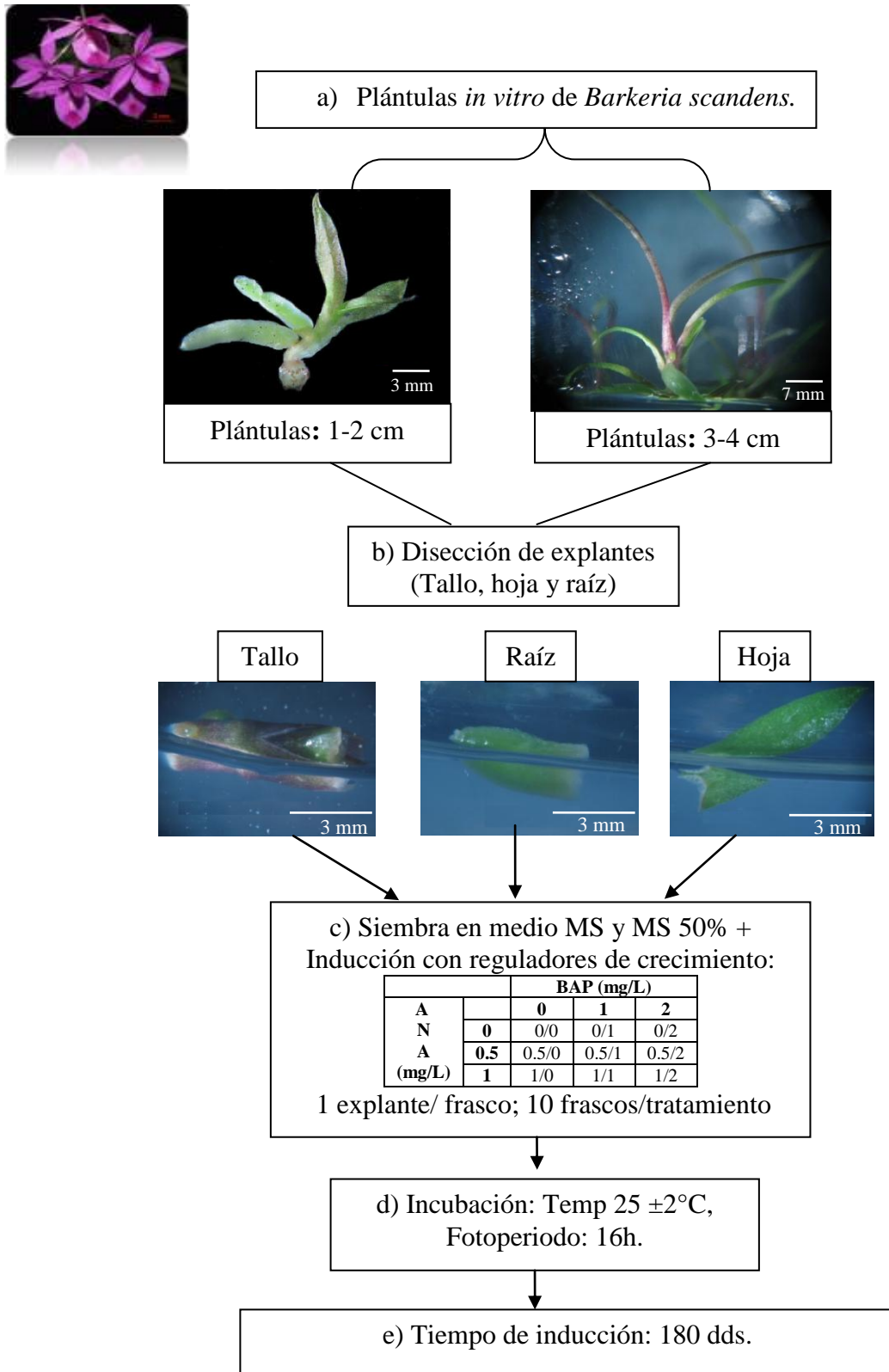


Figura 12. Inducción de una respuesta morfogénica a partir de secciones de tallo, raíz y hoja de *Barkeria scandens*, cultivados *in vitro* en medio MS y MS 50%.

Análisis estadísticos.

Para evaluar el número de PLB's formados por tipo de explante de ambas especies, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (*B. whartonia*) y de tres vías (*B. scandens*) con la prueba de Fisher de homogeneidad de varianzas y con un valor del 95% de intervalos de confianza, posteriormente se aplicó un análisis de Tukey (Statistica 8) para determinar las diferencias de medias estadísticamente significativas obteniendo el mejor tamaño, medio y tratamiento. También se calcularon los promedios del total de regenerantes por explante y tratamiento a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 dds, y el error estándar (únicamente a los 180 dds del periodo de cultivo *in vitro*). El análisis se realizó con ayuda del paquete estadístico Statistica-versión 8 (2007).

Fase de desarrollo e individualización.

Una vez concluida la etapa de inducción (después de 180 dds de cultivo) y con la finalidad de continuar con la respuesta generada, dentro de la Campana de flujo laminar se llevó a cabo la individualización de los regenerantes de cada especie. Con ayuda de pinzas de disección se tomaron las masas de material biológico y se colocaron en una caja de Petri estéril, se individualizaron y se subcultivaron en frascos con los mismos medios empleados en la fase de inducción, sin reguladores de crecimiento, con el propósito de que los regenerantes continuaran su crecimiento y desarrollo, hasta lograr la formación de plantas completas, esta fase se dio por concluida a los 90 días después del periodo de inducción.

Fase de aclimatización.

Se realizó un ensayo de aclimatización con dos lotes de 20 plantas para cada especie, obtenidas a partir de las secciones ensayadas, después de un periodo de 9 meses de cultivo *in vitro*. Las plantas regeneradas que presentaron una talla promedio de 8-10 cm de longitud, con 5-6 raíces bien desarrolladas, de un tamaño aproximado de 6-8 cm, con 5-6 hojas que median 3-4 cm de largo y 0.5-1 cm de ancho, se extrajeron de los frascos de cultivo con pinzas de disección, se enjuagaron cuidadosamente con agua destilada tibia para eliminar los restos de medio de cultivo adheridos en las raíces y así evitar una posible contaminación por hongos.

En los primeros 2 meses de aclimatización, las plántulas se colocaron en charolas de plástico transparente semi-herméticas (2 lotes de 20 plantas para cada especie), en una mezcla de peat-moss (musgo de turbera), corteza de pino y agrolita (proporción 2:2:1 v/v), previamente humedecida con agua destilada y esterilizada en autoclave por 21 minutos, 1.5 kg/cm² 121° C. El sustrato se colocó sobre las raíces de ambas especies. En esta etapa las plántulas se mantuvieron en el cuarto de aclimatización del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, UNAM a una temperatura de 20±5°C, y con el fotoperiodo natural de la Ciudad de México.

En la segunda etapa de aclimatización (tercer y cuarto mes) las plántulas se transfirieron a macetas con una mezcla de peat-moss, corteza de pino, agrolita y tepojal (proporción 1:1:1:2 v/v) y fueron llevadas al invernadero.

Los riegos en la primera etapa y segunda etapa de aclimatización se realizaron de manera espaciada; cuando las plántulas de *B. whartoni* y *B. scandens* se mantuvieron en charolas semi-herméticas el riego se realizó una vez por semana; una vez ya en macetas y expuestas en el invernadero el riego fue más frecuente (cada 2 días).

Análisis estructural de los regenerantes.

Se tomaron muestras de los regenerantes formados a partir de los explantes utilizados para la regeneración *in vitro* de *B. scandens* y *B. whartoni* a partir de los 60 hasta 120 d de su cultivo, para realizar un estudio estructural de los mismos con la finalidad de determinar la identidad de las estructuras desarrolladas y corroborar la vía morfogénica obtenida.

El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo al método de Sandoval (2005):

Obtención de las muestras. Se tomaron tanto muestras de explantes de *B. scandens* como de *B. whartoni*, considerando aquellas que presentaran regenerantes en distintas etapas de desarrollo.

Fijación. Se utilizó el fijador Navashin, colocándose las muestras en una solución de Navashin A y B, en proporción 1:1 durante 24 h en agitación constante, para después lavar las muestras con agua corriente durante 2 h.

Deshidratación. Se colocaron los tejidos en una serie gradual de soluciones agua-alcohol etílico-alcohol butílico terciario (TBA), en las siguientes concentraciones 35%, 50%, 60%,

70%, 85%, 95%, 100 v/v y TBA absoluto, en este último se realizaron tres cambios. Las muestras se dejaron 12 h en cada una de las concentraciones señaladas a excepción del TBA absoluto, en esta solución se dejaron 24 h.

Infiltración. Se realizó en una mezcla de TBA absoluto y parafina en partes iguales, las muestras se dejaron en frascos con una cantidad de TBA absoluto que las cubriera, y posteriormente se agregaron escamas de parafina. Las muestras se colocaron en estufa a una temperatura de 50°C, en donde se siguieron agregando escamas de parafina cada 30 min, hasta duplicar el volumen inicial. Los frascos se dejaron destapados con las muestras dentro de la estufa para que se evaporara el TBA y se eliminó la parafina restante 24 h después. Las muestras se colocaron dentro de la estufa con parafina pura durante 48 h más.

Inclusión. Se realizó en bloques de parafina pura, las muestras fueron colocadas en cajas de papel encerado de 1-2 cm, tratando de centrarlas de manera que éstas quedaran en vista longitudinal (en aquellas donde se apreciaba una orientación polar), posteriormente se agregó parafina pura líquida hasta cubrirlas completamente.

Cortes estructurales. Los bloques de parafina con las muestras se adhirieron sobre cubos de madera con la finalidad de que éstos dieran soporte. Se realizaron los cortes estructurales de 7 µm de grosor con un micrótomo de rotación American Optical 820. Se utilizó un baño de flotación que se mantuvo a una temperatura de 45°C, al cual se agregó un poco de grenetina hasta que ésta se disolvió completamente; para adherir los cortes histológicos obtenidos a portaobjetos, éstos se dejaron secar durante 24 h.

Desparafinación. Los portaobjetos se colocaron con las secciones histológicas en canastillas de metal para posteriormente introducirlas en la estufa a 60°C durante 30 min para que las muestras se desparafinaran.

Rehidratación. Las preparaciones se sacaron de la estufa y se colocaron durante 30 min en una solución de xileno puro y 20 min en una solución de xileno-alcohol absoluto en proporción 1:1 v/v, para posteriormente rehidratar las preparaciones en una serie gradual de alcoholes en orden decreciente durante 15 min en cada una de las siguientes concentraciones: alcohol absoluto, 95%, 70%, 50%, 30% v/v y finalmente se dejaron en agua destilada por 10 min.

Tinción. Se realizó una doble tinción con safranina O – verde rápido, dejando las muestras en safranina durante 24 h, posteriormente se lavaron con agua destilada y se deshidrataron

con una serie gradual de alcoholes en concentraciones de 30%, 50%, 70% y 95% v/v durante 3 min en cada uno. Se colocó verde rápido en cada una de las muestras durante 30 min; se realizaron dos cambios de alcohol absoluto durante 2 min cada uno; se agregó aceite de clavo durante 8 min y se enjuagó con xilol durante 3 min.

Montaje. Se agregó resina sintética sobre la muestra y se colocó un cubreobjetos sobre ésta. Las preparaciones se dejaron secar durante 21 d en un horno a 60°C.

Limpieza, etiquetado y toma de fotomicrografías. Se limpiaron las preparaciones con ayuda de una navaja de afeitar y un trapo de algodón, para eliminar los restos de colorante y resina sintética. Los portaobjetos se etiquetaron con los siguientes datos: Nombre de la especie, Familia a la que pertenece, tipo de corte, estructura, tipo de tinción, nombre del procesador y fecha de elaboración de la muestra. Concluido el etiquetado, se llevaron a cabo las observaciones y toma de fotomicrografías de las muestras con un microscopio Carl-Zeiss-Axioskop.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Desinfección del Material biológico.

El tiempo sujeto a refrigeración del fruto dehiscente de *B. whartoni* aparentemente no afectó la viabilidad de las semillas, en la literatura no hay registro sobre el tiempo de viabilidad de las semillas para el género *Barkeria*. Martínez (1991) recomendó sembrar las semillas inmediatamente después de su colecta, sobre todo cuando se desconoce la duración del estado de latencia de las semillas y los factores para mantenerlas por un periodo de tiempo más largo. En cuanto al método de desinfección éste resultó eficiente, debido a que se logró establecer el cultivo *in vitro*, sin presentarse problemas de contaminación.

Martínez (1985) logró establecer *in vitro* semillas de *Bletia urbana*, empleando una solución al 7% de hipoclorito de Calcio y dos lavados con agua destilada estéril.

Mata *et al.* (2011), obtuvieron resultados similares, al almacenar semillas de *Oncidium tigrinum* provenientes de una cápsula madura, durante 15 d en refrigeración a una temperatura de 5 °C antes de su uso, registrando un 100% de germinación.

Germinación asimbiótica de semillas de *Barkeria whartoni*.

Se logró la germinación asimbiótica de *B. whartoni* en medio MS, registrándose un 90% de germinación a los 60 dds. Las primeras semillas que germinaron, lo hicieron a 23-25 dds. Se realizó un seguimiento y descripción de las etapas de desarrollo durante un mes (Fig. 13).

Durante los primeros 5 dds, se observó un cambio en las semillas, notando que éstas se hidrataron, y la testa cambió de un color blanquecino a un tono translúcido, evidenciando la presencia del embrión, que tenía un color café; 8 dds se observó un hinchamiento del embrión, éste tenía una forma globular compacta, posteriormente la coloración del embrión cambió de un tono café a un amarillo pálido, a los 18 dds adquirió un color verde claro. Posterior a este cambio de coloraciones y aumento del tamaño, el embrión rompió la testa y emergió 5 d después (23-25 dds), mostrando un color verde intenso. La coloración verde del embrión indicó la presencia de clorofila y por lo tanto de cloroplastos, confirmándose la germinación. A los 30 dds, el embrión desarrolló una región apical, característica por una protuberancia a los 37 dds se desarrollaron los primordios foliares, en la región basal se formaron rizoides, que entre los 40-50 dds desaparecieron para dar lugar a la(s) raíz(es) primaria(s).

En estudios *in vitro* de orquídeas, cuando la semilla germina, emerge un embrión (protocormo) constituido en la parte superior por células pequeñas con un núcleo prominente formando el meristemo apical y en la parte basal existen grandes células parenquimatosas que funcionan como un reservorio orgánico (Batygina *et al.*, 2003). Manteniendo las condiciones *in vitro*, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas ó meses dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas. La germinación de las semillas de *B. whartoni* (Fig. 13) sigue el desarrollo descrito para otras especies de orquídeas, según Arditti (1967) y Harley (1969) y descrito de la siguiente forma:

(b) El embrión absorbe agua a través de la testa, aumentando de volumen. Después se inicia la división celular, el embrión rompe la testa. (c) A continuación se forma una estructura de tipo protocormo, a partir del agregado de células, y sobre aquél se puede distinguir un ápice (meristemo del vástago). (d) Luego se diferencian los órganos (ápice del vástago en un lado y rizoides en el opuesto), comenzando un período de crecimiento intenso.

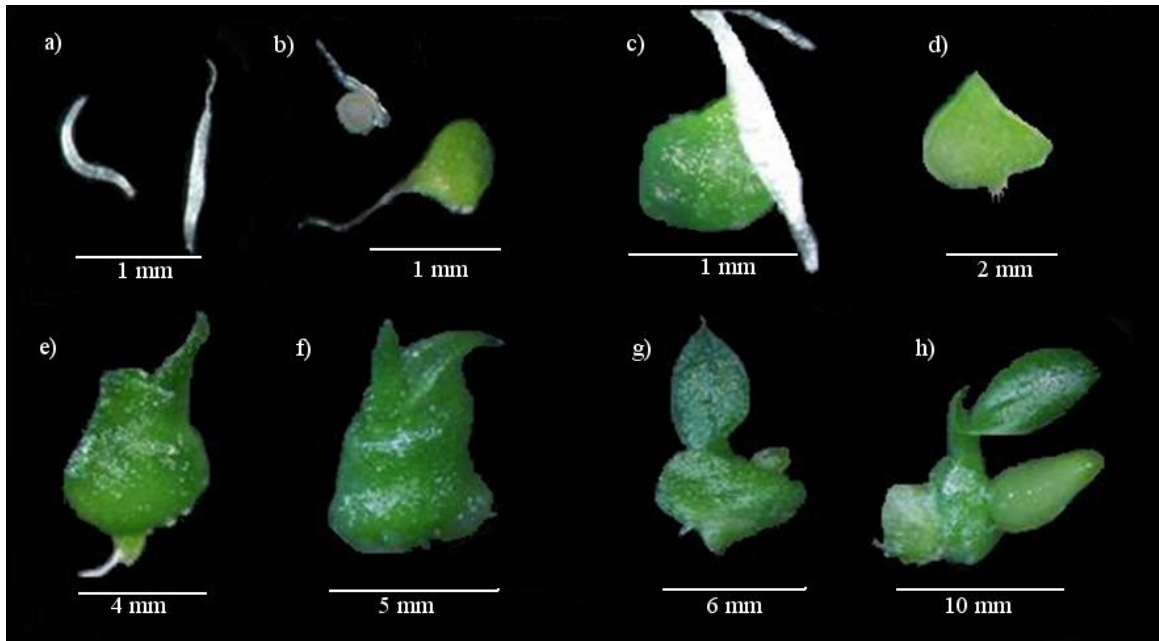


Figura 13. Etapas del desarrollo de la germinación de *B. whartonianana*: a) semillas de *B. whartonianana*, antes de la inoculación, b) hidratación de las semillas (imbibición) y rompimiento de la testa; a los 18 dds, c) el embrión comienza a emerger a los 25 dds, d) protocormo con rizoides emergiendo a los 30 dds, e) y f) protocormos con sus primordios foliares y raíz inicial o aún con rizoides, a 37 dds, g) y h) protocormos con hojas y primera raíz; 40-45 dds.

(e y f) Si el protocormo está expuesto a la luz, adquiere el color verde y al mismo tiempo desarrolla hojas. (g) Luego se forman las raíces. (h) Por lo tanto, el protocormo y los rizoides pierden su misión nutritiva, por lo que éstas estructuras dan lugar a lo que constituye una plántula completa con sus primordios foliares y sus raíces.

En los cultivos del presente estudio se observó este comportamiento, apreciándose una hidratación y aumento del tamaño de las semillas (Fig. 13). Después de 35-37 d de iniciados los cultivos, se observó en el protocormo la formación de hojas en la parte apical, y en la parte basal, la aparición de la raíz, el resultado demostró la utilidad de emplear el medio MS para lograr una respuesta favorable en la germinación.

Para la germinación *in vitro* de orquídeas diversas formulaciones de medios de cultivo pueden ser usadas, en algunos casos, un medio simple, como KCM y algunos otros como el MS han promovido una rápida y eficiente germinación. Vaasa y Rosenberg (2004), De la Cruz (2006), Suárez (2006), Mata *et al.* (2011) mencionan que el medio MS ha sido utilizado con éxito en un amplio número de especies. Pedroza (2009) obtuvo resultados positivos en la germinación *Epidendrum elongatum* en medio MS, Shu-Fung *et al.* (2004)

también lograron la germinación asimbiótica de *Dendrobium tosaense* en ese medio, Mata *et al.* (2011), obtuvieron la germinación *in vitro* de *Oncidium trigrinum* en el mismo medio adicionado con carbón activado 1g/L.

La germinación puede ser potenciada añadiendo carbón activado que probablemente inhiba el efecto de sustancias fenólicas o con indefinidos compuestos orgánicos que enriquecen al medio con vitaminas o carbohidratos (Ichihashi, 1992; Mata- Rosas and Salazar- Rojas, 2009; Pedroza and Mican, 2006; Thompson *et al.*, 2006; Mata *et al.*, 2011).

En estudios de propagación *in vitro*, especialmente cuando se trata de conservar especies en peligro de extinción, las semillas son el explante más comúnmente usado y recomendado, porque éstas tienen una gran capacidad regenerativa y son un recurso de gran diversidad genética (Ramsay and Dixon, 2003).

Fase de inducción en *Barkeria whartonia*.

La inducción en MS 50% y MS, fue la misma respecto al crecimiento y desarrollo de los PLB's, sin embargo fue más abundante la formación de éstos en medio MS, razón por la cual se eligió dicho medio de cultivo para representar gráficamente los cambios morfológicos observados (Fig. 14).

El primer cambio perceptible fue un aumento de tamaño, y la presencia de rizoides en la base del explante que estaba en contacto con el medio de cultivo. (Fig. 14b) A los 50 dds, la región en donde se comenzó a apreciarse un crecimiento celular fue hacia la parte basal del explante; además estaba hidratado con una apariencia succulenta, de color verde-amarillenta. Posteriormente, se observó una apariencia nodular en la base del explante siendo evidente a partir de los 60 dds, la coloración pasó de un verde-amarillento a un verde intenso, cabe mencionar que en esta etapa, en algunos explantes de los diferentes tratamientos se comenzaron a formar PLB's; sin embargo no eran muchos, por lo que este periodo estuvo muy marcado por la apariencia nodular del nuevo tejido. (Fig. 14d) A los 80-90 dds, los nódulos formados mostraron un cambio en su tamaño y morfología, éstos comenzaron a adquirir una forma redondeada, semejante a PLB's (Protocorm Like Bodies por sus siglas en ingles) que surgieron de manera directa del explante sin pasar por la formación de callo. (Fig. 14e) En esta etapa y en algunos PLB's se pudo observar la aparición de un primordio foliar en la región apical del brote, la coloración de los PLB's

fue un verde claro. (Fig. 14f) A los 150 dds, era evidente el crecimiento de los PLB's formados, éstos se alargaron y desarrollaron más hojas (1 a 2) con longitudes muy variables desde 3 mm hasta 8 mm, además tomaron diferentes coloraciones, desde verde hasta tonos morados-violeta, característicos de la especie.

La formación de PLB's, fue una producción primaria, es decir, los PLB's registrados, una vez concluida la etapa de expresión (150-180 dds), continuaron su desarrollo, sin observarse una segunda generación de PLB's. Por lo que la etapa de expresión se dio por concluida, cuando los PLB's continuaron su desarrollo hacia plántulas, formando con el paso del tiempo más hojas y raíces sin la formación de nuevos regenerantes. Cabe mencionar que durante la fase de inducción los PLB's permanecieron unidos al explante; sin embargo éstos eran fácilmente disgregables del explante original, lo cual facilitó su posterior individualización.

La respuesta morfogénica durante el cultivo *in vitro* de los explantes ensayados varió en cuanto al número de PLB's formados, así como en la velocidad de formación, por lo que es posible que esta respuesta haya estado influenciada tanto por el medio de cultivo como por la concentración de reguladores del crecimiento (Tablas 7 y 10). La formación de los PLB's fue asincrónica. La región en la cual comenzó y ocurrió una mayor diferenciación y crecimiento de los PLB's, fue hacia los bordes del explante, en la parte donde se hizo la disección, siendo muy evidente la formación de los nuevos individuos hacia la parte basal del explante mientras que hacía la zona donde no se realizó ningún daño, el explante no mostró cambios en su morfología (Fig. 15).

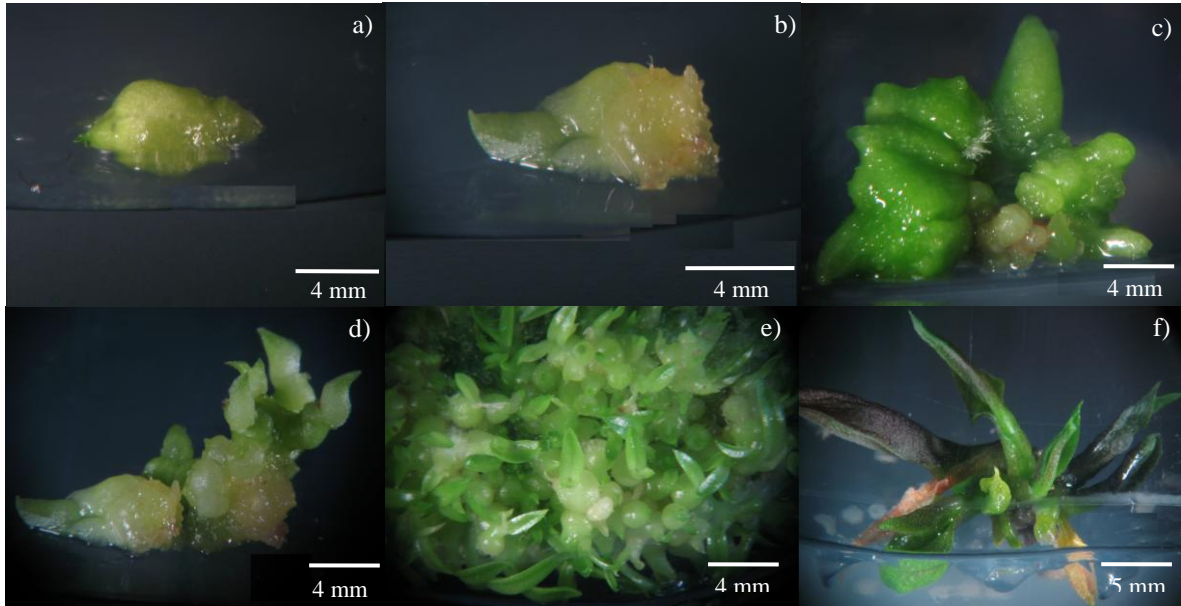


Figura 14. Respuesta morfofenética a partir del cultivo *in vitro* de secciones longitudinales de protocormos de *B. whartonia* en medio MS en combinación con 1mg/L ANA y 1 mg/L BAP. a) Explante a los 20 dds. b) Hinchamiento del explante y presencia de rizoides a los 50 dds. c) Desarrollo de nódulos en la superficie del explante a los 60 dds. d) Formación directa de PLB's a partir del explante, a los 80-90 dds. e) Formación de primordios foliares en la parte apical de los PLB's, mostrando PLB's en diferentes estadios de desarrollo, a 90 dds. f) Elongación de las plántulas 150 dds.

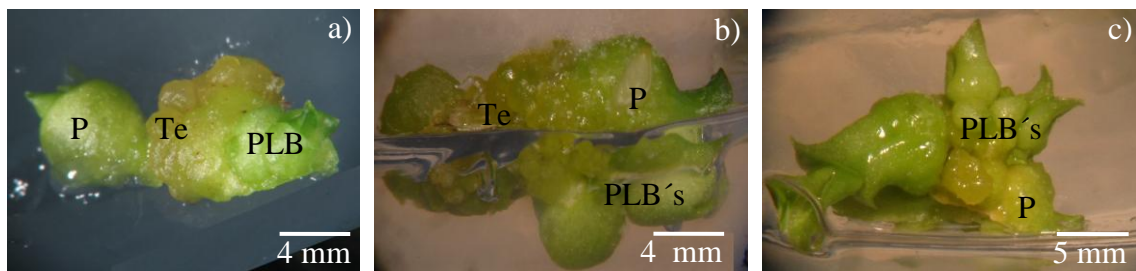


Figura 15. Formación directa y asincrónica de PLB's en *Barkeria whartonia* a partir de secciones longitudinales de protocormos cultivados *in vitro* en medio MS 50% en combinación con 1/1 ANA/BAP mg/L. a) Inicio de formación de PLB's (masas embriogénicas) emergiendo directamente del explante de protocormo a los 60 dds. b) Producción de PLB's en diferentes etapas de desarrollo a los 80 dds. c) Producción de PLB's en diferentes etapas de desarrollo a los 90 dds. Abreviaturas: P= Explante de Protocormo, Te= Tejido embriogénico, PLB's= Protocorm Like Bodies.

Lo anterior, se puede explicar en parte porque hacia los bordes del explante las células más externas son las que están en contacto directo con los nutrientes y reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo, en comparación con las células de la zona central del explante, en donde la competencia por el espacio y los nutrientes podría ser

mayor y el crecimiento y desarrollo tal vez son más lentos. Es posible que en la zona de corte tenga un balance apropiado de nutrientes, reguladores de crecimiento, atmósfera y que la población de células epidérmicas y subepidérmicas junto con parenquimáticas hayan expresado su respuesta ante el corte. Baltazar (2004), quien cultivó mitades de protocormos de *Oncidium tigrinum*, reportó la formación de los primeros PLB's a partir de la zona disectada del explante que estaba en contacto directo con el medio de cultivo o bien a partir de la región epidérmica del mismo.

Al analizar el conjunto de los tratamientos (medio de cultivo y concentración de reguladores del crecimiento) después de 180 días de inducción para la formación de PLB's, se pudo establecer diferencia significativa ($p > 0.001$).

En la mayoría de los explantes cultivados en medio MS 50%, la respuesta fue menor (Fig. 16a, b y c), respecto a los cultivos en medio MS donde se observó una mayor formación de PLB's por explante (Fig. 16d, e y f) Tabla 9.

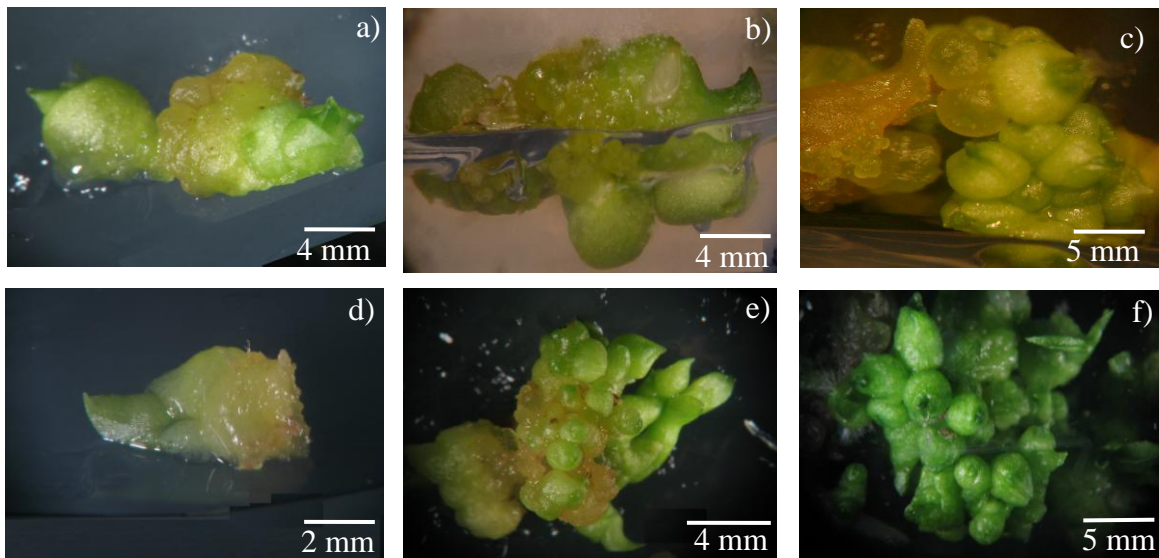


Figura 16. Resultados a los 50, 80 y 120 días de iniciados los cultivos. a, b y c) formación de PLB's vía directa en *Barkeria whartoniiana* a partir de secciones longitudinales de protocormos cultivadas *in vitro* en medio MS 50%. d, e y f) Formación directa de PLB's a partir de secciones longitudinales de protocormos en medio MS en los mismos tiempos.

La Tabla 5 muestra la formación de PLB's en ambos medios de cultivo a los 60 días, el mayor número de PLB's se formó en el tratamiento 1/1 en medio MS con un promedio de 5 PLB's/ explante, las combinaciones en las cuales no se obtuvo ningún regenerante fue en el

control (0/0) y 0.5/0 ANA/BAP mg/L en MS 50%. A este tiempo de inducción se apreció una mayor formación de PLB's en medio MS en comparación del medio MS 50%.

A 30 dds, los explantes de protocormo en ambos medios de cultivo permanecieron con el mismo aspecto y coloración, por lo que no se observaron cambios morfológicos que demostraran algún tipo de respuesta. A los 60 dds era evidente un cambio en el aspecto de los explantes, éstos tendieron a perder color, cambiaron de un verde intenso, a un verde más pálido, y en su periferia, justo en la región basal del explante en donde se realizó el corte emergió tejido, posiblemente embriogénico, que a los 65 dds constituyó a los PLB'S, éstos se encontraban bien consolidados, y mostraron una mejor organización en su estructura que los que emergieron de manera opuesta.

Tabla 5. PLB's generados a partir de secciones longitudinales de protocormos de *Barkeria whartonia*. n=20

Tratamiento ANA/BAP (mg/l)	60 días de cultivo			
	MS 50%		MS	
	No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante.	No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante.
0/0	0	0	6	0.3
0/ 1.0	20	1	20	1
0/ 2.0	24	1.2	30	1.5
0/ 2.5	19	0.95	21	1.05
0.5/0	0	0	11	0.55
0.5/ 1.0	21	1.05	32	1.6
0.5/2.0	41	2.05	44	2.2
0.5/2.5	13	0.65	27	1.35
1/0	8	0.4	16	0.8
1.0/ 1.0	54	2.7	100	5
1.0/2.0	21	1.05	51	2.55
1.0/2.5	13	0.65	32	1.6

A los 90 dds los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento ANA/BAP 1/1 mg/L, con un promedio de 25.6 PLB's en medio MS. El menor número de PLB's registrados para ambos medios se obtuvo en el control con un promedio de 0.3 y 0.65 PLB's (Tabla 6). En esta etapa del cultivo, muchos protocormos ya tenían bien desarrollados los primordios foliares. Cabe mencionar que en el tratamiento 0/2.5 los PLB's tendían a hiperhidratarse y a formar PLB's con una elongación anormal, con hojas alargadas, desproporcionadas con respecto al tamaño de la región basal, probablemente debido a una alta concentración de citocininas y/o a la exposición de luz.

Tabla 6. PLB's generados, a partir de secciones longitudinales de protocormos de *Barkeria whartonia* n= 20

Tratamiento ANA/BAP (mg/l)	90 días de cultivo			
	MS 50%		MS	
	No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante.	No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante.
0/0	6	0.3	13	0.65
0/ 1.0	48	2.4	42	2.1
0/ 2.0	57	2.85	86	4.3
0/ 2.5	38	1.9	57	2.85
0.5/0	9	0.45	19	0.95
0.5/ 1.0	67	3.35	123	6.15
0.5/2.0	102	5.1	201	10.05
0.5/2.5	37	1.85	98	4.9
1/0	21	1.05	87	4.35
1.0/ 1.0	115	5.75	512	25.6
1.0/2.0	96	4.8	187	9.35
1.0/2.5	45	2.25	89	4.45

A los 120 dds fue aún más evidente el aumento de PLB's en medio MS, que los cultivados en MS 50%, en el tratamiento ANA/BAP 1/1 mg/L prevaleció el mayor número de PLB's, con un promedio de 36 PLB's/explante en medio MS. El menor número de PLB's se obtuvo en el control con un promedio de 0.5 y en el tratamiento 0.5/0 con 0.7 PLB's/explante en medio MS 50% (Tabla 7).

Tabla 7. PLB's generados, a partir de secciones longitudinales de protocormos de *Barkeria whartonia* n=20

Tratamiento ANA/BAP (mg/L)	120 días de cultivo			
	MS 50%		MS	
	No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante.	No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante.
0/0	10	0.5	21	1.05
0/ 1.0	67	3.35	89	4.45
0/ 2.0	81	4.05	117	5.85
0/ 2.5	54	2.7	84	4.2
0.5/0	14	0.7	28	1.4
0.5/ 1.0	121	6.05	210	10.5
0.5/2.0	215	10.75	414	20.7
0.5/2.5	132	6.6	156	7.8
1/0	44	2.2	112	5.6
1.0/ 1.0	300	15	720	36
1.0/2.0	207	10.35	390	19.5
1.0/2.5	99	4.95	108	5.4

A los 150 dds la mayor formación de PLB's se obtuvo en 1/1 mg/L en medio MS con un promedio de 43.25 PLB's/ explante. El menor número de PLB's se obtuvo en el control con un promedio de 0.8 y en 0.5/0 mg/L con 1.05 PLB's/ explante en medio MS 50%. De manera general, de acuerdo a las concentraciones de reguladores del crecimiento añadidas al medio de cultivo (MS 50 y MS), se observó una tendencia en la formación de PLB's, por ejemplo, en el tratamiento control de ambos medios de cultivo se obtuvo una mínima formación de PLB's (lo que sugiere que el explante por sí sólo demuestra sus capacidades regenerativas), en comparación del resto de los tratamientos que contenían uno o dos reguladores del crecimiento (Tabla 8).

Tabla 8. PLB's generados, a partir de secciones longitudinales de protocormos de *Barkeria whartonian* en medio MS 50%. n=20

Tratamiento ANA/BAP (mg/L)	150 días de cultivo			
	MS 50%		MS	
	No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante.	No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante.
0/0	16	0.8	32	1.6
0/ 1.0	86	4.3	198	9.9
0/ 2.0	135	6.75	201	10.05
0/ 2.5	75	3.75	135	6.75
0.5/0	21	1.05	43	2.15
0.5/ 1.0	315	15.75	328	16.4
0.5/2.0	449	22.45	549	27.45
0.5/2.5	210	10.5	217	10.85
1/0	67	3.35	221	11.05
1.0/ 1.0	508	25.4	865	43.25
1.0/2.0	326	16.3	540	27
1.0/2.5	139	6.95	191	9.55

Al analizar el efecto del conjunto de todos los tratamientos ensayados a 180 dds para la formación de PLB's, se logró establecer diferencias significativas ($p > 0.001$) para cada tratamiento ensayado (ANA/BAP).

De acuerdo con la Tabla 9 y Gráf. 1, los tratamientos en los cuales se logró la mayor formación de PLB's por explante fueron en medio MS adicionados con 1/1 y 0.5/2 mg/L donde se indujo un promedio de 48.45 ± 0.22 y 34.75 ± 0.17 PLB's por explante respectivamente. En el caso opuesto la menor capacidad regenerativa se obtuvo en medio MS 50% tanto en el medio sin reguladores de crecimiento como en el medio con 0.5 mg/L de ANA en ausencia de BAP, los PLB's regenerados a partir de estos tratamientos tuvieron

una apariencia similar a protocormos, sin embargo, cuando la concentración de BAP se encontraba en 2.5 mg/L en ausencia de ANA los PLB's tendieron a presentar modificaciones en su estructura morfológica, como un aumento del tamaño; tallos y hojas muy alargados, e inclusive desproporcionados, además de que tendían a hidratarse en exceso, y los tejidos mostraban una coloración verde cristalizado (hiperhidratados).

Tabla 9. PLB's generados, a partir de secciones longitudinales de protocormos de *Barkeria whartonia*. n=20

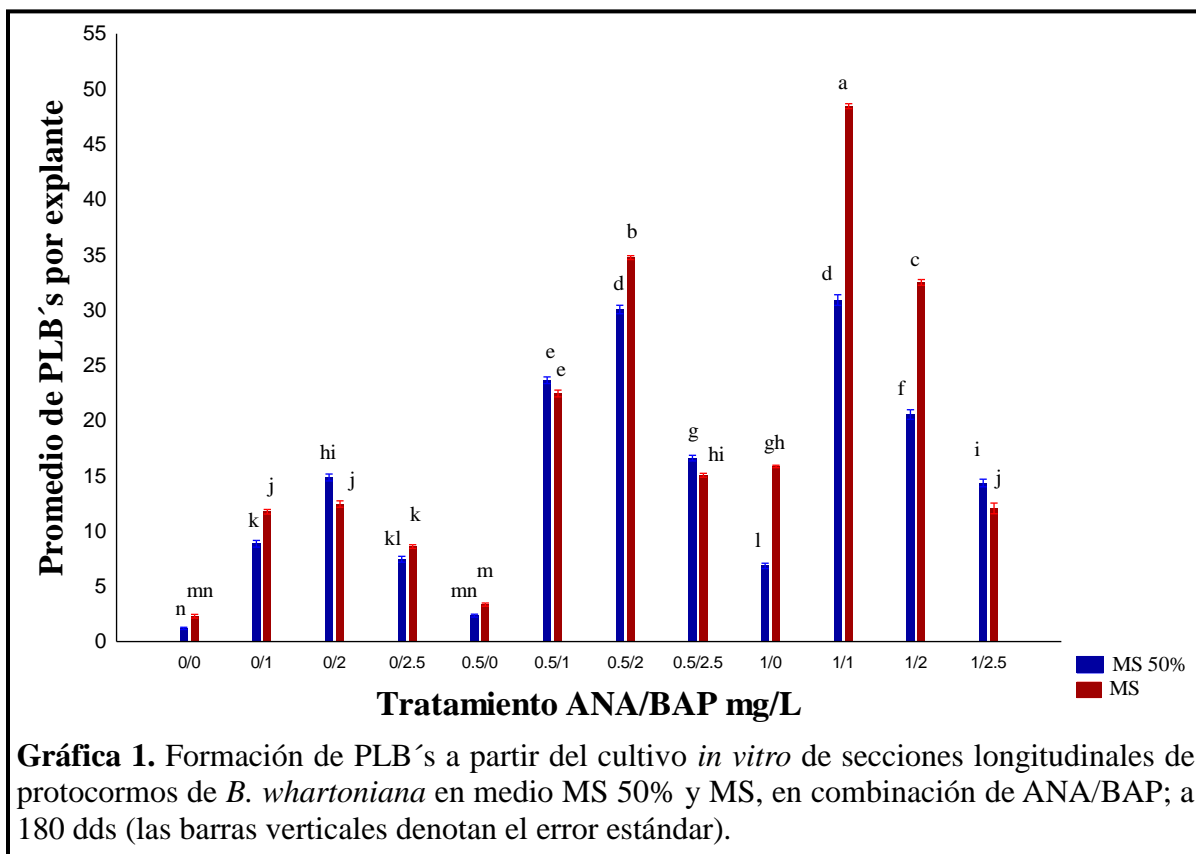
Medio	Tratamiento hormonal ANA/ BAP mg/l	180 días de cultivo.	
		No. Total de PLB's	Promedio de PLB's por explante ± E.E.
MS 50%	0/0	24	1.2 ± 0.09 ⁿ
	0/ 1.0	117	8.9 ± 0.30 ^k
	0/ 2.0	297	14.9 ± 0.31 ^{hi}
	0/ 2.5	149	7.5 ± 0.26 ^{kl}
	0.5/0	47	2.4 ± 0.13 ^{mn}
	0.5/ 1.0	473	23.7 ± 0.30 ^e
	0.5/2.0	601	30.1 ± 0.38 ^d
	0.5/2.5	332	16.6 ± 0.25 ^g
	1/0	137	6.9 ± 0.24 ^l
	1.0/ 1.0	618	30.9 ± 0.48 ^d
	1.0/2.0	441	20.6 ± 0.43 ^f
	1.0/2.5	287	14.4 ± 0.34 ⁱ
MS	0/0	46	2.30 ± 0.16 ^{mn}
	0/ 1.0	235	11.75 ± 0.20 ^j
	0/2	249	12.45 ± 0.29 ^{lj}
	0/ 2.5	172	8.60 ± 0.16 ^k
	0.5/0	67	3.35 ± 0.15 ^m
	0.5/ 1.0	449	22.45 ± 0.31 ^e
	0.5/2.0	695	34.75 ± 0.17 ^b
	0.5/2.5	301	15.05 ± 0.16 ^{hi}
	1/0	317	15.85 ± 0.10 ^{gh}
	1.0/ 1.0	969	48.45 ± 0.22 ^a
	1.0/2.0	660	32.50 ± 0.25 ^c
	1.0/2.5	241	12.05 ± 0.48 ^j

Nota: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

E.E. = Error Estándar.

Simultáneamente y de manera general, los resultados con los valores numéricos más bajos registrados, se obtuvieron cuando en el medio de cultivo: a) existió una concentración de ANA pero sin BAP; b) una concentración de BAP pero sin ANA, a excepción del

tratamiento 0/2, donde se obtuvo un valor de 14.9 ± 1.38 en medio MS 50% y 12.45 ± 0.29 en MS, valores relativamente altos. En cuanto a apariencia se refiere, éstos presentaron una morfología bien desarrollada sin anomalías, lo que pareció demostrar que para esta especie el empleo de esta concentración no alteró estructuralmente a los PLB's.



Los resultados se asemejan a lo reportado en la literatura, reiterando que un desequilibrio en los reguladores de crecimiento, repercutirá en la formación y producción de PLB's por explante, por lo tanto; bajas concentraciones de auxinas y citocininas o nulas concentraciones de auxina y muy altas concentraciones de citocinina podrían inhibir el proceso de embriogénesis somática, mientras que un equilibrio en las concentraciones de reguladores del crecimiento, o una mayor concentración de citocinina que de auxina, podrían permitir la formación de embriones somáticos.

Por otra parte, los explantes por si sólo, tienen cierta capacidad regenerativa, que se vió reflejada en la producción de PLB's en el control (0/0), probablemente, y como se demostró

necesitan de un estímulo de reguladores de crecimiento exógeno, para potenciar la regeneración de PLB's (Tabla 9).

Los protocormos derivados de semillas de orquídeas fueron un importante fuente de explante para los propósitos de este estudio, pues se sabe que las semillas son el material de diversidad genética por excelencia que se debe de tomar en cuenta cuando se requiere recuperar especies que se encuentran amenazadas, pues garantiza una estabilidad y diversidad genética (Marínez, 1985).

En la presente investigación, aun cuando se utilizó la misma técnica de cultivo, los resultados fueron diferenciales, ya que al adicionar al medio de cultivo reguladores de crecimiento, tanto auxinas como citocininas, pareció tener un efecto sinérgico que promovió la producción de PLB's y la carencia de alguno de estos reguladores disminuyó la respuesta final.

Se ha reportado que la interacción de auxinas y citocininas es necesaria para inducir la división celular y el crecimiento en el cultivo de los tejidos vegetales (Skoog y Miller, 1957; citados por Gaspar *et al.*, 2003). Existen varios reportes en la literatura que concuerdan parcialmente con los resultados obtenidos en esta investigación: Suárez (2006): cultivo explantes de protocormos en MS con diferentes tratamientos con reguladores de crecimientos y obtuvo el mejor resultado en explantes apicales de protocormos en concentración hormonal de ANA/ BAP 1:1 mg/L con un total de 440 PLB's y un promedio de 11 ± 9.55 por explante, no obstante para el caso de explantes basales, obtuvo un mayor número en medio MS bajo la acción de 1 mg/L de BAP sin auxina, con un total de 1323 PLB's. Por su parte Martínez (1985), quién utilizó explantes de protocormos de *Bletia urbana*, obtuvo los mejores resultados en la producción de brotes directamente del explante sin pasar por la etapa de PLB's al usar únicamente BAP; la mejor respuesta la obtuvo en la concentración de 15 μ M BAP (3 mg/L de BAP), dando un total de 137 plántulas por 20 protocormos seccionados a las 20 semanas de cultivo *in vitro*. Baltazar (2004), reportó la formación de PLB's en medio MS a partir del cultivo *in vitro* de protocormos enteros de *Oncidium tigrinum* en los tratamientos con bajas concentraciones de ANA, señaló que los tratamientos que presentaron 0.1/ 1 y 0.1/0.5 mg/L de ANA/BAP se logró la mayor formación de PLB's y cuando la citocinina no estuvo presente en el medio, la cantidad de

PLB's fue menor, demostrando en su investigación la importancia de la interacción entre ANA y BAP sobre la producción de PLB's.

No obstante, como se muestra en la gráfica 1, el medio de cultivo fue un factor muy importante en la producción de PLB's; en los explantes de *B. whartonianana* cultivados en medio de MS se propició o potenció aún más la producción de PLB's que en los cultivados en MS 50%, debido a una alta concentración de iones (95.75 mM) entre ellos, nitrato de amonio ((NH₄)NO₃) y nitrato de potasio (KNO₃) (George, 1993) requeridos para procesos fisiológicos indispensables que propician la formación de biomasa de *novo*. Arditti y Ernst (1984) mencionan que el crecimiento *in vitro* en orquídeas puede estar correlacionado con la proporción de nitrógeno usado en el medio de cultivo.

En varios estudios, en los cuales se han empleado diversos medios de cultivo, el MS resultó ser mejor, al favorecer la producción de embriogénesis somática y/u organogénesis (Bhadra y Hossain, 2003; Geetha y Shetty, 2000; Hernández *et al.*, 2001; Kishi y Takagi, 1997). Santos y Carranza (2009), lograron inducir la producción de PLB's a partir de callo proveniente de protocormos de *Encyclia mariae*, cultivados en medio MS, Mata *et al.* (2011), exploraron la respuesta regenerativa de explantes de protocormo de *Oncidium tigrinum* en dos medios de cultivo; MS y KCM, interaccionando con reguladores del crecimiento, obteniendo una mayor formación de brotes/PLB's en MS.

En esta investigación, la respuesta morfogénica de protocormos no fue la excepción, ya que a partir de protocormos fue posible generar un gran número de PLB's de *B. whartonianana*.

Fase de inducción *Barkeria scandens*.

En los explantes de hoja y tallo de *B. scandens*, se logró la inducción de PLB's. En el caso de los explantes de raíz la respuesta morfogénica fue nula.

A los 30 dds en ninguno de los explantes de *B. scandens*, se observaron cambios que demostraran algún indicio de respuesta morfogénica; sin embargo la oxidación estuvo presente a lo largo de la fase de inducción.

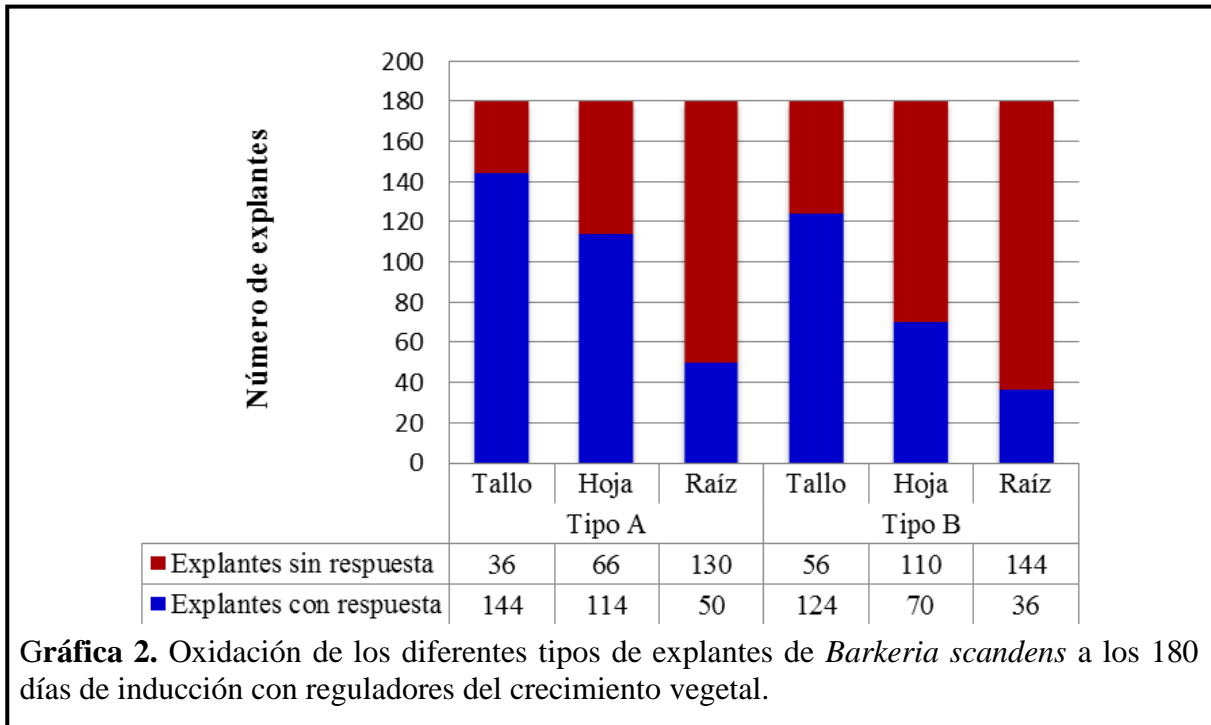
A 40 dds, la oxidación avanzó de manera gradual, la coloración en los explantes varió, pasando de café casi translúcido a café oscuro dependiendo del tipo de explante. Este proceso, fue letal para aquellos explantes que en ninguna etapa mostraron cambios

morfológicos que evidenciaran una respuesta, ni siquiera cuando éstos se pasaron a medio sin reguladores de crecimiento. Sin embargo la oxidación no estuvo influenciada por los reguladores del crecimiento, ya que en todos los tratamientos incluyendo el control, los explantes se oxidaron.

López (2009) obtuvo resultados similares, en sus experimentos; menciona que los explantes de hoja, tallo y raíz de *Encyclia adenocaula* cultivados en medio MS con reguladores del crecimiento tuvieron severos daños causados por oxidación irreversible y se perdieron (murieron), aún cuando estos fueron cambiados a medio fresco con carbón activado.

Los resultados de la oxidación a 180 dds, en esta investigación se muestran en la Gráfica 2, los explantes más afectados fueron los de raíz con una oxidación mayor al 70%, en hoja existió una oxidación menor al 50% y para tallo la oxidación fue de 25% del número total de explantes (Fig. 17). De los dos tamaños (A y B) empleados para cada explante, los más vulnerables a la oxidación fueron los de tipo B.

Se sabe que la oxidación de los tejidos o necrosamiento ocurre a través de la acción de las enzimas tipo oxidasas que contienen cobre, las cuales son liberadas o sintetizadas cuando los tejidos son dañados. Baltazar (2004) reportó que explantes de protocormos tienden a oxidarse debido al estrés provocado por el corte; más que aquellos que no fueron seccionados. De acuerdo con Roca y Mroginski (1993), la oxidación de algunos compuestos químicos como taninos, fenoles y polifenoles es uno de los aspectos de más difícil manejo dentro del cultivo *in vitro*, y es causal de la inhibición de las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de proteínas, y de la respuesta de la planta a las diferentes hormonas y reguladores del crecimiento. Por esta razón, la oxidación de los tejidos vegetales cultivados bajo condiciones *in vitro* muchas veces lleva a la supresión total de toda respuesta de crecimiento y desarrollo del tejido, y una posterior necrosis del mismo.



Gráfica 2. Oxidación de los diferentes tipos de explantes de *Barkeria scandens* a los 180 días de inducción con reguladores del crecimiento vegetal.

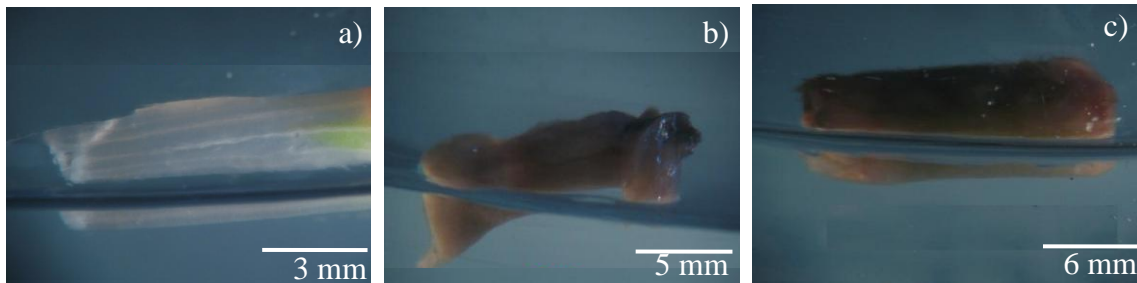


Figura 17. Oxidación de los diferentes explantes (tipo B) de *B. scandens* a los 180 días de inducción hormonal *in vitro*: a) Hoja, b) Raíz y c) Tallo

Cultivo *in vitro* de secciones de hoja

A lo largo del tiempo de inducción se registró una oxidación sin respuesta de 176 de 360 explantes (Gráf. 2), variando el tiempo en que se presentó la iniciación de la oxidación. De acuerdo a Azofeifa (2009) el estrés al corte es un factor oxidativo sin embargo una vez iniciado el crecimiento celular este problema disminuye. Zaid (1987), menciona que la oxidación gradual es considerada una expresión de los procesos de senescencia propios del tejido en las condiciones de cultivo. Con base en estas observaciones, cabe la posibilidad de que los explantes con cierto grado de oxidación respondan a la inducción con reguladores del crecimiento, por lo tanto se continuó con el cultivo *in vitro* de los explantes oxidados.

De acuerdo con el análisis estadístico, el tipo de explante que generó el mayor número de PLB's por explante, fue el A en medio MS adicionado con 0.5/ 1, razón por la cual se eligió dicho tipo de explante para representar gráficamente los cambios morfológicos ocurridos, válido para ambos explantes (A y B) a lo largo de 180 días de iniciados los cultivos (Fig.18). Durante los primeros 30 días de inducción, no se notó cambio aparente en cuanto a su morfología. Los segmentos de hoja, tenían una coloración verde, denotando que se mantenían en buen estado. A los 60 días de iniciados los cultivos, algunos explantes mostraron señales de oxidación, siendo más severa en el control y en el tratamiento con 0/1, donde todos los explantes tuvieron alguna porción oxidada, principalmente en la zona de corte. (Fig. 18a) Durante este periodo, los explantes sin oxidación, presentaron proliferación celular, en la zona de corte. Esta respuesta ocurrió en varios tratamientos, siendo más evidente con 0.5/2 y 1/2 mg/L.

(Fig.18c y d) A los 120 dds, los explantes que no habían mostrado signos de oxidación, comenzaron a oxidarse hacia la zona de la base del explante (aproximadamente una cuarta parte del explante mostró oxidación en el área donde se realizó el corte), la coloración de los explantes cambió notablemente, de un tono verde a café; sin embargo y a pesar de este fenómeno, los explantes continuaron expresando su respuesta morfogenética de la región en donde se comenzó a generar tejido. Los explantes que presentaron oxidación desde los 60 días, continuaron oxidándose, hasta esta etapa del cultivo no se observó respuesta morfogenética. A los 180 días de iniciados los cultivos, los explantes que presentaron respuesta morfogenética, estaban casi en su totalidad oxidados (3/4 partes o más), sin embargo la respuesta ya se había potenciado, pues desde los 120 días de cultivo existió un crecimiento celular muy acelerado, que durante los siguientes 30 días, llevó a la proliferación de una gran cantidad de PLB's, dependiendo del tratamiento con reguladores del crecimiento. A este tiempo, la región en la cual comenzó a darse una mayor diferenciación y crecimiento de PLB's, fue hacia el borde del explante, justo donde se realizó el corte (región basal de la hoja), mientras que en el lado opuesto (región apical de la hoja), permaneció igual. Es posible que la respuesta haya sido de células epidérmicas (o subepidérmicas), que expresaron su capacidad totipotencial debido en parte a los reguladores de crecimiento.

(Fig. 18f) En esta etapa del cultivo (120-180 dds), la formación de PLB's había aumentado considerablemente, y éstos se encontraban en diferentes estadios de desarrollo, encontrado desde masas embrionarias semiesféricas o esféricas en su totalidad, hasta PLB's conformados con sus respectivos primordios foliares, que después del periodo de inducción, continuaron su desarrollo hacia plántulas. Las capacidades regenerativas de los explantes de hoja se lograron potenciar por la adición de reguladores de crecimiento vegetal al medio lo que sugirió su empleo para la formación de PLB's.

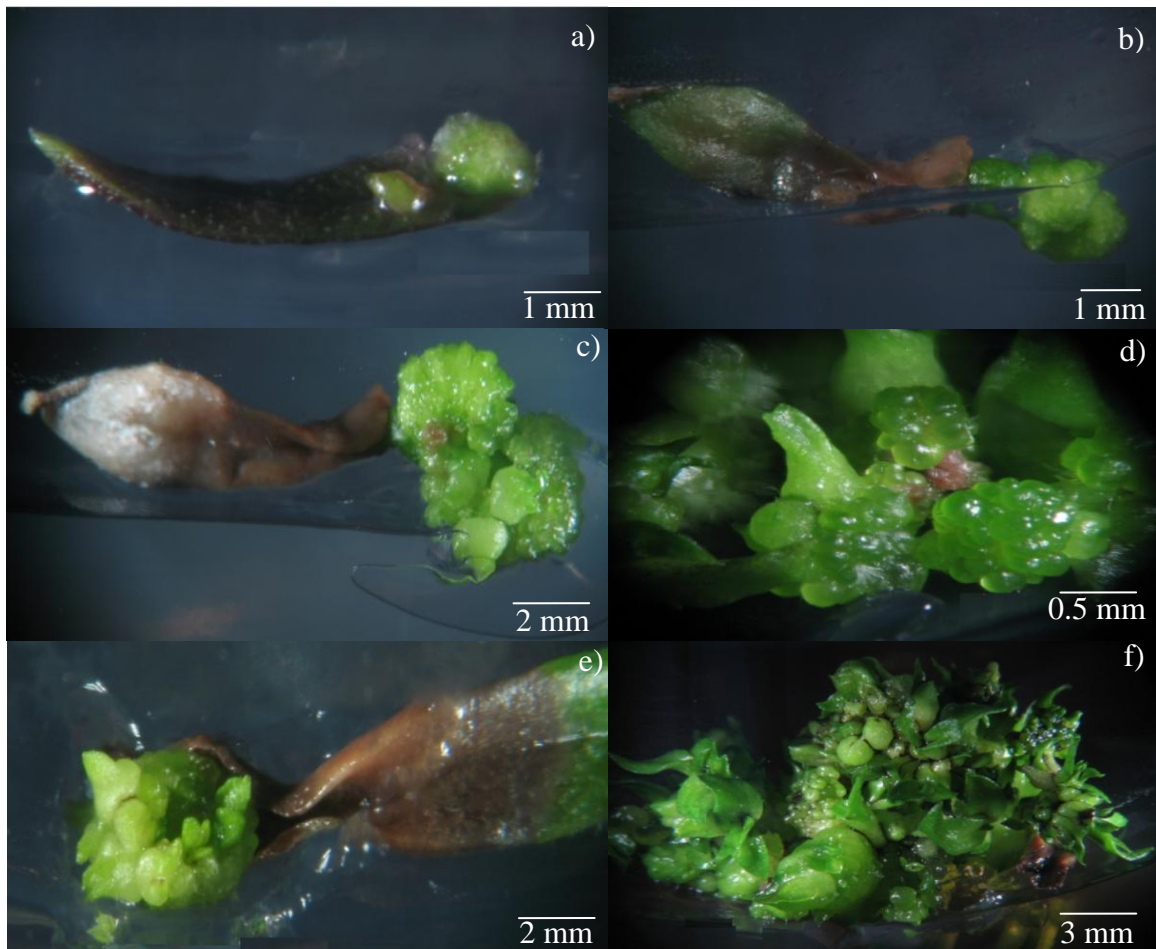


Figura 18. Respuesta morfogénica a partir del cultivo *in vitro* de secciones de hojas de plántulas tipo A (1-2 cm) de *B.scandens* en medio MS con la adición de 0.5 mg/l de ANA con 2 mg/l de BAP. a) Hinchamiento del explante en la zona donde se realizó el corte; a los 60 días de cultivo. b) Desarrollo de nódulos en la superficie del explante, 90 dds. c y d) Formación directa de PLB's a partir del explante a los 120 dds. e) Formación de primordios foliares en la parte apical de los PLB's a los 150 dds. F) Crecimiento de los PLB's y desarrollo de más hojas, a los 180 días de inducción hormonal.

A los 30 dds, los segmentos de hoja mostraron una coloración verde. Durante este periodo no se presentó crecimiento o formación de alguna estructura que hiciera evidente la morfogénesis. A 60 dds en los explantes tipo A, la mayor parte de los explantes comenzaron a oxidarse hacia la región donde se realizó el corte, siendo más evidente la oxidación en el control y en el tratamiento 0/1 mg/L, en donde todos los explantes mostraron una ligera oxidación (una quinta parte del total del explante). Los explantes que no mostraron algún daño (oxidación o necrosis) se mantenían verdes, observándose hidratados, y en la parte donde se realizó el corte se apreció un crecimiento celular, de color verde intenso y apariencia vigorosa. A pesar de que esta etapa del cultivo estuvo caracterizada por el crecimiento celular (hinchamiento del explante), se observaron algunos PLB's en desarrollo; el mayor número de PLB's se formó en el tratamiento 0.5/ 2 mg/L en medio MS 50% y MS, obteniendo un promedio de 3.4 y 2.8 PLB's por explante respectivamente, en esta etapa del cultivo, los explantes cultivados en MS 50% respondieron mejor, que los cultivados en MS en la misma concentración de reguladores del crecimiento (1/1 mg/L), reflejado en una mayor producción de PLB's. El segundo mejor tratamiento respecto al número de PLB's formados fue 1/2 mg/L, donde se desarrollaron en promedio 2.6 PLB's por explante en MS y 2.1 PLB's por explante en MS 50%. Por otro lado los tratamientos en los que no se obtuvieron PLB's fueron: el control y 0/1mg/L, en ambos medios de cultivo; en ausencia de ambos reguladores de crecimiento o la carencia de uno de ellos no se generó el estímulo correspondiente y la respuesta fue nula o mínima (Tabla 10).

Los explantes de hoja tipo B de *B. scandens*, cultivados en MS 50% y MS, bajo una inducción hormonal respondieron al estímulo ejercido de manera mucho más lenta, esto se vio reflejado en el pausado desarrollo y crecimiento de los PLB's generados, a comparación de los explantes tipo A, que respondieron más rápido. Durante los primeros 30 dds los explantes de hoja B mostraron una oxidación muy marcada, que a los 60 dds alcanzó un total de 60 explantes oxidados sin respuesta, con una oxidación cercana al 50% del total del área de cada explante, siendo más afectada la zona de corte, este evento no hizo observable alguna respuesta morfogenética. Sin embargo en los explantes restantes, a partir de los 60 días de cultivo se comenzaron a observar cambios morfológicos en la parte donde se realizó el corte, comenzó a desarrollarse una masa celular del mismo color del explante (verde

intenso), sin embargo esta respuesta fue mínima, en esta etapa apenas comenzaban a desarrollarse algunos PLB's (Tabla 10)

Tabla 10. PLB's generados a partir de secciones de hojas de plántulas tipo A y B a los 60 dds. n= 10

Tamaño	Tratamiento ANA/BAP (mg/L)	MS 50%			MS		
		Explantos oxidados: sin respuesta / con respuesta	N° total de PLB's	Promedio de PLB's por explante	Explantos oxidados: sin respuesta / con respuesta	N° total de PLB's	Promedio de PLB's por explante
A (1-2cm)	0/0	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/1	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/2	2/0	13	1.3	1/0	15	1.5
	0.5/0	2/0	2	0.2	1/0	9	0.9
	0.5/1	0	15	1.5	0	14	1.4
	0.5/2	0	34	3.4	0	28	2.8
	1/0	1/0	8	0.8	1/0	10	1.0
	1/1	1/0	11	1.1	0	19	1.9
	1/2	0	21	2.1	0	26	2.6
B (1-2cm)	0/0	10/0	0	0	10	0	0
	0/1	10/0	0	0	10	0	0
	0/2	3/0	3	0.3	2/0	7	0.7
	0.5/0	2/0	2	0.2	1/0	2	0.2
	0.5/1	1/0	3	0.3	0	8	0.8
	0.5/2	1/0	14	1.4	1/0	13	1.3
	1/0	3/0	1	0.1	2/0	2	0.2
	1/1	1/0	7	0.7	1/0	10	1
	1/2	1/0	5	0.5	1/0	11	1.1

A los 120 días de iniciados los cultivos, todos los explantes A mostraron algún grado de oxidación, sin embargo a pesar de este evento, 56 % de los explantes (101) evidenciaron la formación de tejido celular y PLB's, que se vio reflejada en el número de PLB's generados, pese a la oxidación, ésta no fue muy relevante, porque los explantes ya habían mostrado sus capacidades regenerativas y por lo tanto los PLB's formados ya no se nutrían directamente del explante, sino del medio de cultivo. En cuanto a producción de PLB's, los mejores 3 resultados se obtuvieron con 0.5/2 mg/L, con un promedio de 8.8 y 16.6 PLB's por explante en MS 50% y MS respectivamente, y un promedio de 11.8 PLB's por explante en el tratamiento 1/2mg/L en MS. Los tratamientos que generaron muy pocos PLB's fueron: ANA 0.5 mg/L en ausencia de BAP, y también en presencia de BAP 2 mg/L, en ausencia

de ANA (Tabla 11). La coloración de los explantes oxidados sin respuesta fue de verde-amarillento a café en la zona de corte. Los tratamientos con una oxidación mayor fueron: 0/0, 0/1, 0.5/0 y 0.5/1 mg/L.

En los explantes tipo B, la oxidación también se manifestó en todos los explantes, sin embargo fue mayor que la observada en los explantes tipo A, el 62 % (121) de los explantes no respondieron al efecto del medio ni de los reguladores del crecimiento. En la mayoría de los explantes restantes (59), mostraron una alta proliferación de PLB's en diferentes estadios de desarrollo: desde masas embriogénicas a PLB's bien constituidos con primordios foliares. Los mejores 3 resultados por explante se obtuvieron con: 0.5/2 con un promedio de 4.5 y 7.8 PLB's en MS 50% y MS respectivamente, y un promedio de 5.8 PLB's en el tratamiento con 1/2 ANA/BAP mg/L en medio MS. Por otra parte los tratamientos que generaron pocos PLB's fueron ANA (0.5 mg/L) en ausencia de BAP, y BAP (2 mg/L), en ausencia de ANA (Tabla 11).

Tabla 11. PLB's generados a partir de secciones de hojas de plántulas tipo A y B los 120 dds. n= 10

Tamaño	Tratamiento ANA/BAP (mg/L)	MS 50%			MS		
		Expalantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	Nº total de PLB's	Promedio de PLB's por explante	Expalantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	Nº total de PLB's	Promedio de PLB's por explante
A (1-2cm)	0/0	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/1	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/2	3/7	36	3.6	2/8	41	4.1
	0.5/0	5/5	12	1.2	4/6	24	2.4
	0.5/1	5/5	31	3.1	3/7	53	5.3
	0.5/2	3/7	88	8.8	0/10	166	16.6
	1/0	4/6	15	1.5	3/7	19	1.9
	1/1	3/7	37	3.7	2/8	76	7.6
	1/2	1/9	59	5.9	1/9	118	11.8
B (1-2cm)	0/0	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/1	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/2	7/3	14	1.4	6/4	2.2	22
	0.5/0	7/3	7	0.7	6/4	0.8	8
	0.5/1	5/5	16	1.6	4/6	3.3	33
	0.5/2	6/4	45	4.5	4/6	7.8	78
	1/0	6/4	6	0.6	7/3	1.7	17
	1/1	7/3	23	2.3	6/4	4.5	45
	1/2	5/5	27	2.7	5/5	5.8	58

A 180 dds en explantes A, los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento 0.5/2 mg/L en medio MS, con un promedio de 18.1 ± 1.16 PLB's, seguido del tratamiento 1/2 con un promedio 13 ± 1.01 PLB's en el mismo medio. La combinación en la cual se obtuvo la menor cantidad de PLB's fue con 0.5 mg/L de ANA en ausencia de BAP con un promedio de 3 ± 0.88 PLB's. En los explantes cultivados en MS 50% los mejores tratamientos fueron con 0.5/2 y 1/2 ANA/BAP mg/L con la formación de 11.2 ± 2.50 y 7.6 ± 2.15 PLB's por explante respectivamente. El tratamiento donde se obtuvo la menor regeneración fue con 0.5/0 mg/L de ANA/BAP con un promedio de 1.8 ± 0.92 PLB's (Tabla 12). En los explantes tipo B los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento 0.5/2 ANA/BAP mg/L, con un promedio de 8.1 ± 0.50 y 1/2 mg/L con 7.1 ± 0.23 PLB's por explante en MS y MS 50% respectivamente. Los tratamientos que no generaron respuesta morfogénica fueron; en el control (0/0) y en 0/1 ANA/BAP mg/L, en los explantes cultivados en MS 50% y MS (Tabla 12).

Tabla 12. PLB's generados a partir de secciones de hojas de plántulas tipo A y B en medio MS50% y MS, a los 180 dds. $n=10 \pm E.E.$ = Error estándar.

Tamaño	Tratamiento ANA/BAP (mg/L)	MS 50%			MS		
		Explantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	Nº total de PLB's	Promedio de PLB's $\pm E.E$ por explante	Explantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	Nº total de PLB's	Promedio de PLB's $\pm E.E$ por explante
A (1-2cm)	0/0	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/1	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/2	2/8	40	4 ± 1.37	1/9	50	5 ± 1.16
	0.5/0	5/5	18	1.8 ± 0.92	3/7	30	3 ± 0.88
	0.5/1	4/6	47	4.7 ± 1.59	2/8	61	6.1 ± 0.37
	0.5/2	3/7	112	11.2 ± 2.50	0/10	181	18.1 ± 1.16
	1/0	2/8	20	2 ± 0.68	2/8	32	3.2 ± 0.61
	1/1	1/9	46	4.6 ± 1.07	0/10	86	8.6 ± 1.00
	1/2	1/9	76	7.6 ± 2.15	0/10	130	13 ± 1.01
B (1-2cm)	0/0	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/1	10/0	0	0	10/0	0	0
	0/2	6/4	21	2.1 ± 0.72	6/4	30	3 ± 0.73
	0.5/0	5/5	9	0.9 ± 0.90	5/5	10	1 ± 0.42
	0.5/1	5/5	21	2.1 ± 0.87	4/6	43	4.3 ± 1.46
	0.5/2	5/5	52	5.2 ± 1.17	3/7	81	8.1 ± 0.50
	1/0	6/4	10	1 ± 0.51	6/4	2	2 ± 0.57
	1/1	5/5	30	3 ± 1.01	4/4	59	5.9 ± 0.52
	1/2	5/5	32	3.2 ± 0.89	4/6	71	7.1 ± 0.23

Al analizar el efecto de la interacción entre los reguladores de crecimiento ensayados (ANA y BAP), sobre la formación de PLB's a partir de las secciones de hojas de plántulas tipo A y B cultivadas en medio MS 50 % y MS, el ANOVA arrojó diferencias significativas ($p < 0.00000$) para cada una de las variables y las interacciones: medio*tratamiento y tamaño*tratamiento. Mediante la prueba de Tukey se evaluó el grado de diferencias de las interacciones (Tablas 13 y 14).

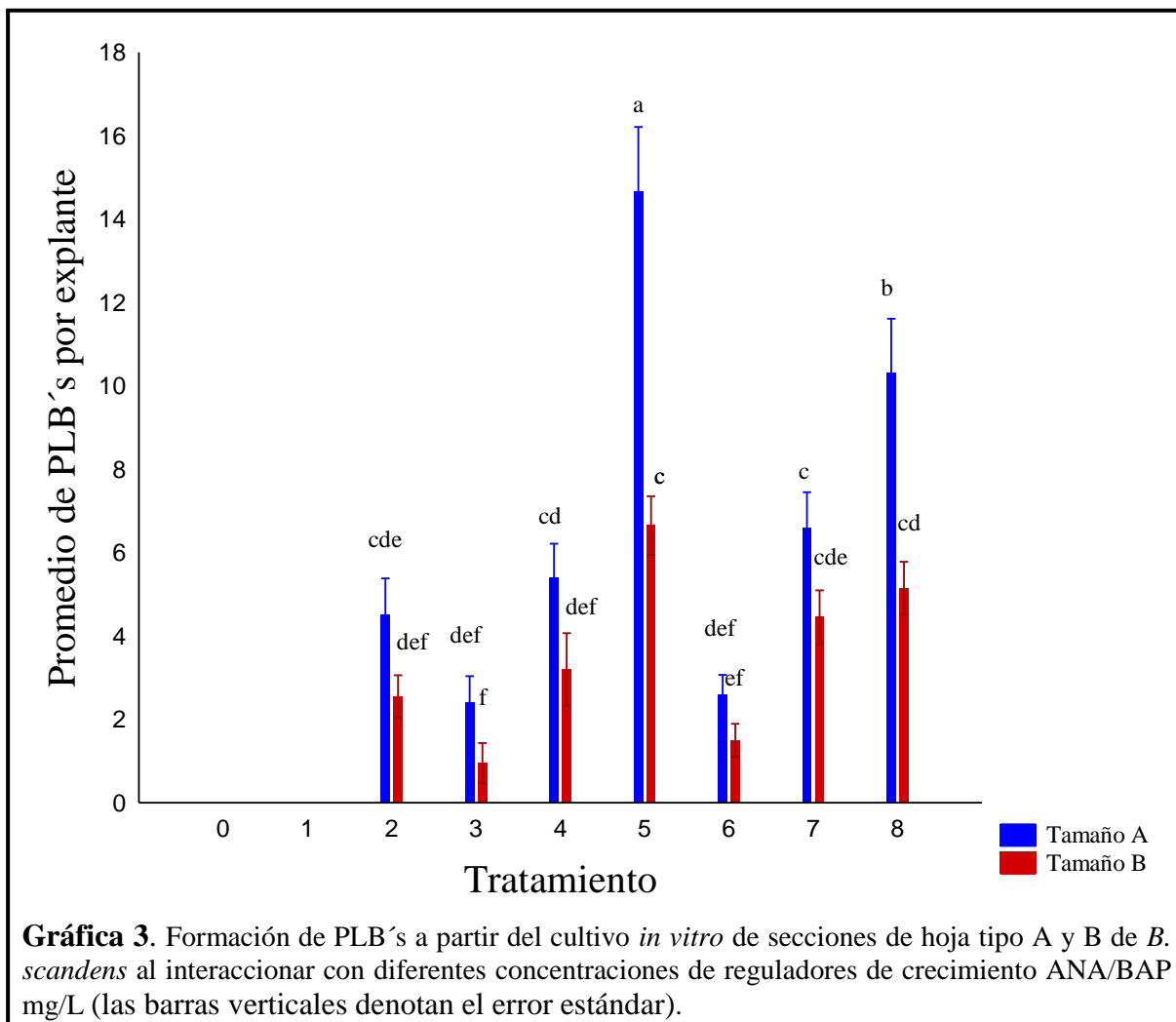
Tabla 13. PLB's generados a partir de secciones de hojas de tipo A y B con diferentes concentraciones de ANA y BAP a 180 dds. $n=10 \pm$ E.E. = Error estándar.

Tamaño	Tratamientos		Prueba de Tukey (DSH)
	Concentración hormonal	Promedio de PLB's por explante \pm D.S	
A	0/0	0	f
	0/1	0	f
	0/2	4.50 ± 0.88	cde
	0.5/0	2.40 ± 0.63	def
	0.5/1	5.40 ± 0.81	cd
	0.5/2	14.65 ± 1.56	a
	1/0	2.60 ± 0.46	def
	1/1	6.60 ± 0.85	c
	1/2	10.30 ± 1.31	b
	B	0/0	0
0/1		0	f
0/2		2.55 ± 0.51	def
0.5/0		0.95 ± 0.28	f
0.5/1		3.20 ± 0.86	def
0.5/2		6.65 ± 0.70	c
1/0		1.50 ± 0.39	ef
1/1		4.45 ± 0.64	cde
1/2		5.15 ± 0.63	cd

Las letras en la prueba de Tukey denotan el grado de significancia, con un orden descendente siendo **a**, el valor más significativo.

En los explantes tipo A se observó una oxidación sin respuesta menor al 50% (66 explantes de 180) obteniéndose una mejor respuesta a la inducción en los diferentes tratamientos, dado que en éstos hubo una mayor supervivencia pese a la oxidación (Gráf. 2), así como la formación de un mayor número de PLB's por explante, mientras que en los explantes tipo B, la oxidación y necrosis sin respuesta fue mayor, por lo que el 50% de los explantes murieron (110 explantes oxidados de 180) sin obtener respuesta alguna a 180 dds.

De manera general, comparando los tipos de explantes, independiente del medio de cultivo o las concentraciones hormonales, las secciones de hoja A respondieron mejor, generando un total de 929 PLB's con un promedio de 5.16 PLB's por explante, mientras que las secciones de hoja B, regeneraron un total de 489 PLB's con un promedio de 2.71 PLB's por explante, estos primeros resultados demostraron la importancia de utilizar explantes de cierto tamaño.



Gráfica 3. Formación de PLB's a partir del cultivo *in vitro* de secciones de hoja tipo A y B de *B. scandens* al interactuar con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento ANA/BAP mg/L (las barras verticales denotan el error estándar).

El haber utilizado explantes provenientes de plántulas con un tamaño aproximado de 1 ó 2 cm de *B. scandens*, demostró ventajas regenerativas en comparación con aquellos explantes provenientes de plántulas de un tamaño superior a 2 cm, y a pesar de que la diferencia en tamaño pudo parecer poco, en esta investigación se delimitaron tamaños que resultaron más convenientes en *B. scandens*, para generar un mayor número de PLB's.

Respecto al medio de cultivo, se observó que la mayor producción de PLB's se obtuvo cuando éstos se cultivaron en medio MS; después de 60 días de inducción hasta la última toma de datos realizados, con un total de 570 PLB's y un promedio de 6.33, un total de 314 PLB's con un promedio de 3.48 PLB's, para explantes A y B respectivamente, mientras que para el caso de los explantes cultivados en MS 50% éstos respondieron con un menor número de regenerantes, con un total de 359 y un promedio de 3.98 PLB's por explante para secciones de tamaño A y un total de 175 con un promedio de 1.94, para secciones de tamaño B. Estos resultados probablemente se obtuvieron porque los explantes requirieron de una alta concentración de nutrientes para llevar a cabo funciones básicas y necesarias como; recuperarse del estrés al cual fueron sometidos, comenzar a absorber nutrientes para amortiguar el daño y posteriormente comenzar el proceso de dediferenciación, y lograr el proceso de morfogénesis. Además de que *B. scandens*, es un especie tanto rupícola como epífita, y en condiciones naturales posiblemente sus requerimientos y demandas de nutrientes pueden ser elevados, y en condiciones *in vitro*, esto podría corroborarse, debido a que los explantes respondieron mejor en un medio rico en nutrientes.

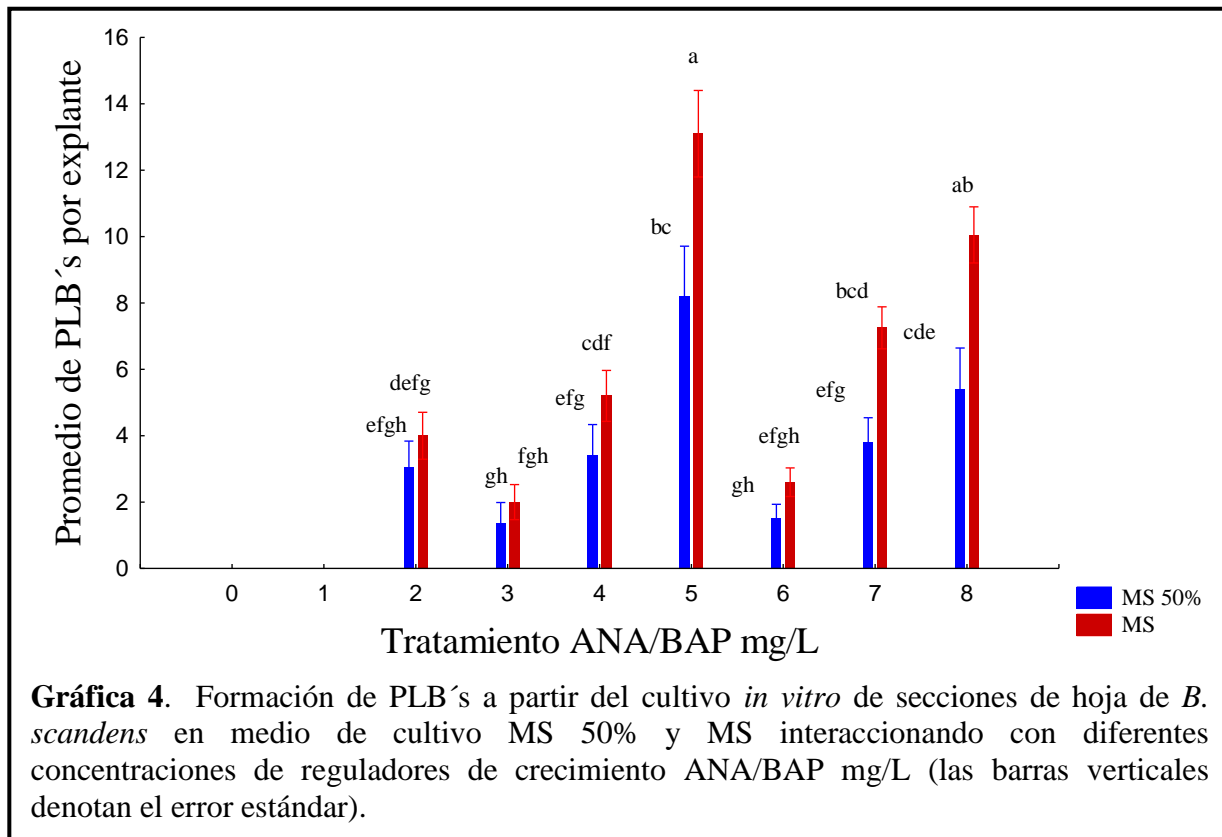
Finalmente en cuanto a los tratamientos con reguladores del crecimiento, se pudo establecer diferencia significativa entre los tratamientos. En las gráficas 3 y 4, se muestran los resultados obtenidos a 180 días de inducción con reguladores del crecimiento. En ambos tipos de explantes (tipo A y B), los mejores resultados se obtuvieron en medio con 0.5 /2, seguido de 1/ 2 mg/L ANA/BAP (Fig.19).

Tabla 14. Promedio de PLB's obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de secciones de hoja de *B. scandens* en medio MS 50% y MS, adicionado con diferentes concentraciones de ANA y BAP a 180 dds.

Medio	Tratamientos		Prueba de Tukey (DSH)
	Concentración hormonal	Promedio de PLB's por explante \pm E.E	
MS	0/0	0	h
	0/1	0	h
	0/2	4 \pm 0.70	defg
	0.5/0	2 \pm 0.52	fgh
	0.5/1	5.20 \pm 0.76	cdef
	0.5/2	13.10 \pm 1.30	a
	1/0	2.60 \pm 0.43	efgh
	1/1	7.25 \pm 0.63	bcd
	1/2	10.05 \pm 0.84	ab
	MS 50%	0/0	0
0/1		0	h
0/2		3.05 \pm 0.78	efgh
0.5/0		1.35 \pm 0.63	gh
0.5/1		3.40 \pm 0.95	efg
0.5/2		8.20 \pm 1.51	bc
1/0		1.50 \pm 0.43	gh
1/1		3.80 \pm 0.74	efg
1/2		5.40 \pm 1.24	cde

Las letras en la prueba de Tukey denotan el grado de significancia, con un orden descendente siendo **a**, el valor más significativo.

Cabe mencionar que hubo tratamientos en los cuales ningún explante sobrevivió, tal es el caso del tratamiento 0/1mg/L y el control, donde los explantes murieron sin presentar alguna respuesta morfogénica, probablemente por la carencia de ANA, para el tratamiento 0/1 quizá la concentración de BAP no fue suficiente y como se observa en las gráficas 3 y 4, al aumentar la concentración de citocinina, (tratamiento 0/2 mg/L), se generaron pocos PLB's en comparación con los demás tratamientos.



Estos resultados se asemejan parcialmente a lo encontrado por Fu (1978; 1979), quién reportó que explantes de hoja de *Dendrobium tokai* x *D. undulatum*, cultivados en medio sin reguladores de crecimiento fueron lentos en la formación de nuevas plantas ya que cada segmento dio lugar a la formación de una planta solamente.

En los tratamientos 0.5/0 y 1/0 mg/L ANA/BAP, también se generó una respuesta morfogénica, esto pudo deberse a la interacción de las hormonas (auxinas/citocininas) con las auxinas exógenas; sin embargo, el número de regenerantes fue mínimo a comparación de los tratamientos donde se obtuvo una mayor cantidad de PLB's. En el resto de los tratamientos se observó de manera general, que la formación de PLB's se incrementó cuando en el medio de cultivo se encontró presente una mayor concentración de BAP con respecto a la concentración de ANA, mientras que en los tratamientos en los cuales no estuvo presente la citocinina o la auxina, se obtuvieron los valores más bajos respecto al número de PLB's por explante. Por lo tanto, tal parece que la función de ANA y de BAP por sí solas, no jugó un papel preponderante en la formación de PLB's, y la interacción de

ambos reguladores del crecimiento es crucial para lograr una mayor producción de PLB's (Gráf. 3). En la presente investigación haber empleado secciones foliares de *B. scandens* fue útil debido a que se logró la regeneración de nuevos individuos lo que demostró su potencial para ser usado en la propagación y más aún cuando se carece de semillas (como fue el caso de esta especie), pues expresó sus capacidades totipotenciales bajo una inducción con reguladores del crecimiento. En la literatura el cultivo *in vitro* de hojas o secciones de láminas foliares es actualmente utilizado para micropropagar orquídeas monopódicas como *Phalaenopsis* y *Vanda* (Tisserat and Jones, 1999; Seeni *et al.*, 2000), y especies como *Acampe praemorsa* (Nayak *et al.*, 1997) o *Spathoglottis plicata* (Teng *et al.*, 1997).

La utilización de hojas de *B. scandens* para generar plantas a través de PLB's de manera directa fue posible, en la literatura esta vía morfogénica también ha sido reportada para el híbrido de *Oncidium* Gower Ransey (Chen *et al.*, 1999).

La formación de PLB's en *B. scandens* a partir de secciones de hoja ocurrió en la parte donde se realizó la herida, en la parte basal del explante (base de la hoja), probablemente en la periferia del tejido, a partir de células epidérmicas o subepidérmicas, este resultado concuerda con lo reportado por Flachsland *et al.* (2006), quienes observaron la formación de PLB's, a partir de la epidermis de hojas de *Oncidium bifolium sims*. Por su parte Chen *et al.* (1999), a partir del cultivo de hojas de *O. Grower Ramsey*, también observaron la formación de agregados de PLB's de manera directa, a partir de células epidérmicas y de las heridas superficiales del explante. Así mismo esto concuerda con lo reportado por Nayak *et al.* (1997) para la orquídea *Acampe praemorsa*, donde se evaluó la brotación en segmentos de hojas, tanto la parte distal, como la parte proximal al pseudobulbo, y se observó que la porción basal de la hoja, es la parte del explante de hoja, que tiene un mayor potencial morfogénico para generar brotes.

Los PLB's generados de las secciones de hoja de *B. scandens*, sólo se restringían a la zona donde se realizó el estrés (corte), es decir en la región basal, en la parte apical no se logró la regeneración de nuevos PLB's, Murthy y Pyati (2001) en *Aerides maculosum*, también 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.

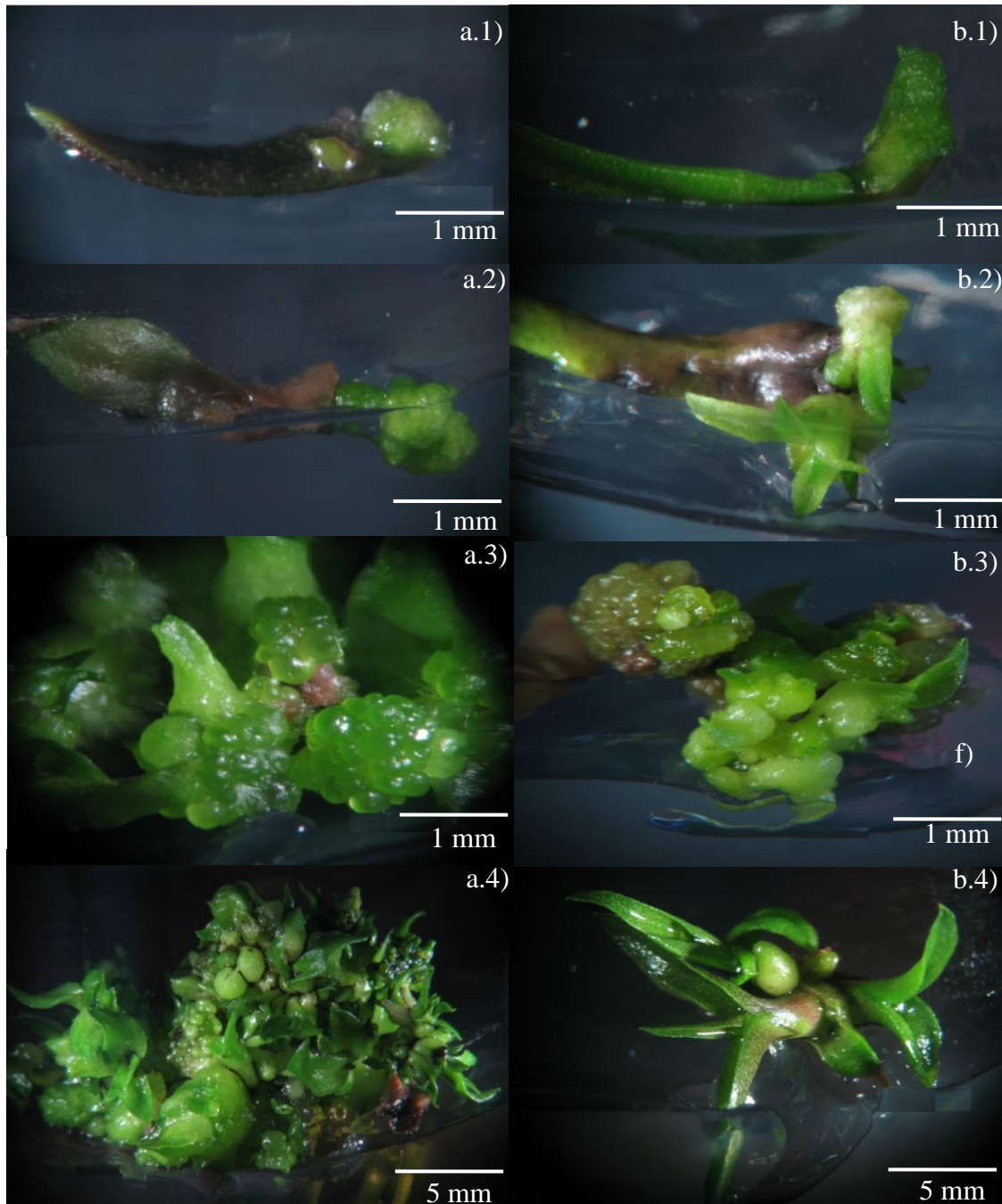


Figura 19. Respuesta morfogénica a partir del cultivo *in vitro* de secciones de hojas de plántulas tipo A (a.1, a.2, a.3 y a.4) y tipo B (b.1, b.2, b.3 y b.4) de *B. scandens* en medio MS con reguladores de crecimiento (0.5/2). a.1 y b.1) Hinchamiento del explante en la zona donde se realizó el corte, a los 60 días de iniciados los cultivos; a.2 y b.2) Desarrollo de nódulos en la superficie del explante a los 90 días de iniciados los cultivos; a.3 y b.3) Formación directa de PLB's a partir del explante a los 120 días de iniciados los cultivos; a.4 y b.4) Elongación de primordios foliares en la parte apical de los PLB's y elongación de los PLB's a los 180 días de inducción hormonal.

Es frecuente encontrar reportes de micropropagación donde se menciona y/o sugiere 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 a pesar de lo reportado en esta investigación y en los trabajos antes mencionados, también existen reportes en donde la regeneración no fue a partir de la región basal de la hoja; Churchill *et al.* (1973) obtuvieron PLB's sin mediación de callo, a partir de la parte superior (apical) de la hoja del híbrido *Laeliocattleya*. Chen *et al.* (1999), también regeneraron PLB's a partir de ápice de hoja del híbrido *Oncidium Grower* Ransey y Chen y Chang (2001) regeneraron en mayor porcentaje PLB's en la parte apical de la hoja del híbrido antes mencionado. La diferencia en la zona donde se regeneran PLB's o brotes en explante de hoja, puede deberse a la especie bajo estudio (Churchill *et al.*, 1973).

Los resultados obtenidos en la presente investigación en cuanto a las concentraciones de reguladores de crecimiento se asemejan parcialmente a lo existente en la literatura para distintos géneros de orquídeas. En la presente investigación la mayor formación de PLB's se presentó principalmente con concentraciones mayores de BAP que de ANA (0.5/2 mg/L ANA/BAP), estos resultados concuerdan con los reportados por Pierik y Steegmans (1972), mencionando que altas concentraciones de bencilaminopurina (10^{-6} y 10^{-5} M) favorecen la formación de PLB's y plántulas de *Cattleya aurantica*, mientras que a bajas concentraciones de BAP, las plántulas no producen PLB's o brotes adventicios. Es frecuente encontrar en literatura del cultivo *in vitro* de orquídeas el uso de bajas concentraciones de citocininas con muy bajas o nulas concentraciones de auxinas, Mauro *et al.* (1994) sugieren utilizar altas concentraciones de BAP y bajas concentraciones de ANA para lograr la formación de un gran número de brotes y PLB's en *Cattleya aurantica* en medio MS.

La nula respuesta que se presentó en el control y en el medio que contenía solamente BAP, para *B. scandens*, pudo ser influenciada por el tipo de citocinina que se utilizó; se ha reportado la inducción de morfogénesis *in vitro* de varias especies de orquídeas (Chen *et al.*, 2004; Tinoco, 2006) utilizando TDZ. Además del tipo de citocinina que se elija también intervienen otros factores, como la especie a estudiar, 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 *et al.* (2004), para los dos

híbridos de *Paphiopedilum* que estudiaron, y enfatizar 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 o embriones somáticos.

La interacción de ANA y BAP para lograr la formación de PLB's en esta investigación, generó porcentajes elevados de multiplicación, esto indicó que la interacción de auxina/citocinina estimuló la morfogénesis. En el cultivo *in vitro* la combinación en un balance adecuado de auxina/citocinina, se ha reportado para controlar los procesos de morfogénesis. Skoog y Miller (1957), demostraron que el balance adecuado de reguladores de crecimiento coordina la morfogénesis *in vitro* (George y Sherrington, 1984; Nordström *et al.*, 2004), Chen *et al.* (1999), en el híbrido *Oncidium* Grower Ramsey, obtuvieron 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. 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 con 0.5/2.

Estos resultados también coinciden con los cultivos de hojas en híbridos de *Phalaenopsis*, donde se generó un gran número de PLB's con el suplemento de 1/20 mg/L ANA/BAP (Park *et al.*, 2002). Arditti y Ernst (1993), observaron que la adición de 0.09 a 0.55 mg/L de ANA en combinación con 0.43 mg/L de BAP indujo la formación de PLB's en secciones basales de hoja en *Phalaenopsis*. López (2009) estableció para *Encyclia adenocaula* un protocolo de propagación a partir de secciones de hoja en donde 0.1/1 ANA/Kin mg/L fue su mejor tratamiento para la mayor producción de brotes. Asimismo Santos (2009), reportó la inducción de brotación múltiple a partir del cultivo *in vitro* de secciones de hoja de 1 cm en *Prosthechea mariae*, con un máximo de 25 brotes por explante en medio MS adicionado con 2 mg/L ANA y 5 mg/L de BA. Salisbury y Ros (2000) afirman que las auxinas o cualquier otro tipo de fitoregulador son fisiológicamente funcionales cuando se encuentran en pequeñas cantidades, y que una alta concentración de estas sustancias ejerce un efecto negativo sobre las plantas porque su exceso, en lugar de inducir una respuesta específica por parte del tejido vegetal, produce toxicidad en el mismo.

Cultivo *in vitro* de secciones de tallo.

A lo largo del tiempo de inducción se registró una oxidación sin respuesta en 92 de 360 explantes (Gráfica 2), variando el tiempo en que se presentó la iniciación de la oxidación, pese a este proceso, los explantes se mantuvieron cultivados en medio con reguladores del crecimiento vegetal para evaluar su posible respuesta a lo largo de los 180 días de cultivo *in vitro*.

El crecimiento celular ocurrió en algunas ocasiones en la zona donde se realizó el corte; el mayor crecimiento, sucedió a los costados del tallo, iniciando con la activación de las yemas laterales, las cuales generaron posteriormente una gran cantidad de PLB's (Fig.20).

Los cultivos de tallo, al momento de la siembra presentaban una coloración verde oscuro. (Fig. 20) A los 30 dds, los explantes tipo A y B no generaron respuesta alguna, pero su coloración empezó a tornarse a un verde más claro y en los tratamientos 0/0, 0.5/0 ANA/BAP mg/L se observaron indicios de oxidación, tomando un color blanco en las partes en donde se seccionó el tejido. Durante este periodo la morfogénesis fue nula.

A los 60 dds algunos de los explantes tipo A presentaron oxidación en ambos medios, el control y 0.5/0 mg/L, presentaron mayor oxidación con 5 y 3 de los 20 explantes cultivados en cada tratamiento (10 explantes en MS 50% y 10 en MS). Los explantes que no evidenciaron algún grado de oxidación adquirieron una coloración de verde oscuro a verde olivo. (Fig. 20a.1) En la mayoría de los casos, en los cuales no se presentó oxidación, comenzó a notarse una protuberancia que emergió de la periferia de las secciones de tallos, posiblemente se trató de yemas laterales. Posteriormente éstas dispararon el desarrollo y crecimiento de masa celular probablemente embriogénica, para continuar su desarrollo a PLB's. El mayor número de PLB's, se formó en el tratamiento con 0.5/1 ANA/BAP mg/L obteniéndose un promedio de 2.4 y 1.4 PLB's por explante en medio MS y MS 50% respectivamente. El segundo mejor tratamiento fue 1/1 mg/L, donde se desarrollaron en promedio 1.2 PLB's por explante en MS. Los tratamientos en los que no se obtuvieron PLB's fueron el control y 0.5/0 ANA/BAP mg/L en MS 50% (Tabla 15).

Para el caso de los explantes tipo B, la oxidación se evidenció al tomar una coloración verde pardo y/o café en la base del explante donde se realizó el corte, se ha reportado en la literatura que el estrés al corte es un factor que provoca la liberación al medio de cultivo

compuestos fenólicos por parte de los explantes, que son los responsables de la oxidación de los mismos (Murthy y Pyati, 2001).

La oxidación sin respuesta estuvo muy marcada en varios de los tratamientos; en 0/0, 0.5/0, 0.5/2 ANA/BAP mg/L con \pm 5 explantes oxidados por tratamiento en medio MS 50% y MS, además en el resto de los tratamientos por lo menos había 2 explantes oxidados sin respuesta por tratamiento.

Tabla 15. PLB's generados a partir de secciones de tallo de plántulas tipo A y B *in vitro* en medio MS 50 % y MS, a 60 dds.

Tamaño	Tratamiento ANA/BAP (mg/L)	MS 50%			MS		
		Explantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	N° total de PLB's	Promedio de PLB's por explante	Explantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	N° de PLB's	Promedio de PLB's por explante
A (1-2cm)	0/0	3/0	0	0	2/0	1	0.1
	0/1	0	2	0.2	0	12	1.2
	0/2	0	3	0.3	0	5	0.5
	0.5/0	2/0	0	0	1/0	1	0.1
	0.5/1	0	14	1.4	0	24	2.4
	0.5/2	0	1	0.1	0	9	0.9
	1/0	0	1	0.1	0	3	0.3
	1/1	0	4	0.4	0	12	1.2
	1/2	0	5	0.5	0	2	0.2
B (1-2cm)	0/0	6/0	0	0	4/0	0	0
	0/1	2/0	1	0.1	3/0	7	0.7
	0/2	2/0	0	0	3/0	2	0.2
	0.5/0	4/0	0	0	3/0	1	0.1
	0.5/1	2/0	2	0.2	2/0	17	1.7
	0.5/2	5/0	0	0	4/0	3	0.3
	1/0	3/0	1	0.1	2/0	1	0.1
	1/1	2/0	1	0.1	2/0	3	0.3
	1/2	2/0	12	1.2	2/0	5	0.5

(Fig. 20b.1) Los explantes que no presentaron oxidación, comenzaron a desarrollar tejido de color verde intenso a partir de la zona de corte, que en algunas partes de ese tejido formó rizoides, justo en la zona que estaba en contacto con el medio de cultivo. También se comenzaron a desarrollar y activar las yemas laterales, sin embargo a este tiempo, ya se habían formado algunos PLB's. Como resultado de la interacción de distintas

concentraciones de ANA y BAP, el mayor número de regenerantes se obtuvo en 0.5/1 ANA/BAP mg/L con un promedio de 1.7 PLB's por explante en MS y 1.2 PLB's por explante en el tratamiento 1/2 ANA/BAP mg/L en MS 50%, en el control en ambos medios de cultivo no se generaron PLB's, cabe mencionar que en MS 50%, no se generó ningún tipo de respuesta en los tratamientos 0/1, 0/2, 0.5/0 y en 0.5/2 ANA/BAP mg/L.

El menor número de PLB's formados se obtuvo en ausencia de reguladores de crecimiento con un promedio de 0.6 PLB's por explante y 0 PLB's en MS y MS 50% respectivamente, además cabe mencionar que el número de regenerantes se incrementaba cuando en el medio de cultivo existía una concentración homogénea en las concentraciones ó cuando existió una mayor concentración de BAP con respecto a ANA (Tabla 15).

A los 120 dds en explantes tipo A, el número de explantes oxidados sin respuesta fue 29 de 180, siendo más evidente en el control 0/0 con 6 explantes oxidados, y en 0.5/0 con 4 explantes oxidados, en el resto de los tratamientos al menos se oxidaron 1 o 2. (Fig. 20a.2)

De los explantes que continuaron vivos y respondieron al estímulo ejercido, se incrementó el número de PLB's, sólo en el tratamiento control en medio MS 50% no se desarrollaron yemas ni PLB's. Después de formarse las yemas laterales, comenzó un proceso intenso incremento celular, se observó una gran cantidad de PLB's que se formaron subsecuentemente. Los mejores resultados coincidieron con los encontrados a los 60 dds, se formó un promedio de 21.1 PLB's por explante en 0.5/1 en MS y 4.4 PLB's en MS 50%. (Tabla 16). El menor número de PLB's formados se obtuvo en ausencia de reguladores de crecimiento con un promedio de 0.6 y 0 PLB's por explante en MS y MS 50% respectivamente. El número de PLB's se incrementó cuando en el medio de cultivo existió una concentración homogénea en las concentraciones (1/1 mg/L) o cuando la concentración de ANA fue menor que la de BAP (0.5/1 mg/L).

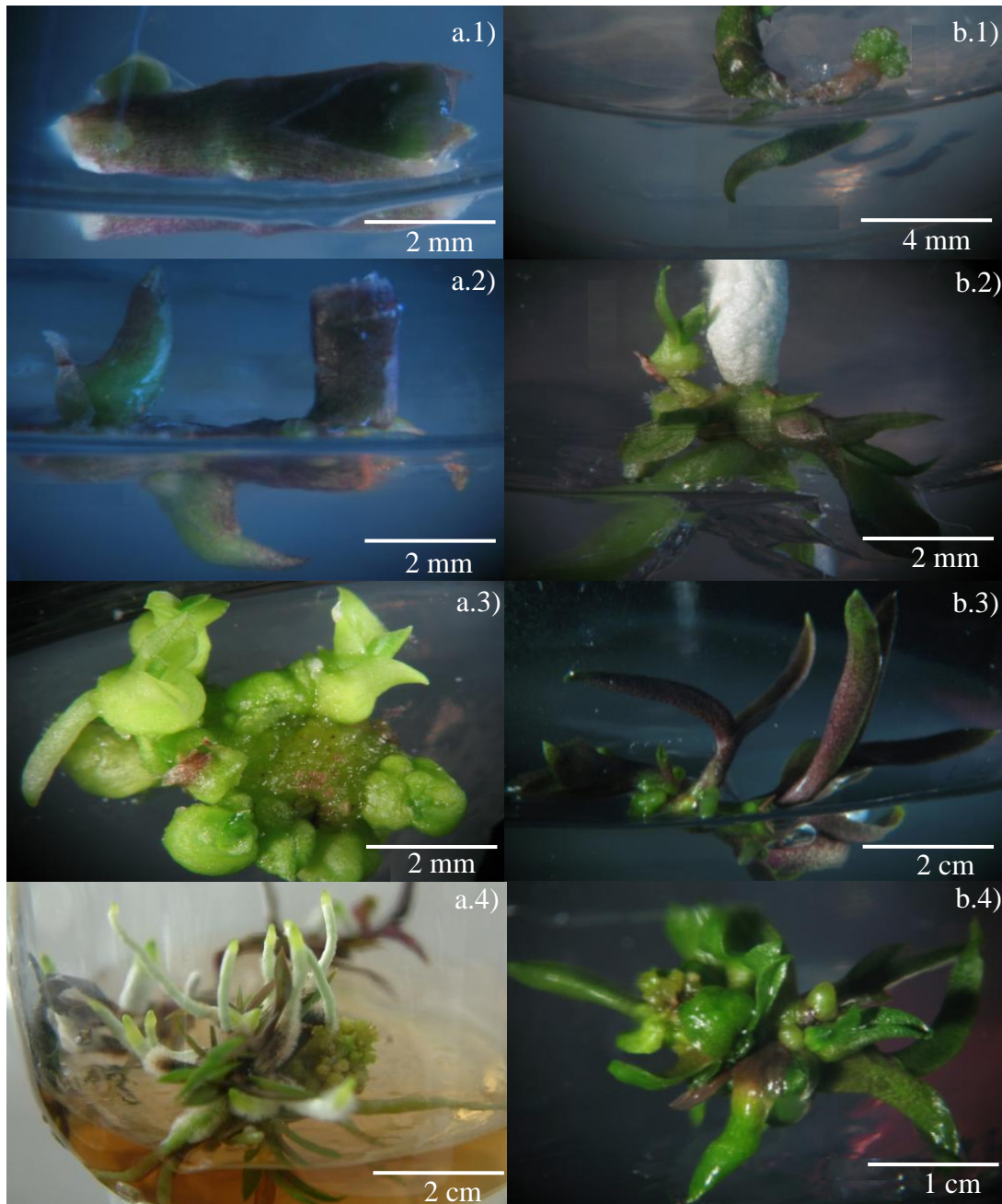


Figura 20. Respuesta morfogénica a partir del cultivo *in vitro* de secciones de Tallo de plántulas tipo A (a: 1, 2, 3 y 4) y tipo B (b: 1, 2, 3 y 4) de *B. scandens* en medio MS con ANA/BAP (0.5/1). a.1 y b.1) Hinchamiento del explante en la zona donde se realizó el corte a 60 días de iniciados los cultivos. a.2 y b.2) Desarrollo de nódulos en el explante y de yemas de las secciones de tallo a los 90 días de iniciados los cultivos. a.3 y b.3) Formación directa de PLB's a partir del explante a los 120 días de iniciados los cultivos. a.4 y b.4) Formación de primordios foliares en la parte apical de los PLB's y elongación de los PLB's a los 180 días de iniciados los cultivos.

Tabla 16. PLB's generados a partir de secciones de tallo de plántulas tipo A *in vitro* en medio MS 50 % y MS, a los 120 dds.

Tamaño	Tratamiento o ANA/BAP (mg/L)	MS 50%			MS		
		Explantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	N° total de PLB's	Promedi o de PLB's por explante	Explantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	N° total de PLB's	Promedio de PLB's por explante
A (1-2cm)	0/0	4/0	0	0	2/0	6	0.6
	0/1	5/0	38	3.8	2/0	71	7.1
	0/2	2/0	32	3.2	2/0	76	7.6
	0.5/0	3/0	3	0.3	1/0	9	0.9
	0.5/1	4/0	44	4.4	1/0	211	21.1
	0.5/2	1/0	12	1.2	1/0	99	9.9
	1/0	1/0	6	0.6	1/0	24	2.4
	1/1	2/0	31	3.1	3/0	112	11.2
	1/2	1/0	44	4.4	2/0	78	7.8
B (1-2cm)	0/0	6/0	1	0.1	5/0	7	0.7
	0/1	2/0	18	1.8	2/0	61	6.1
	0/2	2/1	11	1.1	4/0	44	4.4
	0.5/0	4/1	4	0.4	1/3	6	0.6
	0.5/1	3/1	31	3.1	0/3	16	1.6
	0.5/2	4/2	5	0.5	0/3	32	3.2
	1/0	4/0	5	0.5	3/0	14	1.4
	1/1	2/0	11	1.1	0/3	58	5.8
	1/2	2/0	38	3.8	0/2	69	6.9

En los explantes tipo B, el número de explantes oxidados sin respuesta aumentó, con aproximadamente 60 explantes de 180 en medio MS 50% y MS; el mayor número de explantes con oxidación se registró en el control, 0.5/0, 0.5/2, y en 1/0 mg/L. Los explantes que generaron crecimiento celular en el área de corte, tenían un aspecto nodular, e inclusive existían PLB's bien constituidos, con forma semiesférica o esférica y la presencia de una protuberancia en el ápice, en el caso de las yemas preformadas éstas continuaron su desarrollo a plántulas, cerca del 68% de los explantes habían activado sus yemas laterales y generado PLB's. El mayor número de PLB's se formó en el tratamiento adicionado con 1/2 mg/L, obteniéndose un promedio de 6.9 y 3.8 PLB's por explante en MS y MS 50%, el menor número de regenerantes se obtuvo en el control, y en el tratamiento 0.5/0 mg/L (Tabla 16).

A los 180 dds todos los explantes tipo A presentaron algún grado de oxidación, sin embargo pese a este evento, 144 de 180 explantes expresaron sus capacidades totipotenciales al lograr la formación de PLB's; una gran cantidad de PLB's adheridos en cúmulos fácilmente disgregables mostraron la presencia de primordios foliares. En cuanto al número de PLB's regenerados en 0.5/ 1 mg/L se indujo un promedio de 22 ± 0.26 PLB's por explante en MS, el siguiente mejor tratamiento fue 1/1 mg/L en MS, con 13.2 ± 1.50 PLB's por explante, mientras que en los tratamientos donde se formó el menor número de PLB's fueron en ausencia de reguladores de crecimiento con un promedio de 1 ± 0.33 y 1.3 ± 0.37 PLB's por explante en MS 50% y MS (Tabla 17).

Tabla 17. PLB's generados a partir de secciones de tallo de plántulas tipo A *in vitro* en medio MS 50 % y MS, a los 180 dds

Tamaño	Tratamiento o ANA/BAP (mg/L)	MS 50%			MS		
		Exalantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	Nº total de PLB's	Promedio de PLB's \pm E.E por explante	Exalantes oxidados Sin respuesta / con respuesta	Nº total de PLB's	Promedio de PLB's \pm E.E por explante
A (1-2cm)	0/0	2/8	10	1 ± 0.33	3/7	13	1.3 ± 0.37
	0/1	2/8	81	8.1 ± 0.91	2/8	92	9.2 ± 0.13
	0/2	2/8	92	9.2 ± 1.57	2/8	108	10.8 ± 0.61
	0.5/0	3/7	15	1.5 ± 0.43	3/7	17	1.7 ± 0.40
	0.5/1	3/7	110	11 ± 1.24	1/9	220	22 ± 0.26
	0.5/2	3/7	70	7 ± 1.58	2/8	87	8.7 ± 1.91
	1/0	1/9	25	2.5 ± 0.50	1/9	35	3.5 ± 0.62
	1/1	2/8	67	6.7 ± 1.15	1/9	132	13.2 ± 1.50
	1/2	2/8	100	10 ± 1.67	1/9	115	11.5 ± 1.32
B (1-2cm)	0/0	6/4	8	0.8 ± 0.33	5/5	10	1 ± 0.33
	0/1	2/8	65	6.5 ± 1.12	1/9	88	8.8 ± 1.01
	0/2	3/7	48	4.8 ± 1.08	1/9	58	5.8 ± 0.76
	0.5/0	5/5	10	1 ± 0.33	4/6	15	1.5 ± 0.43
	0.5/1	2/8	77	7.7 ± 1.31	1/9	150	15 ± 1.67
	0.5/2	5/5	20	2 ± 0.67	4/6	49	4.9 ± 1.35
	1/0	4/6	13	1.3 ± 0.37	3/7	23	2.3 ± 0.54
	1/1	3/7	32	3.2 ± 0.73	2/8	67	6.7 ± 1.13
	1/2	3/7	75	7.5 ± 1.67	2/8	91	9.1 ± 1.52

Para el caso de los explantes tipo B, todos los explantes presentaban oxidación pero sólo 56 explantes no generaron respuesta, el mayor número de explantes sin respuesta se registró en 0/0, 0.5/0 y 0.5/2 mg/L. Por otra parte el mejor tratamiento en cuanto al número de PLB's

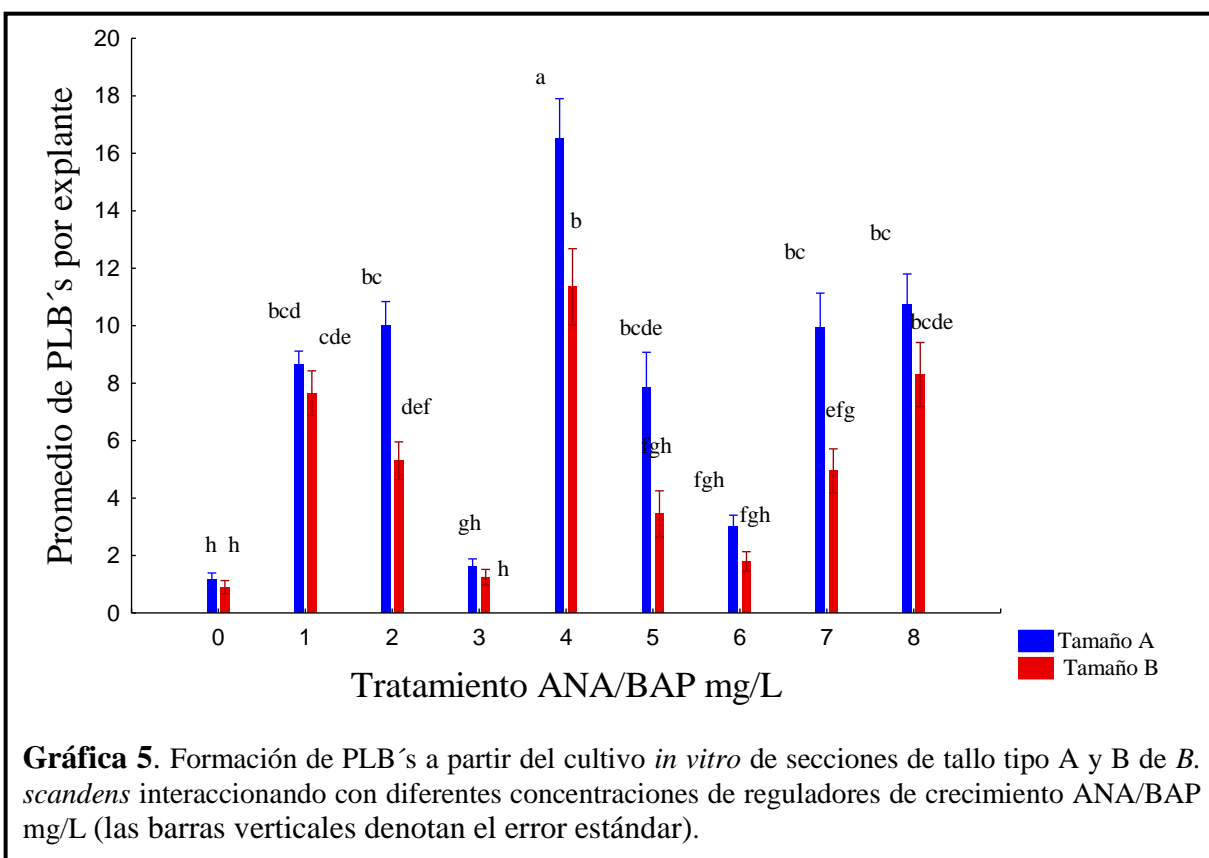
formados se logró con 0.5/1 mg/L con un promedio de 15 ± 1.67 , el siguiente mejor tratamiento fue 1/2 mg/L con 9.1 ± 1.52 PLB's por explante en medio MS, en el tratamiento control se obtuvieron los menores resultados con 0.8 ± 0.33 PLB's/ explante en medio MS 50% (Tabla 17). Al analizar el efecto de la interacción entre los reguladores de crecimiento ensayados (ANA y BAP), sobre la formación de PLB's a partir de las secciones de tallo de plántulas tipo A y B cultivadas en medio MS 50 % y MS, el análisis de varianzas (ANOVA) arrojó diferencias significativas ($p < 0.00000$) para cada una de las variables y las interacciones: medio* tratamiento y tamaño* tratamiento. Mediante la prueba de Tukey se evaluó el grado de diferencias de las interacciones (Tablas 18 y 19).

Tabla 18. Promedio de PLB's obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de secciones de tallo tipo A y B de *B. scandens* con diferentes concentraciones de ANA y BAP a 180 dds.

Tamaño	Tratamientos		Prueba de Tukey (DSH)
	Concentración hormonal	Promedio de PLB's por explante \pm E.E	
A	0/0	1.15 ± 0.24	h
	0/1	8.65 ± 0.47	bcd
	0/2	10.00 ± 0.84	bc
	0.5/0	1.60 ± 0.28	gh
	0.5/1	16.50 ± 1.40	a
	0.5/2	7.85 ± 1.22	bcde
	1/0	3.00 ± 0.40	fgh
	1/1	9.95 ± 1.18	bc
	1/2	10.75 ± 1.05	bc
B	0/0	0.90 ± 0.23	h
	0/1	7.65 ± 0.78	cde
	0/2	5.30 ± 0.65	def
	0.5/0	1.25 ± 0.27	h
	0.5/1	11.35 ± 1.33	b
	0.5/2	3.45 ± 0.80	fgh
	1/0	1.80 ± 0.34	fgh
	1/1	4.95 ± 0.77	efg
	1/2	8.30 ± 1.12	bcde

*Las letras en la prueba de Tukey denotan el grado de significancia, con un orden descendente siendo **a**, el valor más significativo.

En los explantes tipo A hubo una mayor respuesta de los explantes (144 de 180) obteniéndose un total de 1389 PLB's con un promedio de 7.71 ± 0.45 a 180 días de cultivo *in vitro*; la oxidación sin respuesta fue menor al 20%, mientras que en los explantes B oxidados con respuesta (124 de 180) generaron 899 PLB's totales con un promedio de 4.99 ± 0.35 ; la oxidación con necrosis fue mayor, el 31% murieron sin obtener respuesta alguna. El empleo de dos diferentes tamaños de plántulas para la regeneración de PLB's a partir de explantes de tallo denotó diferencias en la producción final; se promovió un mayor número de PLB's en tallos provenientes de plántulas con un tamaño de 1 a 2 cm (tipo A) (Gráf. 5).



Gráfica 5. Formación de PLB's a partir del cultivo *in vitro* de secciones de tallo tipo A y B de *B. scandens* interaccionando con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento ANA/BAP mg/L (las barras verticales denotan el error estándar).

En cuanto a concentraciones de reguladores de crecimiento el tratamiento en el cual se obtuvo el mayor número de PLB's, fue en el tratamiento con 0.5/ 1 en medio MS con un promedio de 13.92 ± 6.57 PLB's por explante.

En el resto de los tratamientos, la mayor formación de PLB's por explante se obtuvo cuando BAP estaba presente en el medio de cultivo en mayor concentración que ANA,

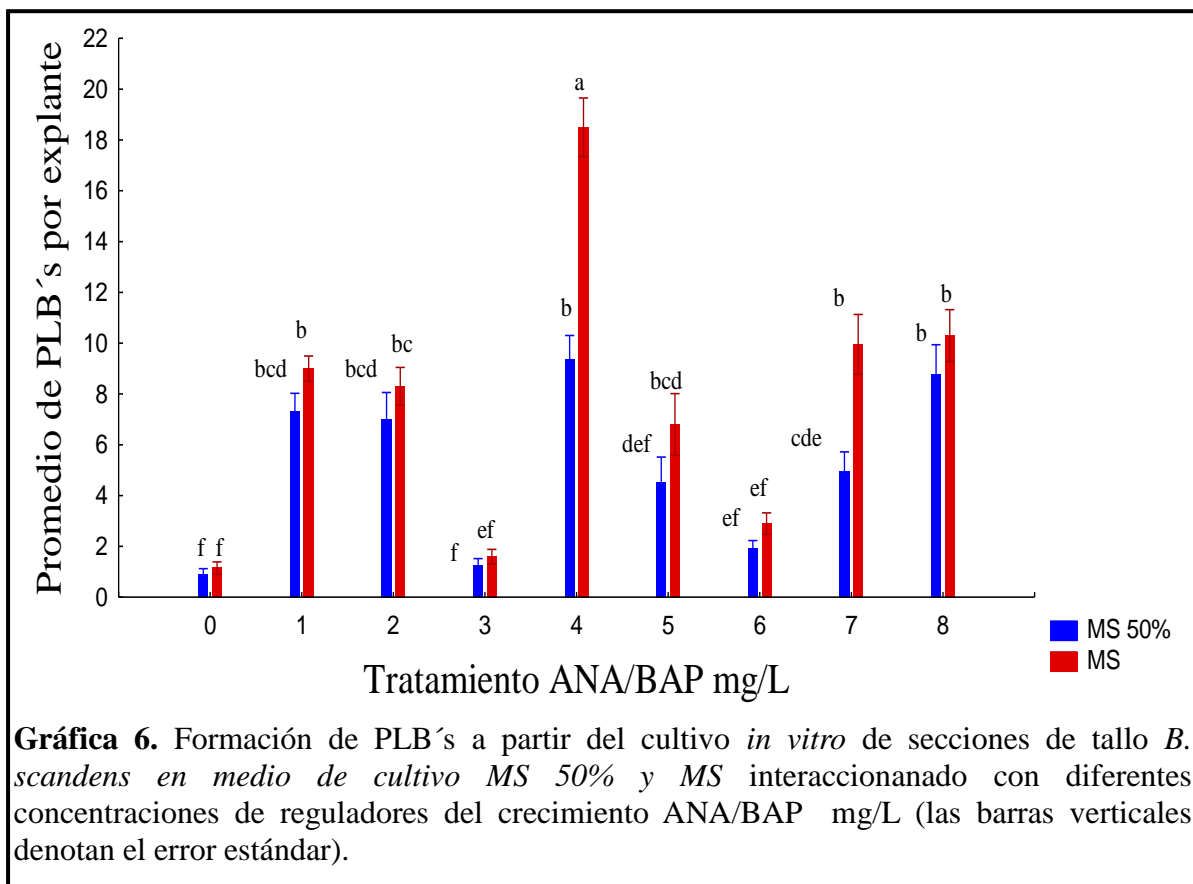
principalmente en los tratamientos en donde se empleo 2 y 1 mg/l de BAP, y en algunos casos en la ausencia de este regulador, mientras que en los tratamientos en ausencia de citocinina, se obtuvieron los valores más bajos respecto al número de PLB's por explante (Gráficas 5 y 6).

Tabla 19. Efecto de las diferentes concentraciones de ANA/BAP mg/L en la formación de PLB's obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de tallo de *B. scandens* de dos diferentes Medios: MS 50% y MS.

Tratamientos			
Medio	Concentración hormonal ANA/BAP mg/L	Promedio de PLB's por explante ± E.E	Prueba de Tukey (DSH)
MS	0/0	0.90±0.23	f
	0/1	7.30±0.73	b
	0/2	7.00±1.06	bc
	0.5/0	1.25±0.27	ef
	0.5/1	9.35±0.95	a
	0.5/2	4.50±1.01	bcd
	1/0	1.90±0.33	ef
	1/1	4.95±0.77	b
	1/2	8.75±1.19	b
	MS 50%	0/0	1.15±0.24
0/1		9.00±0.50	bcd
0/2		8.30±0.74	bcd
0.5/0		1.60±0.28	f
0.5/1		18.50±1.15	b
0.5/2		6.80±1.22	def
1/0		2.90±0.42	ef
1/1		9.95±1.18	cde
1/2		10.30±1.02	b

La función del ANA se vio disminuida sin la interacción de BAP, reiterando la importancia de ambos reguladores del crecimiento en el medio de cultivo para inducir y potenciar una respuesta para la producción de PLB's. Como resultado para esta investigación se obtuvo que la mejor interacción para la producción de PLB's resulto del tamaño A, medio MS y tratamiento 0.5/1 ANA/BAP mg/L.

Los resultados obtenidos en esta investigación son parecidos a lo presentado por Nguyen y Tran (2006), quienes obtuvieron un gran número de regenerantes en tallos de *Dendrobium*, al adicionar tanto ANA como BAP al medio, en una concentración 1/1 mg/l ANA/BAP; la aplicación de ambos reguladores promovió una mayor brotación, que cuando se usaron individualmente. La interacción de ambos reguladores mostró efectos sinérgicos (Coenen and Lomax, 1997; Nordström *et al.*, 2004).



También Shiau *et al.* (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/BAP, resultado muy similar al obtenido en la presente investigación. Por su parte 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 *B. scandens*, ya que en los explantes de tallo había yemas laterales que con la combinación de ANA y BA en el medio, estimularon el desarrollo y crecimiento de las yemas preformadas, logrando inducir posteriormente la formación de PLB's.

Basker y Narmatha Bai (2006), también obtuvieron resultados muy parecidos a los obtenidos en esta investigación, en cultivos de segmentos de pseudobulbos de *Coelogyne stricta*, con 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/BAP, siendo favorable para incrementar la brotación múltiple como lo obtenido en la presente investigación con 0.5/1, 1/2, y 1/1 ANA/BAP mg/L a los 180 días de iniciados los cultivos.

Por otra parte, las concentraciones de ANA y BAP por separado, también estimularon la formación de PLB's en *B.scandens*, sin embargo la formación de PLB's no fue significativa a comparación de los obtenidos con la interacción de ANA/BAP. En la literatura también se ha reportado la producción de PLB's en medio de cultivo con solo algún tipo de regulador (auxina o citocinina), por ejemplo; con la adición de 0.5 mg/L de ANA a partir de explantes de tallo se logró la formación de PLB's, en el híbrido *Dendrobium* var. *Semialba* (Kim y Kim, 2003). También solo con la adición de citocininas se ha observado que se promueve la formación de PLB's, como lo reportado por Gómez (2009) quien al cultivar secciones de tallo de *Laelia gouldiana* obtuvo la mejor respuesta en medio MS en los tratamientos con 0.5 y 1 mg/l de BAP. Taiz (1988) establece que la aplicación directa de citocininas al medio de cultivo estimula el crecimiento de yemas laterales en muchas especies, anulando el efecto inhibitor del meristemo apical del brote.

Sin embargo en la mayoría de los estudios de orquídeas al utilizar tallos como explante inicial se ha reportado la combinación de auxina/citocinina, para promover una gran cantidad de PLB's, como lo obtenido por Jo *et al.* (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 se obtuvieron con 0.1/0.5, 0.5/0.5 mg/l ANA/BAP respectivamente.

A pesar de la importancia de los reguladores del crecimiento para la producción de PLB's los explantes por sí solos tienen capacidades regenerativas y totipotenciales que les

permiten regenerar nuevos individuos (Tablas 18 y 19), pero para fines de micropropagación es necesario estimular una respuesta mayor.

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, se ha visto que es un factor importante que favorece la embriogénesis (Ogasawara *et al.*, 1995). Estos sugiere que la regeneración vía embriogénesis somática depende de las condiciones de cultivo y el explante inicial.

Cultivo *in vitro* de ápice de raíz.

Después del periodo de 180 días de cultivo *in vitro* de secciones de ápice de *Barkeria scandens*, no se obtuvo una producción de PLB's o de alguna respuesta morfogénica. A lo largo del tiempo de inducción se registró una oxidación y muerte de 274 de 360 explantes (Gráf. 2).

De manera general para los cultivos de raíz, al inicio de la siembra los explantes mostraron una coloración verde en la porción apical y el resto era blanco, por el velamen (epidermis múltiple en las raíces aéreas de orquídeas epífitas) (Park *et al.*, 2003), pero a los 30 días de cultivo en todos los tratamientos la coloración de los explantes cambió a un verde más claro que el inicial. A los 60 dds, 30% del total de los explantes adquirió un color café claro, lo que indicó principios de oxidación.

A los 90 dds, ningún explante logró alguna respuesta morfogénica, y sólo varió la coloración, mostrando en la mayoría de los explantes un estadio avanzado de oxidación. A 180 dds en 274 de los 360 explantes, se hizo presente este cambio, quedaron 86 explantes con pigmento verde. De acuerdo con Zaid (1987) la oxidación, es considerada una expresión de los procesos de senescencia del mismo explante. El fenómeno de oxidación fue más evidente en los explantes provenientes de plántulas tipo B (144 explantes oxidados de 180), para los explantes tipo A se oxidaron 130 de los 180 explantes cultivados. Afectando principalmente a los explantes cultivados en medio con 0/0, 0/1 y 0/2.

Estos resultados se asemejan a lo reportado por Gómez (2009), quien en cultivos de raíz de *Laelia gouldiana*, observó que la mayor incidencia de oxidación la obtuvo en el tratamiento adicionado con 0.5 mg/l de BAP en ausencia de ANA, donde 19 de 20 explantes se

oxidaron, este resultado lo atribuyó a que las citocininas estimulan la síntesis de compuestos fenólicos. Lo anterior también se ha reportado en medios de cultivo enriquecidos con kinetina, donde se incrementó la oxidación (Zaid, 1987).

A este tiempo, los explantes que no se oxidaron mantuvieron las características iniciales y sólo tendieron a elongarse. Por ejemplo en el tratamiento control la mayoría alcanzó una elongación de 4 cm, en 0.5/1 se obtuvo un crecimiento máximo de 8 cm de largo y en 0.5/1 se obtuvo la elongación más prominente a 180 dds alcanzó 11 cm, de acuerdo a los resultados obtenidos, tal parece que la interacción de ambos reguladores puede tener un efecto sinérgico en el incremento de elongación y el control del desarrollo de raíces (Coenen and Lomax, 1997; Nordström *et al.*, 2004).

En la literatura se menciona que las secciones de raíz se han utilizado en el cultivo *in vitro*, 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 probablemente se debe a que las células que conforman el ápice de raíz, son altamente determinantes y diferenciadas hacia una vía del desarrollo (Vaz *et al.*, 1998), por lo que la conversión de meristemo de raíz hacia meristemo de brote es poco frecuente (Peres y Kerbauy, 1999). Sin embargo y pese a lo anterior, la regeneración de cuerpos vegetativos 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).

La respuesta nula en esta investigación en ápices de raíz, puede deberse a los reguladores del crecimiento, ya que en los reportes, con respuesta regenerativa, se han utilizado otro tipo de señalizadores químicos, Park y cols (2003), emplearon en *Doritaenopsis*, TDZ; mientras que Vaz *et al.* (1998) en *Catasetum fimbriatum*, 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 misma. Esto sugiere que las auxinas estimulan el crecimiento y alargamiento celular, en cultivos de raíz (Jankiewicz, 2003; Tinoco, 2006).

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 la planta.

Además hay que recordar que los tres tipos de explantes (raíz, tallo y hoja) son diferentes y por lo tanto tienen anatomía y funciones distintas, la raíz por ejemplo tiene una función de fijación, almacenamiento, conducción y absorción. Las raíces se encuentran formadas por diferentes estructuras, el ápice de la raíz está cubierto por células parenquimáticas que constituyen la caliptra o cofia. Debajo de ésta se encuentra el meristemo apical de la raíz (Strasburger *et al.*, 2004), donde las células tienen mayor actividad mitótica por lo que ha sido denominada una región de división celular. Más allá de este punto disminuye la actividad pero se incrementa la tasa de crecimiento de estas células. A esta zona se le conoce como la zona de crecimiento de elongación (Pimienta *et al.*, 2006). Quizá debido a estas características se elongó la raíz pero no tuvo éxito la formación de PLB's.

Fase de individualización.

Después de la fase de inducción (180 días) cada uno de los PLB's obtenidos a partir de los diferentes explantes de *B. whartonianana* y *B. scandens*, fueron individualizados y subcultivados en medio MS 50% y MS sin reguladores de crecimiento. A 60 días después de la fase de inducción los PLB's se desarrollaron hacia la formación de plantas completas con una altura promedio de 4-5 cm, con hojas de 3-4 cm y raíces de 6-8 cm bien definidas. A los 90 días continuaron su crecimiento, y tenían un promedio de 8-9 cm, con hojas que median 4-5 cm, raíces muy prominentes de un tamaño aproximado de 10-12 cm.

La formación de raíces muy largas y anchas en las plántulas obtenidas, resulta una respuesta favorable para su posterior supervivencia en condiciones *ex vitro*, pues permite una mayor absorción de agua y nutrientes necesarios para continuar su desarrollo. En la naturaleza las especies de este género tienden a formar raíces gruesas, debido a que en una etapa de su ciclo de vida pierden las hojas, dejando a las raíces como órganos fotosintéticos que almacenan los nutrientes y agua para su supervivencia en condiciones de sequía (Soto y Solano, 2007)

Por su parte los explantes de raíz de *B. scandens* que no se oxidaron en la fase de inducción, fueron subcultivados a medio MS 50% y MS sin reguladores del crecimiento,

mostraron una apariencia saludable con pigmentos verdes, esta transferencia no propició un aumento considerable de crecimiento, se obtuvo una longitud máxima de 13 cm en el tratamiento 0.5/1 a los 90 días después de la inducción (Fig. 21); sin embargo los explantes que se encontraban en el tratamiento control, cuando se transfirieron a medio fresco se elongaron un máximo de 6 cm, con un tamaño de registro final de 7 cm, lo que pudo deberse a la fuente de carbono, la cual se ha visto que participa en la expansión celular (Vaz *et al.*, 1998). Resultados similares fueron reportados por Gómez (2009), quien cultivó ápices de raíz de *Laelia gouldiana*, obteniendo un alto porcentaje de oxidación.

En nuestros experimentos, no fue necesario inducir el enraizamiento de los PLB's formados, ya que al ser estructuras bipolares (meristemo apical y meristemo radicular) tienen la capacidad de desarrollar raíces una vez que los rizoides pierden su actividad nutritiva. La individualización de los PLB's obtenidos permitió que pudieran desarrollarse a una mayor velocidad y que formaran nuevas hojas y raíces, pues ya no se encontraban compitiendo por el espacio y los nutrientes como cuando estaban unidos entre sí.

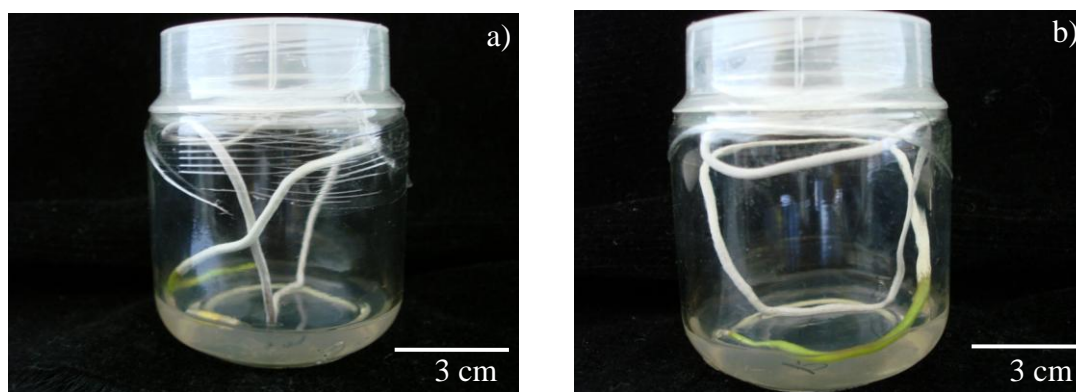


Figura 21. Elongación de explantes de raíz. a) *B. whartonian* b) *B. scandens* a los 90 días después de 180 días de inducción hormonal, transferidos a medio fresco sin hormonas.

El uso de biotecnología por cultivo de tejidos *in vitro*, puede substituir al hongo que en condiciones naturales ayuda a la germinación de las semillas (Crafts and Miller, 1974; Masuhara y Katsuya, 1989; Wilkinson *et al.*, 1989). El cultivo de tejidos vegetales para fines de conservación tiene la finalidad de desarrollar técnicas para la multiplicación y reforestación, de plantas en peligro de extinción, abasteciendo al mercado de comercio legal, con el propósito de disminuir el saqueo y venta ilegal (Ibarra-Zapata, 2008).

Fase de aclimatización.

En ambas etapas de aclimatización, el resultado fue favorable, permitiendo la adaptación y desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*; durante los primeros 3 meses se marcó un punto crítico de supervivencia en donde 20% de las plantas no superaron la primera etapa de aclimatización, después de 4 meses de haber sido transferidas a condiciones *ex vitro* las plantas aclimatizadas de *B. whartonia* y *B. scandens* sobrevivieron exitosamente manteniendo el porcentaje de supervivencia de 80%, por lo que el sistema utilizado para su aclimatización resultó eficaz.

Los riegos espaciados en la etapa de aclimatización resultaron satisfactorios ya que esto permitió un mayor tiempo de absorción del agua y por ende un buen uso de este recurso; sin embargo una saturación hídrica conllevó a la pudrición de las raíces, por lo que finalmente se conservó el tiempo de riegos durante el periodo de aclimatización.

El sustrato empleado, en la primera etapa de aclimatización (mezcla de peat-moss, corteza de pino y agrolita en proporción 2:2:1 v/v) para ambas especies fue útil para lograr un índice de supervivencia significativo ya que la mezcla de estos tres elementos permitió el mantenimiento de humedad y aireación sin una compactación excesiva del sustrato.

Para la segunda etapa, el aumento de un elemento al sustrato (mezcla de peat- moss, corteza de pino, agrolita y tepojal en proporción 1:1:1:2 v/v) en ambas especies ayudó a un mayor crecimiento ya que éste complementó la nutrición mineral necesaria para su desarrollo y adaptación en el invernadero, además de que se mantuvo la aireación que se tradujo a una baja compactación del sustrato (Fig.22). Estos resultados en conjunto, sugieren que las plántulas micropropagadas de *B. whartonia* y *B. scandens*, con un tamaño superior a 8 cm, y con un número de hojas y de raíces (más de 4), colocadas en un ambiente controlado, por lo menos 90 días una vez iniciado el proceso de aclimatización lograran un índice de supervivencia aproximado al 80%.

En la literatura existen reportes en donde el éxito de aclimatización se ve influenciado tanto de la especie como de los tamaños y proporciones de las plantas *ex vitro* así como las medidas precautorias para evitar al máximo la pérdida de plántulas *ex vitro*, por ejemplo, Suárez (2006), en la fase de aclimatización, reportó para plantas obtenidas a partir de mitades de protocormos (apicales y basales) de *Prosthechea mariae*, después de 9 meses de cultivo *in vitro*, una altura promedio de 4-6 cm, hojas (4-5 cm), raíces (5-6 cm) y un

pseudobulbo (1 cm) logrando establecerlas en condiciones *ex vitro*, montadas sobre un tronco con una mezcla de peat moss/agrolita (3:1) con un porcentaje de supervivencia cercano al 100%, en el caso de lo reportado por este autor, aun cuando las plántulas fueron de menor tamaño, que lo reportado en esta investigación, el índice que logro se puede atribuir entre otros factores al tallo modificado (pseudobulbo) de la especie estudiada, que probablemente le ayudó como un reservorio orgánico durante el proceso de supervivencia y adaptación.

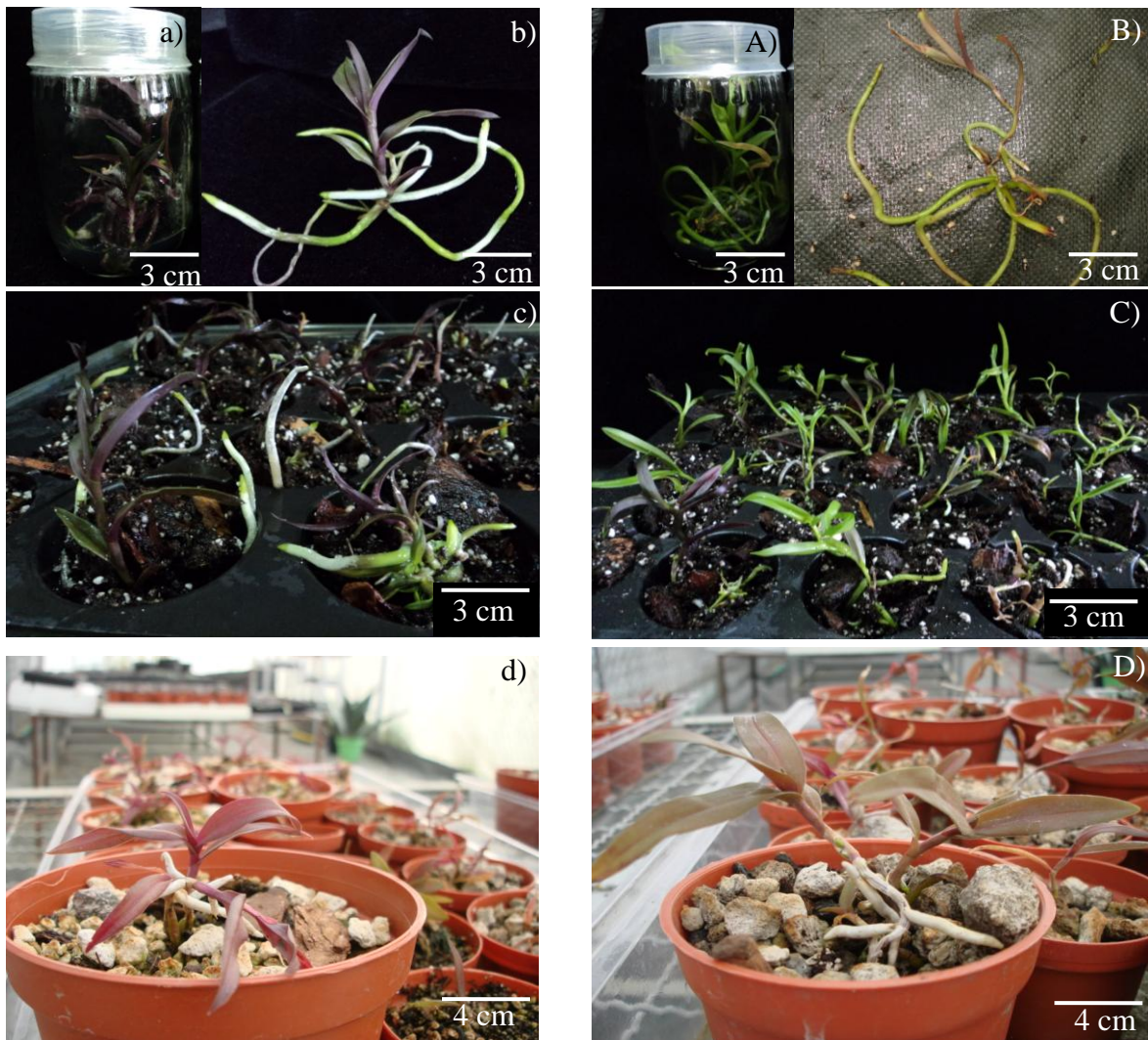


Figura 22. Acclimatización de *Barkeria scandens*: a,b, c, d. y *Barkeria whartonianana* A, B, C, D. a y A) Plántulas en condiciones *in vitro*. b y B) Plántulas *ex vitro*, después de 9 meses en condiciones *in vitro*. c y C) Plantas en la primera etapa de acclimatización a 2 meses después de condiciones *in vitro*. d y D) Plantas en la segunda etapa de acclimatización a los 4 meses de condiciones *ex vitro*.

Para evitar la pérdida de humedad Chávez (2008) reportó, para *Stanhopea tigrina*, que en charolas de plástico transparente y una mezcla de peat-moss y agrolita (3:1) las plantas se adaptaron y se desarrollaron 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 retención de humedad, además de que incrementa la supervivencia y disminuye la pérdida de hojas, raíces y favorece su elongación (De la Cruz, 2006; Sierra, 2006).

Las plántulas desarrolladas *in vitro*, están continuamente expuestas a un microambiente, que ha sido seleccionado para proveer el mínimo estrés y las óptimas condiciones para su multiplicación, además se encuentran en un medio con abundantes compuestos orgánicos, especialmente sacarosa, y a su vez en una atmósfera con altos niveles de humedad, baja intensidad luminosa, temperatura constante y escaso intercambio gaseoso, por lo que al ser transferidas a condiciones ambientales en donde la humedad atmosférica es más baja y la intensidad luminosa es mayor, pierden agua rápidamente (Agramonte *et al.*, 1998; Hazarika, 2003). Por lo tanto, la aclimatización de plantas *in vitro* a las condiciones naturales, es un paso crítico para muchas especies, ya que estas plantas muestran un rápido marchitamiento cuando se transfieren a condiciones de invernadero, por lo tanto debe mantenerse una humedad relativamente alta en el nuevo ambiente, para no dañar los mecanismos que mantienen el volumen de agua en la planta (Fila *et al.*, 1998).

El sustrato es uno de los elementos más importantes para el buen cultivo y crecimiento de las orquídeas; el peat-moss (*Sphagnum*), se ha visto que proporciona ciertas ventajas para el cultivo de las orquídeas, debido a que mejora el crecimiento de las raíces y tallos, es muy ligero, retiene en gran parte la humedad y a su vez permite la aireación de las raíces (Moss, 1955; citado por Poole y Sheehan, 1977). Esto coincide con lo reportado por Sierra (2006), para *Laelia autumnalis*, donde se evaluaron varias mezclas de sustratos en la aclimatización de plántulas resaltando la mezcla de peat moss/agrolita, en esta combinación se obtuvo el mayor índice de supervivencia al cabo de 90 días (63%), así como el mayor incremento en biomasa de hojas, raíces y tallos. Por su parte Gómez (2009) logró la aclimatización de plántulas de *L. gouldiana* obtenidas de cultivo *in vitro*, los mejores resultados los obtuvo con la mezcla de peat moss/agrolita (3:1), logrando un 98.7% de supervivencia después de 150 días de aclimatización. Por otro lado De la Cruz (2006) reportó que la mejor mezcla

para aclimatizar *Prosthechea vitellina*, fue la que contenía corteza de encino/peat mos. 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 tienen de retener humedad, además de que permite una buena aireación en las raíces (Chávez, 2008).

Hay otros sustratos que permiten la aclimatización de plántulas provenientes de cultivos *in vitro*, como troncos de tepozán. Barrera (2006), registró 100% de supervivencia en plantas de *L. speciosa*, establecidas sobre troncos de tepozán. Por lo que en futuras investigaciones es factible emplear otros sustratos así como otras combinaciones de los mismos. En muchas especies, las hojas y raíces formadas *in vitro*, no tienen la capacidad para seguir desarrollándose en condiciones *ex vitro*, por lo que son reemplazadas por la formación de nuevas hojas (Preece & Sutter, 1991; Dietrich *et al.*, 1992, citados por Pospíšilová *et al.*, 1999). En el presente trabajo, durante el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*, se observó la pérdida de algunas hojas provenientes del cultivo *in vitro*, así como el surgimiento de nuevas hojas más vigorosas y en algunas plantas se observó la formación de nuevos tallos.

Duración total de los cultivos *in vitro* y la producción de plántulas de *B. whartonia* y *B. scandens*.

La presente investigación abarcó la germinación y el cultivo de secciones longitudinales de protocormos de *B. whartonia* además, el cultivo de segmentos de hojas, tallos y ápices de raíz de *B. scandens* en medio MS 50% y MS, con la obtención final de plántulas completas. En las Tablas 20,21 se observa de manera general que, el tiempo que abarcó el desarrollo de las plantas de *Barkeria whartonia* (desde su germinación hasta su aclimatización) fue de 13 meses (410 días) y para *Barkeria scandens* (desde su inducción hormonal hasta su aclimatización) fue de 12 meses (360 días).

Esta investigación resultó en un protocolo eficiente para la propagación *in vitro* de *B. whartonia* y *B. scandens*, orquídeas endémicas de México, 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 su tasa de crecimiento sea muy lenta.

En la naturaleza menos del 5% de las semillas logran germinar, debido a que presentan pocas reservas de alimento y tienen un endospermo poco diferenciado, presentan una baja

polinización y fertilización de los óvulos, es difícil que caigan en lugares con condiciones de luz, acidez, humedad y materias nutritivas favorables y para germinar necesitan asociarse con un hongo micorrízico, que provea al embrión de nutrientes hasta que se formen plantas que sean capaces de fabricar su propio alimento.

La diversidad biológica es el recurso más valioso con el que se cuenta, por lo que el establecimiento de estrategias como las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son de vital importancia para su estudio, conservación y aprovechamiento. Pues a partir de esta biotecnología, es posible lograr la formación de plantas completas en un tiempo relativamente corto y más rápido en comparación de lo que ocurre en condiciones naturales (Suárez, 2006).

Tabla 20. Secuencia cronológica de desarrollo de *B. whartonia*, hasta lograr la formación de plantas completas a partir del cultivo *in vitro* de secciones longitudinales de protocormos en medio MS 50% y MS.

SIEMBRA DE SEMILLAS	Días
Germinación.	20
Formación de protocormos.	35
Protocormos con primordios foliares	50
CULTIVO DE SECCIONES LONGITUDINALES DE PROTOCORMOS	
Formación de PLB's y aparición de los primordios foliares en la región apical y de rizoides en la región basal.	60
PLB's con primordios foliares de 0.2-0.5 cm de Longitud y aparición de la primera raíz (0.1-0.5 cm).	120
PLB's con hojas de 0.5-1 cm de longitud y raíces de 1-2 cm.	180
INDIVIDUALIZACIÓN.	
Formación de plantas completas (3-4 cm de altura), con Hojas de 3-4 cm y raíces de 4-5 cm de longitud.	60
Formación de plantas con una altura promedio de 4-6 cm, con hojas (4-5 cm) y con raíces (6-8 cm)	90
ACLIMATIZACIÓN.	
Dos lotes de 20 plantas	90
Supervivencia	80 %

Tabla 21. Secuencia cronológica de desarrollo de *B. scandens*, hasta lograr la formación de plantas completas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de diferentes tipos de explante (tallo y hoja) en medio MS (50%) y MS.

CULTIVO DE SECCIONES DE DIFERENTES EXPLANTES DE TALLO Y HOJA.	Días
Formación de PLB's y aparición de los primordios foliares en la región apical y de rizoides en la región basal.	60
PLB's con primordios foliares de 0.2-0.5 cm de aparición y longitud de la primera raíz (0.1-0.5 cm).	120
PLB's con hojas de 0.5-1 cm de longitud y raíces de 1-2 cm.	180
INDIVIDUALIZACIÓN.	
Formación de plantas completas (3-4 cm de altura), con hojas de 3-4 cm y raíces de 4-5 cm de longitud.	60
Formación de plantas con una altura promedio de 4-6 cm, con hojas (4-5 cm) y con raíces (6-8 cm)	90
ACLIMATIZACIÓN.	
Dos lotes de 20 plantas	90
Supervivencia	80%

Análisis estructural de los regenerantes de *B. whartonia* y *B. scandens*.

El análisis estructural realizado, indica que las estructuras obtenidas (PLB's) a partir del cultivo *in vitro* de las secciones longitudinales de protocormos de *B. whartonia*, y de las secciones de hoja de *B. scandens*, en medio de cultivo MS 50% y MS, son embriones somáticos, por lo que la vía morfogénica obtenida fue embriogénesis somática directa.

En las estructuras obtenidas de los regenerantes a los 60 días de cultivo, se pudieron observar estructuras globulares en distintas etapas de desarrollo, que surgieron de la periferia del tejido inductor, probablemente a partir de las células epidérmicas o subepidérmicas del tejido (secciones de protocormos para *B. whartonia* y hoja para *B. scandens*) (Fig. 23 y 28).

En las estructuras globulares identificadas, a los 80 dds, en los explantes de *B. whartonia*, se observó un estrato periférico bien definido, evidenciando la formación de la protodermis (Fig. 24). La formación de este estrato celular es considerado como la primera evidencia de histodiferenciación dentro del embrión (Steeves y Sussex, 1989). Así mismo se observó un adelgazamiento hacia la base de las estructuras globulares obtenidas, lo cual nos podría indicar probablemente la formación de un suspensor, constituido por células alargadas, con núcleos poco evidentes, de pared delgada y con gran cantidad de contenidos celulares (Fig. 24b).

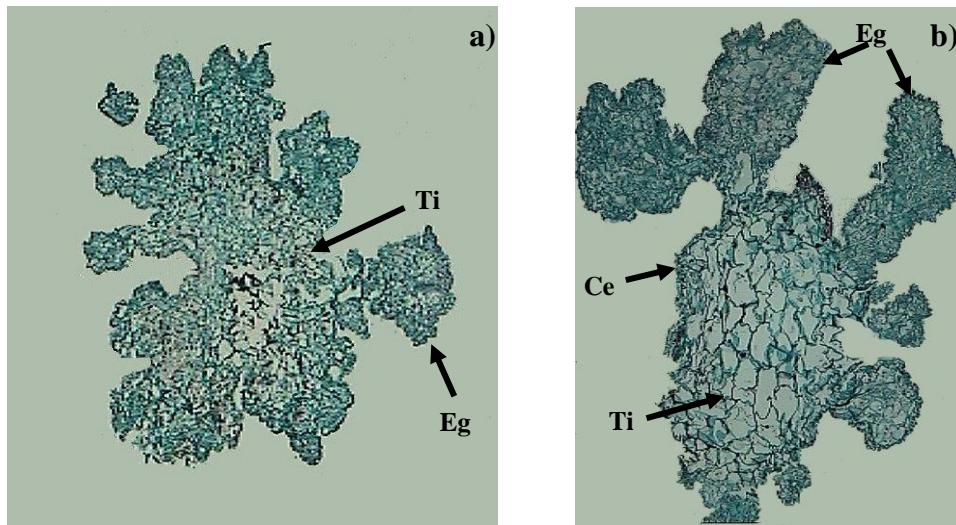


Figura 23. Cultivo *in vitro* de secciones longitudinales de protocormos de *Barkeria whartonia* en medio MS adicionado con 0.5 mg/l ANA con 1 mg/l BAP, a los 60 días de iniciados los cultivos. a) Brotación múltiple, vista panorámica x25. b) Brotación múltiple de estructuras semi globulares a partir de las células epidérmicas del tejido inicial x50. Abreviaturas: Ti= Tejido inicial, Eg= Estructura globular, Ce= Células epidérmicas.

(Fig. 25a) Otra característica en éstas estructuras globulares, fue una polaridad dada por los contenidos celulares dentro de los regenerantes, es decir, hacia la región apical de las estructuras globulares identificadas a los 80 dds, se apreciaron células pequeñas con pocos contenidos celulares, mientras que hacia la región basal y hacía el suspensor se observaron gran cantidad de éstos, y de mayor tamaño. Respecto al tamaño y forma de las células, se identificaron dos tipos: hacia la región apical se observaron células pequeñas de formas rectangulares, mientras que en la región basal se encontraron células de mayor tamaño y de forma isodiamétrica.

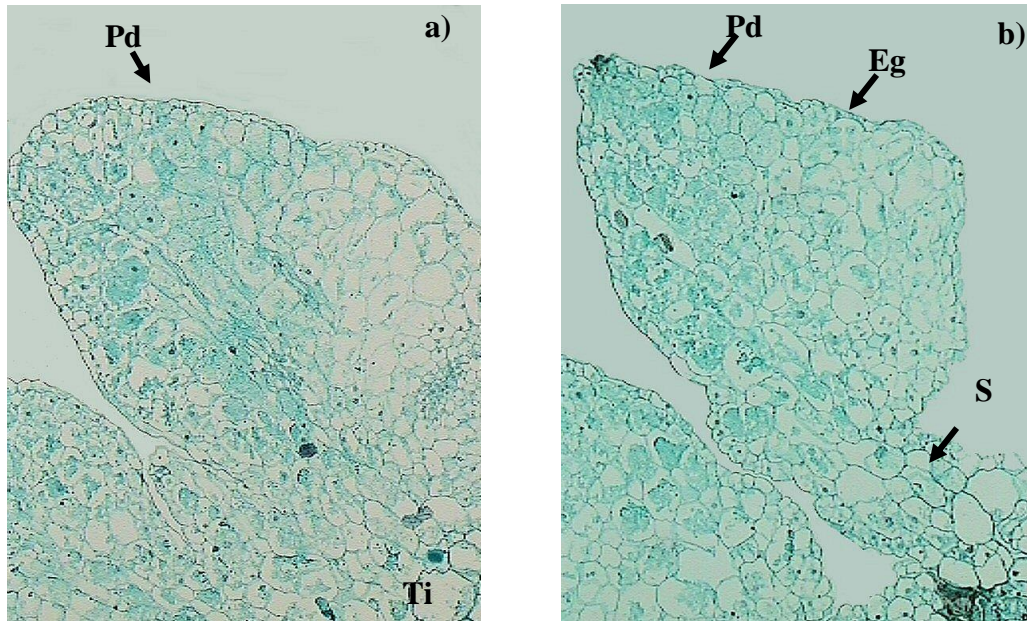


Figura 24. Secciones longitudinales de estructuras globulares, obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *Barkeria whartoniana* en medio MS adicionado con 0.5 mg/l ANA con 1 mg/l BAP, a los 80 días de iniciados los cultivos. a) Formación de protodermis hacia la periferia x100, b) Formación del suspensor hacia la zona basal x100. Abreviaturas: Pd= Protodermis, Ti= Tejido inicial, Eg= Estructura globular, S= Suspensor.

(Fig. 26) Hacia la región apical, se hizo evidente una zona meristemática, constituido por células pequeñas, densamente teñidas, en activa división celular. (Fig. 25c y d) A ese tiempo comenzó a observarse una zona central, constituida por células delgadas, alargadas con posición vertical con respecto al resto de las células del regenerante, densamente teñidas, formando el procámbium, el cual dará origen al tejido vascular. Hasta esta etapa del desarrollo de los PLB's, los tres principales tejidos (dérmico, vascular y fundamental) se han iniciado. A los 90 días de cultivo, en la parte apical de las estructuras globulares, se observó la formación de una protuberancia (meristemo apical) (Fig. 25c y d), a los 95 días en la parte basal de los embriones se hizo visible la formación de rizoides, (Fig. 27a y c) los PLB's continuaron su desarrollo y a los 100 días se diferenciaron sus respectivos primordios foliares (Fig. 27b).

En el estudio estructural, no fue posible evidenciar el desarrollo y ubicación del meristemo radicular, que corresponde a la última fase de desarrollo, de las plántulas, sin embargo se considera que las características antes mencionadas, sirven como base para fundamentar, que en *B. whartoniana* la vía morfogénica lograda, fue embriogénesis somática directa.

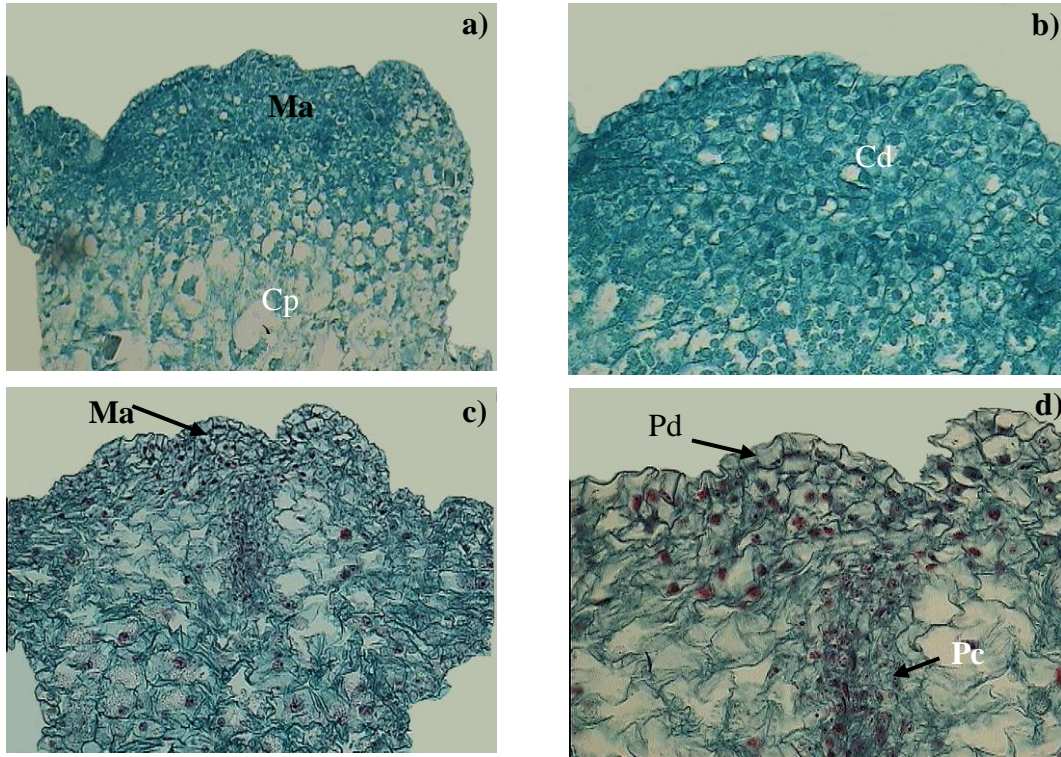


Figura 25. Secciones longitudinales de estructuras globulares, obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *Barkeria whartoniiana* cultivadas en medio MS en 0.5/ 1 ANA/ BAP mg/L a los 80 dds. a) y b) Formación de meristemo apical del brote, característico por alta división celular y núcleos prominentes x100, x200. c) y d) Formación del procambium hacia la región central x200, x400. Abreviaturas: Mab= Meristemo apical, Cp= Células parenquimáticas, Cm= Células meristemáticas, Pd= Protodermis, Pc= Procambium.

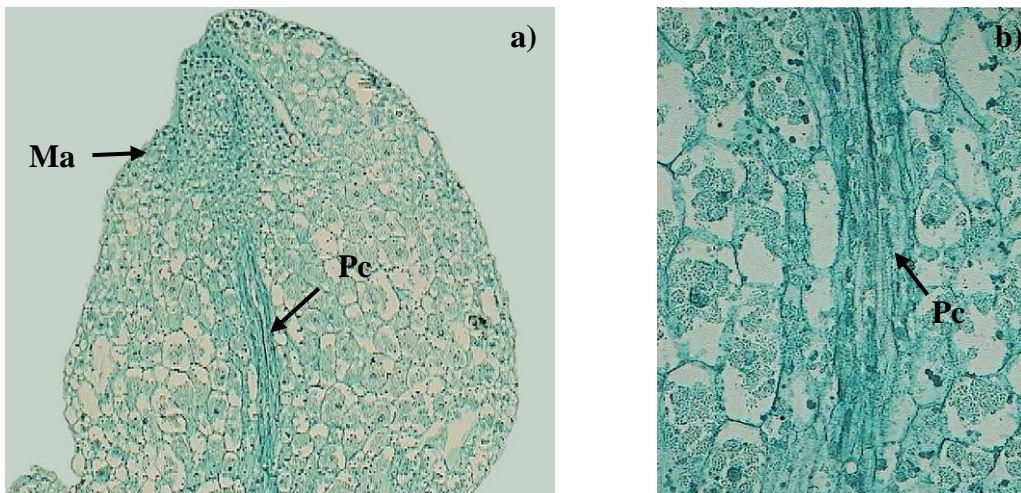


Figura 26. Sección longitudinal de PLB, obtenida a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *Barkeria whartoniiana* cultivadas en medio MS en 0.5/ 1 ANA/ BAP mg/L a los 90-100 dds a) PLB con zona meristemática (meristemo apical) y desarrollo del procambium x100, b) contenidos celulares y formación del procambium x400. Abreviaturas: Ma= Meristemo apical Pc= Procambium.

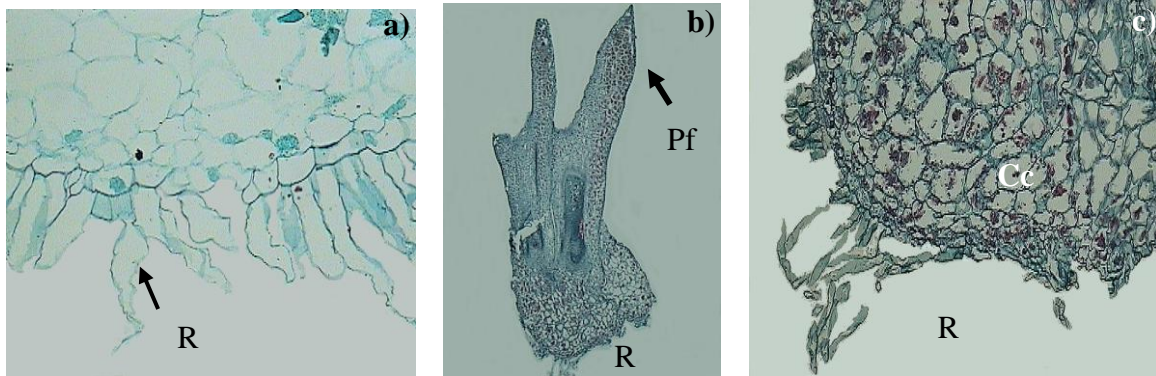


Figura 27. Secciones longitudinales de PLB's, obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *Barkeria whartoniiana* cultivadas en medio MS en 0.5/ 1 ANA/ BAP mg/L a los 120 dds. a) Formación de rizoides en la parte basal del PLB x200, b) PLB, con sus respectivos primordios foliares en la parte apical y en la parte basal vestigios de rizoides x40, c) Acercamiento de la parte basal del PLB, mostrando contenidos celulares y rizoides x100. Abreviaturas: R=Rizoides, Pf= Primordios foliares, Cc= Contenidos celulares.

(Fig. 28) En los regenerantes de *Barkeria scandens* se obtuvieron las mismas evidencias que las encontradas en *B. whartoniiana*. Para representar gráficamente el desarrollo estructural de los PLB's, se tomaron muestras de los explantes de hoja tipo A, en medio MS, adicionado con 0.5 mg/l de ANA con 2 mg/l de BAP. A los 60 días de cultivo, a partir de secciones histológicas obtenidas de los regenerantes, se observó la presencia de estructuras globulares (embriogénesis somática directa) en distintas etapas de desarrollo, que surgieron de manera directa a partir de las células epidérmicas del tejido inductor (en este caso, de células epidérmicas de las secciones de hoja)

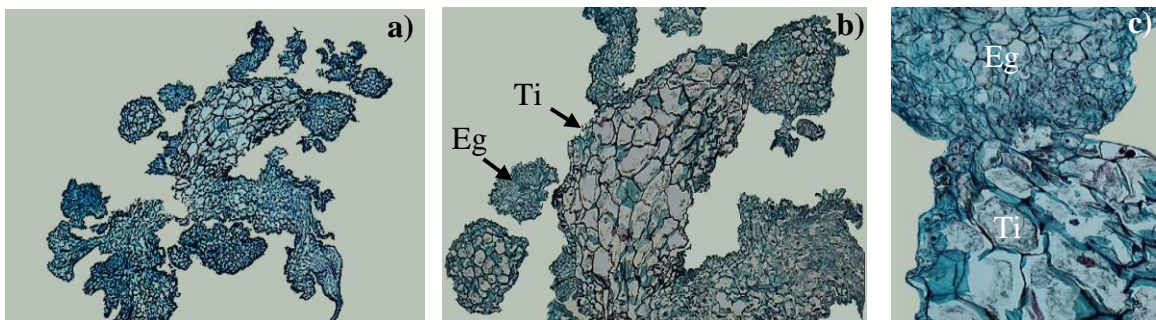


Figura 28. Secciones longitudinales de estructuras globulares obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de hoja de *Barkeria scandens* en medio MS con 0.5/2 ANA/BAP mg/L a los 60 dds. a) Brotación múltiple, vista panorámica x25. b) Estructura globular en desarrollo x50 c) Brotación de estructura globular a partir de las células epidérmicas del tejido inicial x100. Abreviaturas: Eg=Estructura globular, Ti= Tejido inicial.

(Fig. 29a) Al inicio de la formación de éstas estructuras globulares identificadas (60 dds), se observaron pequeñas células en intensa división y crecimiento celular, con un núcleo prominente y grande, la forma de las células era rectangular, a diferencia de las células del tejido inicial que eran grandes y de forma isodiamétrica. (Fig. 29b y c) A los 70 dds, la apariencia de las estructuras globulares cambió notablemente, en ellas se observaron células en un estrato bien definido, dispuestas hacia la periferia evidenciando la formación de un estrato (uniestratificado) de células formando la protodermis.

Así mismo, se observó un adelgazamiento y reducción de tamaño hacia la base de las estructuras globulares, lo cual nos indica la formación de un posible suspensor (Fig. 29d), constituido por células alargadas, con núcleos poco evidentes, y con gran cantidad de contenidos celulares indeterminados. (Fig. 29c y d) Otra característica en éstas estructuras globulares, fue una polaridad dada por los contenidos celulares dentro de los regenerantes, es decir, hacia la región apical de las estructuras globulares identificadas a los 80-90 dds, se apreciaron células pequeñas con pocos contenidos celulares, mientras que hacia la región basal y hacía el suspensor se observaron gran cantidad de éstos, y de mayor tamaño. Respecto al tamaño y forma de las células, se identificaron dos tipos: Hacia la región apical se observaron células pequeñas de formas rectangulares, mientras que en la región basal se encontraron células de mayor tamaño y de forma isodiamétrica (Fig. 29d). Hacia la región apical, se hizo evidente una zona meristemática, constituido por células pequeñas, densamente teñidas, en activa división celular.

(Fig. 29c) Además comenzó a observarse una zona central, constituida por células delgadas, alargadas con posición vertical con respecto al resto de las células del regenerante, densamente teñidas, formando el procámbium, el cual dará origen al tejido vascular. Hasta esta etapa del desarrollo de los PLB's, los tres principales tejidos (dérmico, vascular y fundamental) se han iniciado.

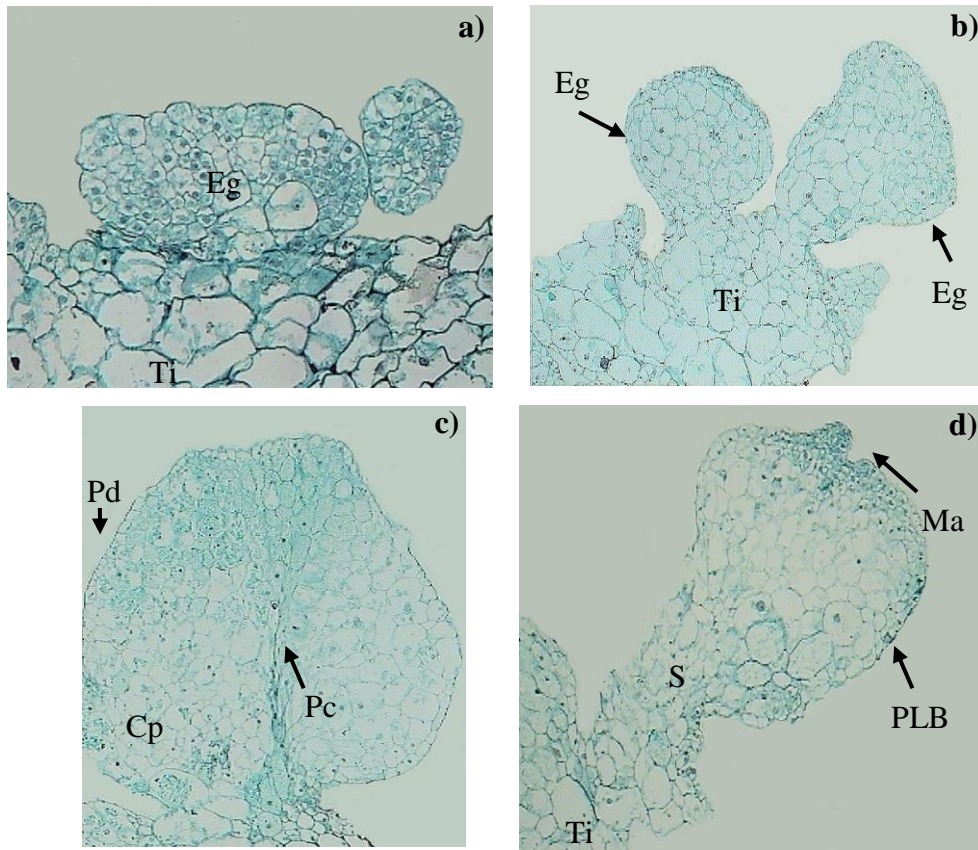


Figura 29. Secciones longitudinales de estructuras globulares, obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de hoja de *B. scandens* en medio MS con 0.5/2 ANA/BAP mg/L a los 60, 70, 80 y 90 dds. a) Estructura globular emergiendo del tejido inicial, a partir de las células epidérmicas x200, b) Estructuras globulares con protodermis bien definida x200. c y d) Estructura globular conectada por medio del suspensor a la periferia del tejido inductor x100, x200. Abreviaturas: Eg=Estructura globular, Ti=Tejido inicial, Pd=Protodermis, Cp= Células parenquimáticas, Pc=Procambium, Ma= Meristemo apical, S=Suspensor, PLB= Protocorm Like Bodie.

(Fig. 30a y b) A los 90-100 días de cultivo, en la parte apical de las estructuras globulares, se observó la formación de una protuberancia (meristemo apical), a los 95 días en la parte basal de los embriones se hizo visible la formación de rizoides, (Fig. 28 a y b), los PLB´s continuaron su desarrollo y a los 100-120 días se diferenciaron sus respectivos primordios foliares (Fig. 31c).

En el estudio estructural, no fue posible evidenciar el desarrollo y ubicación del meristemo radicular, que corresponde a la última fase de desarrollo, de las plántulas, sin embargo se considera que las características antes mencionadas, sirven como base para fundamentar, que en *B. scandens* la vía morfogenética lograda, fue embriogénesis somática directa.

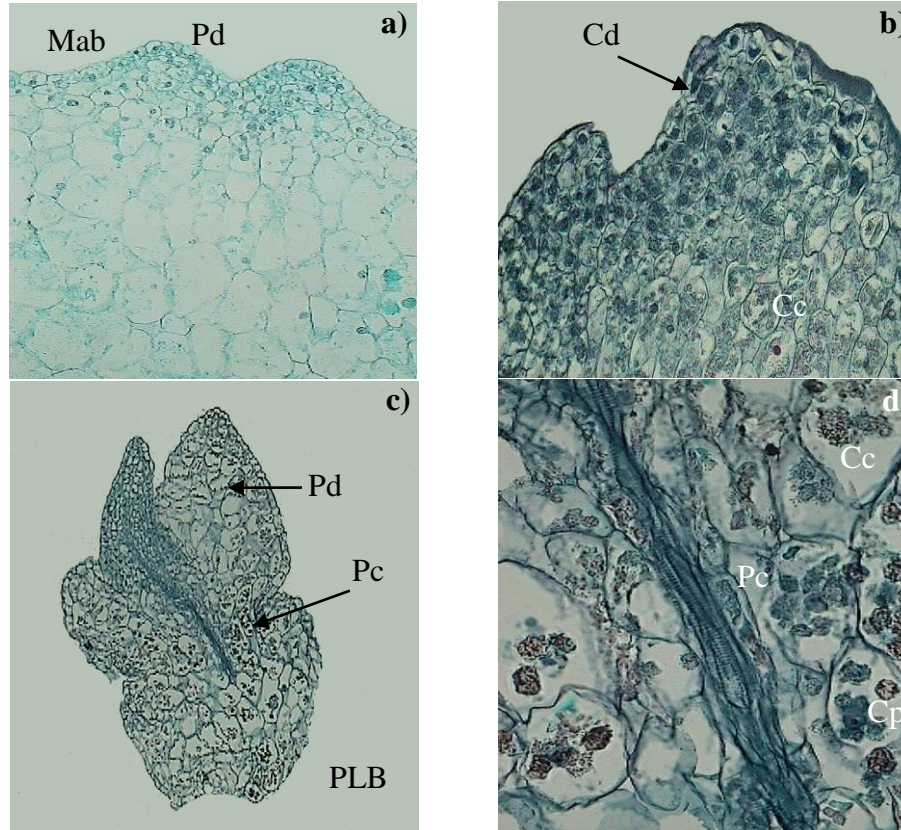


Figura 30. Secciones longitudinales de estructuras PLB's, obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de hoja de *B. scandens* en medio MS con 0.5/2 ANA/BAP mg/L a los 100 dds. a) Formación del meristemo apical del brote b) células en división celular, c y d) Diferenciación del procámbium hacia la zona central. Abreviaturas: Cp= Células parenquimatosas, Mab= Meristemo apical del brote, Cd= Células en división, Cc= Contenidos celulares, PLB= Protocormo, Pd=Protodermis.

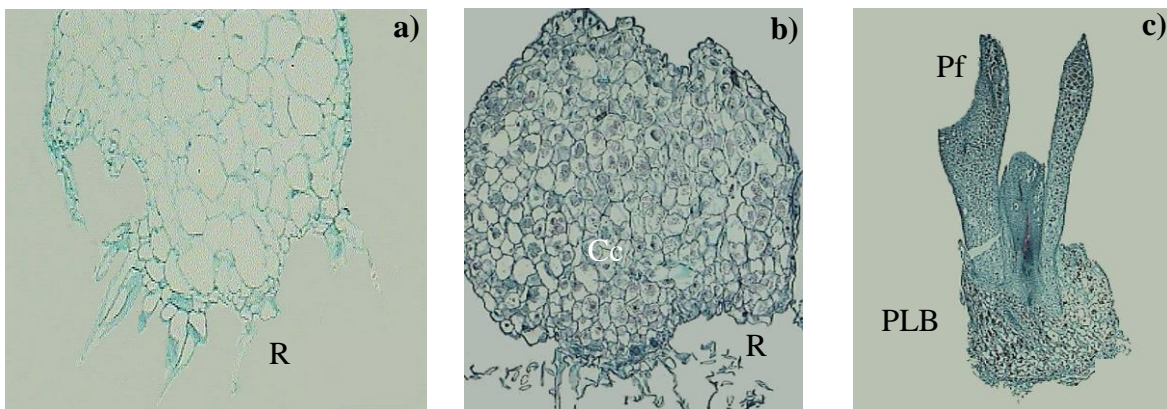


Figura 31. Secciones longitudinales de PLB's, obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *B. scandens* cultivadas en medio MS en 0.5/ 2 ANA/ BAP mg/L a los 120 dds. a y b) Formación de rizoides en la parte basal del PLB x100, x100, c) PLB, con sus respectivos primordios foliares en la parte apical y en la parte basal vestigios de rizoides, x40. Abreviaturas: R= Rizoides, Pf= Primordios foliares, Cc= Contenidos celulares.

La embriogénesis somática es el proceso por medio del cual una sola célula o un grupo de células no sexuales (somáticas) dan lugar a la formación de un embrión sin la necesidad que ocurra la fusión de gametos (Abdelnour y Escalante, 1994). En el cultivo *in vitro* de orquídeas se presentan cuerpos parecidos a protocormos (protocorm like bodies = PLB's), los cuales pueden formarse de manera directa a partir del explante o indirectamente de callo o en cultivos en suspensión (Ramírez, 1990). Varios investigadores han sugerido que la formación de PLB's en cultivos de orquídeas es una manifestación de la embriogénesis somática (Steward and Mapes, 1971; Kerbauy, 1993; Begum *et al.*, 1994; citados por Chen *et al.*, 1999).

No obstante la formación de embriones somáticos no ha sido bien documentada para las orquídeas. Existen muy pocos reportes en la literatura que provean evidencia de esta vía de desarrollo para estas plantas: a) Se ha reportado la formación de PLB's a partir del cultivo de callo de *Phalaenopsis* en un medio adicionado con agua de coco (Isshi *et al.*, 1998), b) la formación de embriones globulares bien definidos, a partir de callo formado de secciones de rizoma de *Cymbidium ensifolium* var "*misericors*", en un medio adicionado con TDZ y 2-4 D (Chang y Chang, 1998) y la c) formación de PLB's a partir del cultivo de callo de "*Oncidium* Grower Ramsey"(Chen and Chang, 2000). Además, dos datos recientes con los que se cuenta, son: el reportado por Barrera (2006), quien observó la formación de estructuras globulares a partir del cultivo de callo de *Laelia speciosa*. En todos estos casos, la formación de callo estuvo involucrada como una etapa intermedia para la formación de PLB's. Y el último dato con el que se cuenta es el reportado por Suárez (2007), quien observó la formación directa de PLB's a partir del cultivo *in vitro* de secciones basales y apicales de protocormos de *Euchile mariae*. En este último caso, se generaron los embriones somáticos de manera directa del explante. Sin embargo, son muy pocos los trabajos que reportan la formación de embriones somáticos de manera directa y su análisis estructural.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Suarez (2009), quien al cultivar *in vitro* secciones de protocormos de *Euchile mariae* en medio nutritivo, observó la formación de nuevos PLB's a partir de su región epidérmica del explante. A partir de un estudio anatómico la misma autora mostró que las divisiones celulares en los protocormos están limitadas a los estratos más externos ya que las células generalmente comienzan a dividirse

en el estrato epidérmico. Estas divisiones dan lugar a la formación de un agregado de 2 a 6 células que aparecen al azar en la superficie del protocormo. Estos agregados formados por células meristemáticas pequeñas son muy activos y en pocos días formaran pequeños PLB's.

Varios autores reportan en la literatura que un somático se define como una estructura bipolar con eje radical- apical, que presenta autonomía frente al tejido generador y está protegido generalmente por una epidermis, además no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este, conservando su capacidad para crecer y diferenciarse hasta formar una planta completa bajo condiciones adecuadas de cultivo (Sannasgala, 1989; Escalant y Teissont, 1989; Gómez, 1998; Thorpe y Stasolla, 2001; Razdan, 2002; citados por Suarez, 2006). En el presente estudio todas esas características fueron observadas por medio de los cortes estructurales en las estructuras globulares generadas, a partir de secciones longitudinales de protocormos de *B. whartonian*a y secciones de hoja de *B. scandens*, a excepción del meristemo radicular para ambas especies, ya que en ninguna de las etapas que se tomaron las muestras coincidió con esta última fase de desarrollo, sin embargo dado las demás características que se presentaron en las estructuras regeneradas, podríamos decir que, las estructuras globulares desarrolladas fueron embriones somáticos.

En la literatura se ha reportado que después de la germinación se forma una masa de células denominada protocormo, el cual puede diferenciarse a plántula o formar cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) (Arditti y Ernst, 1993).

Batygina *et al* (2003) observaron que la región apical está conformada principalmente por células pequeñas, las cuales darán lugar a la formación del ápice del brote; mientras que la parte basal está formada por grandes células parenquimatosas que dan lugar a las estructuras rizoidales y que tienen la función de un depósito orgánico. El protocormo se diferencia en una región apical, que consiste en pequeñas células que forman el ápice de brote y la parte basal conformada por grandes células parenquimatosas que funcionan como un “depósito orgánico” (Nava *et al.*, 2011; Free *et al.*, 2003).

Por ejemplo en *Aerides crispum*, se observaron estructuras globulares originadas en las capas subepidérmicas del protocormo, constituidas por células pequeñas, que después de desarrollarse formaban una protusión (Sheelavanthmath *et al.*, 2005).

La embriogénesis somática, es una importante aplicación del cultivo de tejidos vegetales, que permite la propagación masiva mediante la regeneración de embriones somáticos (ES) (Estructuras bipolares, independientes del tejido original) con alta capacidad reproductiva (George y Sherrington, 1984).

Lee *et al* (2010), en un análisis estructural que realizó de los regenerantes obtenidos a partir de callo de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*, encontró estructuras embriogénicas en los estadios globular, torpedo y plúmula. Encontrando que estas estructuras fueron de morfología similar a los embriones cigóticos durante la germinación de semillas de orquídeas, caracterizados por células con citoplasmas densos y masas de núcleos prominentes, característicos del tejido embriogénico.

En la presente investigación existió interacción entre los medios de cultivo y las combinaciones de fitohormonas utilizadas en la morfogénesis de *B. whartonianana* y *B. scandens*, lo que coincide con las observaciones de Lee *et al.* (2010) y Fehér *et al.* (2003), quienes con base en una prueba de una amplia gama de inductores concluyeron que la embriogénesis somática no puede definirse específica a uno o más reguladores del crecimiento, porque existen interacciones con los componentes del medio. Sin embargo las fitohormonas son los candidatos más viables en la regulación de señales del desarrollo, como indicaron Huan *et al.* (2004), en la formación de callo embriogénico en *Cymbidium*, donde las auxinas y citocininas fueron las principales hormonas involucradas en la regulación de la división celular.

En *Oncidium*, Chen and Chang (2000) reportaron el uso de ANA en combinación con TDZ, en explantes de hoja y ápices de raíz, para promover la formación de embriones somáticos a partir del callo.

Entre los factores que influyen en la inducción de la embriogénesis somática, se encuentran la edad, el estado fisiológico, el genotipo, la orientación del explante al estar en contacto con el medio de cultivo y la cantidad de hormonas que se sintetizan de manera endógena en los tejidos (Razdan, 2002), aunque también se ha observado que el desencadenamiento o la estimulación de la brotación en el cultivo *in vitro*, resulta del empleo de citocininas eventualmente asociadas con las auxinas (Margara, 1988). Esta vía de desarrollo puede ocurrir de manera directa o indirecta. En el primer caso, un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático directamente a partir del

tejido del explante, mientras que en la embriogénesis somática indirecta, las células del tejido sufren varias divisiones celulares hasta dar lugar a la formación de un callo, el cual por medio de estímulos, como la adición exógena de hormonas vegetales, dará lugar a la formación de embriones somáticos (Gómez, 1998). De acuerdo con Margara (1988), debido a la totipotencialidad de las células vegetales, la embriogénesis somática puede ser inducida a partir de diferentes tejidos, incluyendo, tallos, peciolo, raíces, hojas, inclusive protoplastos, entre otros. Sin embargo, los tejidos provenientes del embrión, son los que expresan frecuentemente la capacidad morfogenética para formar un embrión somático.

En esta investigación, los embriones somáticos obtenidos surgieron de manera directa a partir de los explantes de *Barkeria whartonianana* (secciones de protocormos) y *Barkeria scandens* (secciones de hoja y tallos de plántulas). Como los explantes utilizados provienen de tejidos muy jóvenes, presentan células determinadas preembriogénicamente hacia esta vía de desarrollo, por lo que al colocar los explantes, en un medio de cultivo, adicionado reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) se expresó su totipotencialidad para seguir un patrón de divisiones celulares hasta dar lugar a la formación de embriones somáticos. Se ha mostrado que el proceso de embriogénesis somática es inducido por los reguladores de crecimiento, especialmente las auxinas y citocininas. Las auxinas son requeridas para el establecimiento de la simetría bilateral durante los estados de desarrollo temprano del embrión (Liu *et al.*, 1993), además se ha visto, que constituyen un factor fuertemente asociado con la continua proliferación de las células embriogénicas (Gómez, 1998). Se reporta que altos niveles de auxinas inducen la formación de embriones somáticos, sin embargo, para que éstos continúen su desarrollo es necesaria una reducción de la concentración de las auxinas en el medio de cultivo (George & Sherrington, 1984). Mientras que, las citocininas son necesarias para inducir la división celular en los tejidos vegetales, además de promover la formación de brotes adventicios (Davis, 1995). Por tanto, el crecimiento y morfogénesis *in vitro* está regulado por la interacción y el balance adecuado entre ambos reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio de cultivo, así como por las hormonas vegetales producidas de manera endógena en los tejidos (George & Sherrington, 1984).

5. CONCLUSIONES.

Barkeria whartonia

- Se logró el establecimiento *in vitro* de las semillas con el método de desinfección obteniendo un éxito del 100%.
- Mediante la utilización del medio MS, se obtuvo un alto porcentaje de germinación mayor al 90% en las semillas.
- Se logró la regeneración de plantas completas al inducir embriogénesis somática a partir de secciones longitudinales de protocormos de *B. whartonia* en medio MS 50% y MS adicionados con reguladores del crecimiento.
- En cuanto a medio de cultivo, para inducir la formación de PLB's y para el crecimiento de las plántulas el medio MS resultó ser mejor con un promedio de 18.29 PLB's/ explante, en comparación al medio MS 50% con un promedio de 14.80 PLB's/ explante.
- El mejor tratamiento para obtener la mayor formación de PLB's en cultivo *in vitro* para esta especie se logró en el medio de cultivo MS, adicionado con 1mg/L de ANA más 1 mg/L BAP, alcanzando un total de 969 PLB's, con un promedio por explante de 48.45 ± 0.99 .

Barkeria scandens

- Se logró la regeneración de plantas completas al inducir embriogénesis somática a partir de secciones de hoja y tallo en medio MS 50% y MS adicionados con reguladores del crecimiento.
- El mayor número de PLB's se obtuvo empleando explantes de hoja y tallo de tamaño A (1-2 cm)
- El mayor número de regenerantes en explantes de hoja y tallo se obtuvo utilizando medio MS
- Para las secciones de hoja la mayor formación de PLB's por explante se generó de la interacción del tamaño A (1-2 cm), medio MS, y el tratamiento con 0.5 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP, formándose un total de 181 PLB's y un promedio de 18.1 ± 3.69 por explante.

- Las interacciones en secciones de hoja en donde no se obtuvieron regenerantes fueron con un tamaño A (1-2 cm) y B (3-4 cm), medio MS 50% y MS en ausencia de reguladores de crecimiento y en el tratamiento con 1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP.
- Para las secciones de tallo la mayor formación de PLB's por explante se generó de la interacción del tamaño A (1-2 cm), medio MS, y el tratamiento con 0.5 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP, formándose un total de 220 PLB's y un promedio de 22 ± 0.81 por explante.
- La interacción con el menor número de regenerantes en secciones de tallo fue con un tamaño B (3-4 cm), medio MS 50% y en ausencia de reguladores de crecimiento con 8 regenerantes totales y un promedio de 0.8 ± 1.032 PLB's por explante.
- En el cultivo de raíz la respuesta morfogénica se dirigió hacia la elongación de los explantes, esta no estuvo asociada a la presencia de los reguladores de crecimiento.
- A los 90 días después del periodo de cultivo *in vitro* (180 días) la mayor elongación del ápice de raíz se obtuvo en los explantes que estaban en el tratamiento 0.5/1 ANA/BAP mg/L transferidos a medio sin reguladores de crecimiento con un máximo de 13 cm.

B. whartoni* vs *B. scandens

- De los explantes empleados, las secciones longitudinales de protocormos de *B. whartoni*, mostraron una mayor capacidad morfogénica y regenerativa con respecto a las secciones de hoja y tallo de *B. scandens*, puesto que a partir de éstas se logró la mayor formación promedio de PLB's por explante (16.55 ± 11.76) después de 180 días de inducción hormonal.
- La oxidación se presentó como un factor importante en los cultivos de *B. scandens* afectando al 76.11% de explantes en cultivos de raíz seguido con un porcentaje del 48.88% en cultivo de hoja y 25.55% en cultivo de tallo, a diferencia de los cultivos de *B. whartoni* en donde este fenómeno no afectó la supervivencia y respuesta de los explantes.

- El sistema empleado para la aclimatización de estas orquídeas epífitas, rupícolas (macetas con una mezcla de Corteza de pino, Sphagnum, agrolita y tepojal 1:1:1:2), favoreció el establecimiento *ex vitro* y desarrollo de las plántulas obtenidas.
- Las plántulas obtenidas, al ser aclimatizadas mostraron un elevado porcentaje de supervivencia cercano al 80%.
- Por medio del análisis estructural se logró la identificación de estructuras bipolares (embriones somáticos), por lo que la vía de regeneración obtenida a partir de las secciones empleadas de *B. whartonia* y *B. scandens*, fue embriogénesis somática directa.
- Sé logró establecer un protocolo eficiente para la germinación asimbiótica y propagación masiva de *B. whartonia*, también se logró establecer el protocolo de propagación de *B. scandens*, ambas especies endémicas de México.
- Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran una alternativa viable y de gran utilidad para la micropropagación de otras especies de orquídeas que se encuentren amenazadas y/o en vías de extinción, contribuyendo a reducir la presión de sus poblaciones silvestres, ya que en un tiempo, relativamente corto, es posible lograr la germinación de semillas y/o la formación de plántulas completas a partir de explantes somáticos.

El CTV inicio como un conjunto de herramientas biotecnológicas aplicadas sólo por algunos biólogos para lograr la propagación de unas cuantas especies vegetales, hoy como lo ha señalado la ONU y CONACYT son reconocidas como una poderosa herramienta, que aporta la posibilidad de generar un gran número de plantas a partir de unos cuantos explantes. El uso del CTV se vuelve relevante en países en vías de desarrollo que aún cuando albergan una gran diversidad biológica, sus recursos naturales, particularmente especies vegetales, pocas veces son reintroducidos a sus hábitats naturales por una falta de planeación en el manejo y propagación. La única alternativa que podría tener la vida en el planeta es que la humanidad cambie hábitos y acciones, es decir deberá producir lo que consume. El presente estudio contribuye al conocimiento propagación, conservación y sienta las bases para el aprovechamiento sustentable de las especies estudiadas.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdelnour, A. Vicent. Escalant, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. Pc. 38.
- Angulo P. D. 2008. Una visión dentro de la Alianza *Epidendrum*: la filogenia de *Barkeria*. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, A. C.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev. 33: 1-82.
- Arditti, J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture a manual. pp. 204-293. In: Arditti, J. (Ed). Orchid Biology: Reviews and Perspectives I. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Arditti, J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 691 p.
- Arditti, J. and Ernst, R. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. pp.177-222 In: Arditti, J. (ed.). Orchid biology: Reviews and Perspectives, III. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Arditti, J. and Ernst, R. 1993. Micropropagation of Orchids. Wiley Interscience. New York. 682 p.
- Arditti, J. and Krikorian, A. D. 1996. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. Bot. J. Linn. Soc. 122: 183-241.
- Azcón-Bieto, J., M. Talon. 2001. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. Madrid-Barcelona pp. 430-433.
- Ávila Díaz, Y., y K. Oyama. 2002. Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Biodiversitas* 43: 9-12.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20:153-175.
- 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

- Baltazar, G. R. 2004. Micropropagación de *Oncidium tigrinum* Llave & Lex. (Orchidaceae) a partir de protocormos. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. 124 p.
- Barrera, V. D. 2006. Regeneración *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., (Orchidaceae) a partir de hojas inmaduras y callo. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 106 p.
- 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.
- Batygina, T.B.; Bragina E.A. y Vasilyeva V.E. 2003. “The reproductive system and germination in orchids”. Acta Biologica Cracoviensia; Series Botanica, 45(2); 21-34.
- Bell, A. D., y A. Bryan. 1991. Plant from- An illustrated Guide to Flowering Plant Morphology. Oxford University Press, Orford.
- Bernard, N.1899. Sur la germination du Neottia nidus-avis. C R Hebd Seances Acad Sci 128:1253–1255
- Bhadra, S.K. and Hossain, M.M. 2003. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (lam.) Schltr., and endangered orchid species. Plant Cell Tissue Organ Culture. 13(2):165-171.
- Brainerd, K. and Fuchigami, L. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106 (4): 515-518.
- Bray, D.B., E.A. Ellis, N. ArmijoCanto y C.T. Beck. 2004. The institutional drivers of sustainable landscapes: A case study of the ‘Mayan Zone’ in Quintana Roo, Mexico. Land Use Policy 21: 333346
- Calva C. G., Ríos L. E. 1999. Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.
- Chang, C. and Chang, W.C. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var *misericors*. Plant Cell Rep. 17:251-255.
- Chase, M. W., K. M. Cameron, R. L. Barrett y J. V. Freudenstein. 2003. DNA date orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. En K. W. Dixo, S. P.

- Kell, R. L. Barrett y P. J. Cribb (eds), Orchid conservation, pp. 69-89. Natural history publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah.
- Chávez, A. V. M. 1980. Cultivo asimbiótico de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Ángel. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 81 p.
 - Chávez, A. V. M., Litz, R. E. and Norstog, K. 1992. *In vitro* morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 30: 93-98.
 - Chávez, V. M., Litz, R. E. and Norstog, K. 1992. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila* Plant Cell Tiss. Organ Cult. 30: 99-105.
 - Chávez, V. M., Litz, R. E., Moon, P. A. and Norstog, K. 1992. Somatic embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozamia Mexicana* var. *Robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). In Vitro Cell Dev Biol 28: 59-63
 - Chávez, A. V. M. y Rubluo, I. A. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. pp. 123-131. In: Linares, E., Dávila, P., Chiang, F., Bye, R. y Elias, T. S. (Eds.) Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques. Instituto de Biología. UNAM.
 - Chávez, V. M., Litz, R. E. Monroy, M. A. Moon, P. A. and Vovides, A. 1998. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature phase trees. Plant Cell Rep. 17(8):612-616.
 - 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. T., Chang, C. and Chang, W. C. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. Plant Cell Rep. 19: 143-149.
 - Chen, J. T. and Chang, W. C. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Sci. 160: 87-93.

- Chen, J. T. and Chang, W. C. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium "Gower Ramsey"*. *Plant Growth Regulation* 34: 229-232.
- Chen, J. T. and 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. T y Chang, C. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum* 50: 169-173.
- Churchill, M., Ball, E. Arditti, J. 1973. Tissue culture of orchids. I. Methods for leaf tips. *New Phytologist* 72: 161-166.
- Coenen, C. and 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. 341 p. México, D.F.
- CONABIO. 2000. Estrategia Nacional sobre Biodiversidad de México. SEMARNAP/CONABIO, p. 103. México, D.F.
- CONABIO. 2012. Capital Natural de México: Acciones Estratégicas para su Valoración, Preservación y Recuperación. Factores de Presión y Amenaza. Ed. Offset Rebosan, S.A. de C.V. pp 51-58. México, D.F.
- CONANP. 2010. Estrategia de Cambio Climático para Áreas Protegidas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, SEMARNAT. México, D.F.
- Constabel, F. y Shyluk, J. P. 1994. Initiation, nutrition and maintenance of plant cell and tissue cultures. pp. 3-15. In: Vasil, I., K. and Thorpe, T. A. (eds.). *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands.
- Crafts, C. B., Miller, C. O. 1974. Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungus. *Plant Physiology* 54: 586-588.
- Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W. and Barrett, R. L. 2003. Orchid conservation: a global perspective. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett R. L. and Cribb P. J., eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah, Natural History Publications, pp.1–24.
- Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G. and Yokota, T. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (Eds)

Biochemistry and molecular biology of plants. Amer Soc Plant Physiol, Rockville, pp 850–929.

- D'Amato, M.F. and W. Bayliss. 1985. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *Critical Reviews in Plant Sciences* Vol. 3, Iss.1.
- Davies, P. J. 1995. Plant hormones. Physiology, biochemistry, and molecular biology. Second edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands. 833 p.
- Decrose, W., A. Gangaprasad, S. Seeni and S. Menon. 2003. Micropropagation and ecorestation of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72: 199-202.
- 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.
- Dirzo, R., y García, M.C. 1992. Rates of deforestation in Los Tuxtlas, a neotropical area in Southeast Mexico. *Conservation Biology* 6: 8490
- Dirzo, R. 1999. La biodiversidad como crisis ecológica actual. ¿Qué sabemos? pp. 339-412. En: Núñez F. J. y Eguiarte, L. E. *La Evolución Biológica*. Facultad de Ciencias e Instituto de Ecología, UNAM y Conabio. México.
- Dressler, R.L. 1981. *The Orchids. Natural history and classification*. Harvard University Press. London. 332 p.
- Doerner, P. 2000. Cell division regulation. In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 528-567
- Ehrlich, P. R. y Ehrlich, A. H. 1992. The value of biodiversity. *Ambio*. Stockholm [AMBIO.]. Vol. 21, no. 3, pp. 219-226.
- Escalente, J. y Teissant, C. 1989. Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisina*. *Plant Cell Reports*, 7:665-668.
- Espinosa, D. y Ocegueda, S. 2008. El Conocimiento Biogeográfico de las especies y su regionalización natural, en *Capital Natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, D.F. pp. 33-65.

- Fay, M. F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3: 176-183.
- Ferl, R. and Paul A. L. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
- Ferrusquía-Villafranca, I. 1998. Geología de México: una sinopsis. En *Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*, T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) Instituto de Biología, UNAM, México, D. F. p. 3–108.
- Flachslund, E., G. Terada., A. Scocchi., H. Rey., L. Mroginski and F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of seeds and in vitro cultured protocorm of *Oncidium bifolium* (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 27: 235-242.
- FloresPalacios, A., y P. Brewster. 2002. Introducción al cultivo de orquídeas. Instituto de Ecología, A.C.-Asociación Mexicana de Orquideología, Xalapa, p. 240
- Flores-Palacios, A., y S. Valencia-Díaz. 2007. Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation* 136: 372387.
- Forero, E. 1994. El futuro de la botánica en América Latina. *Acuerdos y realidades*. *Ciencias* 34: 35-41.
- García-Mendoza, A. J., Ordóñez, M. J. y Briones-Salas, M. 2004. Biodiversidad de Oaxaca. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, World Wildlife Fund, México, D.F. 206 pp.
- Gamborg, O. L. 2002. Plant tissue culture. *Biotechnology. Milestones. In vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, **38**, 84–92.
- Gaspar. T., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Crèvecoeur, M., Penel, C.I. and Greppin, H. 2003. Changing Concepts In Plant Hormone Action. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39(2):85-106.
- Geetha, S. and Shetty, S. A. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Curr. Sci.* 79: 887–889.
- Gentry, A.H. 1986. Endemism in tropical versus temperate plants. In: Soulé, M.E. (Ed.), *Conservation Biology. The science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Inc. Pub, Sunderland, MAS, Pp.153-181.

- George, E.F. and P.D. Sherrington, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Eastern Press, England.
- George E. F. 1993. Plant propagation by Tissue Culture, Eastern Press, Eversley.
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J., Dordrecht. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3rd edition. In The Netherlands: Springer: p. 65-113.
- Goh, C. J. 1990. Orchids, monopodials. In: Handbooks of Plant Cell Culture Vol. 5 Ornamental species (Edited by Ammirato PV Evans DA Sharp WR and Bajaj YPS). McGraw-Hill, Inc. pp 598-37.
- Gómez, R. K. 1998. Embriogénesis somática. pp. 57-77. En: Ponce, J. N. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.
- González, C. O., Juárez, P. W., Ronquillo, V. N., Estrada, G. B., Heredia, G. P., Flores, M. A., Jiménez, R. A., Mata, R. M., Chávez, A.V.M. 2012. El Cultivo de Tejidos Vegetales; alternativa de oportunidades para el desarrollo de México. Revista La Vida en la Sierra 3(1):5-9.
- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez-Machorro, R., López-Rosas, M. A. y Dressler, R. L. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, A. C., México, D.F. 304 p.
- Hágsater, E. y M.A. Soto. 2005. *Barkeria*. pp. 46-51 en Pupulin, F. (compilador) y colaboradores. Vanishing Beauty: Native Costa Rican Orchids, vol. 1. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José.
- Halbinger, F. 1972. Historia y estudios preliminares sobre el género *Barkeria*. Orquídea (Mexico city). 2 (7): 177-190.
- Halbinger, F. 1993. Laelias de México. Asociación Mexicana de Orquideología, A.C., México.
- Halffter, G. y Ezcurra, E. 1992. ¿Qué es la biodiversidad? pp. 3-23. En: Halffter, G. (Comp). La diversidad biológica de Iberoamérica I. Acta Zoologica Mexicana. Volumen especial. Instituto de Ecología. México.
- Harley, J.L. 1969 The Biology of Mycorrhiza 2nd edition., Leonard Hill, London
- Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Sci. 85(12): 1704-1712.

- Henshaw, G. G. 1975. Technical aspects for tissue culture storage for genetic conservation. Pp. 349–358 in *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*, O. H. Frankel and J. G. Hawkes, eds. Cambridge University Press. New York:
- Hernández, A. M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr, (Orchidaceae), México. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Hernández, H. J., Hernández, S. O. y Mata R. M. 2001. Regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de mitades de protocormos de *Laelia anceps* Lindl. y *Catasetum intergerrimum* Hook. *Amaranto* 14(1): 3-12.
- Ibarra-Zapata, E. 2008. Análisis Geográfico para la Conservación de la Naturaleza. Estudio de caso Área Natural Protegida Reserva de la Biosfera Sierra Abra de Tanchipa. Tesis. Coordinación de Ciencias Sociales y Humanidades, Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 120p.
- Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 17: 446-450.
- Ichihashi, S. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. *Lindleyana* 7(4): 208-215.
- IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. *Orchids – Status Survey and Conservation Action Plan*. Gland Switzerland and Cambridge UK: IUCN.
- Janarthanam, B., and Seshadri, S. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 44. pp. 84–89
- Jankiewicz, L. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Volumen I. Propiedades y acción. Ed. Mundi-Prensa. México, D.F. 21-55p.
- Jiménez, E. G. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. pp. 13-24. In: Ponce, J. N. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.
- Jiménez, V. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Reg.* 47: 91-110.
- 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* hibrid. *Acta Horticulture (ISHS)* 764:279-284

- Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D., Čapková, V. and Schäfer, C. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Sci.* 161: 695-701.
- Kerbauy, G. B. 1991. *In vitro* conversion of *Cattleya* root tip cells into protocorm-like bodies. *J. Plant Physiol.* 138: 248-251.
- Kerbauy, G. B. 1993. The effects of sucrose and agar on the formation of protocorm-like bodies in recalcitrant root tip meristems of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae). *Lindleyana* 8 (3): 149-154.
- Kikuta, Y. and Okazawa, Y. 1984. Control of root and shoot bud formation from potato tuber cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 61:8-12.
- Kim, M., y Kim, J. 2003. Micropropagation of *Dendrobium* hybrids through shoot tip culture. *ISHS Acta Horticulturae* 624: XXVI International Horticulture Congress.
- Koopowitz H. 2001. *Orchids and their conservation*. Portland: Timber Press.
- Koopowitz H., Lavarack P. S. and Dixon, K. W. 2003. The nature of threats to orchid conservation. In: Dixon, K. W., Kell, S. P., Barrett, R. L. and Cribb, P. J., eds. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications, 25–42.
- Kosir P, Suzana S, Zlata L. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Agriculturae Slovenica*. 83:233–242.
- Kozai, T. and Smith, M. A. L. 1995 Environmental control in plant tissue culture. General introduction and overview. pp. 301- 318 in Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M. A. L (eds.) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Krapiec, P., M. Milaneza and F. Pires. 2003. Effects of different combinations of growth reguladors for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*. Maringá, 25(1): 179-182. Brasil
- Krikorian A.D. 1991. Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. In: *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Roca, W. y Mroginski, L. (Eds.). CIAT. Colombia, pp. 15-45.

- Kishi, F. and Takagi, K. 1997. Efficient method for the preservation and regeneration of orchid protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae* Volume 68, Issues 1–4. P. 149–156
- Kuan, C. y González, L. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. pp 1-16, 47-53, 75-76.
- Lee E, H, E., Antonio L. C., González, J.M., Iglesias-Andreu, L., Rosas, B.G., López, E. D., Ocampo, Y. M., Felipe A. Barredo Pool y Buzzy, N.S. 2010. Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *dawsonii*. *Rev. Fitotec. Mex.*, Vol.33, no.4, p.323-332. ISSN 0187-7380
- Liu, C. M., Xu, Z. H. and Chua, N. H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell*. 5: 621-630.
- Luna, R. S., Barba, A. A. y Romero, A. J. 2004. Orquídeas: Germinación de semillas. Unidad de investigación en Biología Vegetal (UIBV). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 17 p.
- Martin, K.P., Madassery, J. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium hybrids* through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Sci Hortic*108:95-99.
- Martínez, P. A. 1985. Inducción *in vitro* de brotación múltiple en *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) a partir de protocormos seccionados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 66 p.
- Martínez, P. A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 107 p.
- Martinez, E. 2002. Citoquininas y fitocromos. VIII Fitohormonas. Edit. Junta de Andalucía: Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla. España. pag. 173-182
- Martínez, P. A., Ortega, L. M., Chávez, A. V. and Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and Organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: considerations for its conservation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74: 135-142.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la Organogénesis. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 230 p.

- Mata-Rosas, M., Monroy, M. A., Moebius, K. and Chávez, V. M. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:400-404
- Mata-Rosas, M., and Salazar-Rojas, V. M. 2009. Propagation and establishment of three endangered Mexican orchids from protocorms. *HortScience*. 44(5):1395-1399.
- Mata-Rosas, M., Baltazar-García, J., Chávez-Avila, V. M. 2011. In Vitro Regeneration Through Direct Organogenesis from Protocorms of *Oncidium tigrinum* Llave & Lex. (Orchidaceae), an Endemic and Threatened Mexican Species. *HortsScience* 46(8): 1132-1135.
- Masuhara, G., and Katsuya, K. 1989. Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids. *Scientia Horticulturae* 37: 331–337.
- Mauro, M., Sabapathi, D. and Smith, R.A. 1994. Influence of benzylaminopurine and alpha naphthalenacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. *Lindleyana* 9(3): 169-173.
- McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB. 1990. Conserving the World's Biological Diversity. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank: Washington, DC.
- Menchaca G. R. A. Ramos P, J. M., Moreno M, D., Luna, M., Mata- Rosas, M., Vázquez, G, L. M., Lozano, R. M. A. 2011. Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIII, núm. 1. pp. 80-84
- Mittermeier, R.A. 1988. Primate diversity and the tropical forest: case studies of Brazil and Madagascar and the importance of megadiversity countries. Pp. 145-154 In: E.O. Wilson (ed). *Biodiversity*. National Academic Press, Washington. 501 pp
- Mittermeier, R. A. y Goettsch De Mittermeier. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. En: J. Sarukhán y R. Dirzo (Ed.). *México ante los retos de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. pp. 63- 73.
- Mittermeier, R.A., C. Goettsch-Mittermeier y P. Robles Gil. 1997. *Megadiversidad: los Países Biológicamente más Ricos del Mundo*. Cemex-Agrupación Sierra Madre, México, D.F.

- Moebius-Goldammer, K. G., Mata-Rosas, M. and Chávez-Ávila, V. M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (lem.) K.Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39: 388-393.
- Morel, G. M. 1960. Producing virus-free cymbidiums. *Am. Orchid Soc. Bull.* 29: 495-497.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25, 135–166.
- Murashige, T. 1979. Principles of rapid propagation, in *Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture: A Bridge Between Research and Application* (Hughes, K. W., Henke, R., and Constantin, M., eds.), Tech. Information Center, U.S. Dept. of Energy, pp. 14–24.
- Murthy, H.N., Pyati, A.N. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 37 (2001), pp. 223–226
- Nayak N., S. Rath and S. Patnaik. 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fish. And *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron–induced high frequency shoot proliferation. *Scientia Horticulturae* 71: 243-250.
- Negroni M. 2009. *Microbiología Estomatológica*. 2da ed. Buenos Aires: Panamericana. 656 p.
- Nguyen, H y Tran D. 2006. *In vitro* propagation of *Dendrobium* orchid, through thin stern section culture. Pagina en red: [http:// www.hcmuaf.edu.vn/cpb/phqt/biotech2006/papers/nonghoc/TC-THNhat.pdf](http://www.hcmuaf.edu.vn/cpb/phqt/biotech2006/papers/nonghoc/TC-THNhat.pdf).
- Norddtröm, A., Tarkowski, P., Tarkowaska, D., Norbaek, R., Astot, C., Dolezal, K and 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
- Neyra-González, L. and L. Durand-Smith. 1998. Biodiversidad. Pages. 62–102. in A. Peña-Jiménez, L. Neyra-González, L. Loa-Loza, L. Durand-Smith, editors. La

diversidad biológica de México: estudio de país, 1998. Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad, México, D.F., México.

- Nwankwo B.A. and Krikorian A.D. 1983 Morphogenetic potential of embryo and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. Ann. Bot. 51, 459-466.
- Olmsted, I. and M. Gómez-Juárez. 1996. Distribution and conservation of epiphytes on the Yucatán Peninsula. Selbyana 17:58–70
- Ogasawara, N., Hanchishi, S., Suzuki, C. y Takao, H. 1995 The growth and CO₂ exchange of *Cymbidium* protocorm- Like bodies related to to sugar in the culture medium. Acta Horticulturae. *Environmental Control in Plant Tissue Culture* 393: 85-90
- Pan, CH. L. 2007. Marching Towards the Market: The business Potential of Agricultural Biotechnology in the Republic of China. pp 89-99. In. Business Potential for agricultural Biotechnology Products. TENG. S. P. (ed) The Asian Productivity Organization. Tokio. Japon.
- Park, S., Murthy, H and Paek, K. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. Plant Science 164: 919-923
- 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
- Pedroza, J. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indol acético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. Revista Colombiana de Biotecnología, 11(1): 17-32.
- Pedroza, M.J. y Mican, G.Y. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.F. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42: 543-547.
- Peres, L.E.P, and Kerbauy, G.B. 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 Rep.* 18(12): 1002-1006.

- Pérez, Molphe-Balch, E. M., Ramírez, M. R., Núñez, P. H.G y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179 p.
- Pérez-García, E. A. 2001. Vegetación y flora de Nizanda, Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. Acta Botanica Mexicana. 56(1): 18-88.
- Peres, L., N. Majerowicz and G. Kerbauy.2001. Dry matter partitioning differences between shoots and roots in two contrasting genotypes of orchids and their relationship with endogenous levels of auxins, cytokinins and abscisic acid. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 9: 169-176.
- Philip, V. J. and Nainar, A. Z. 1988. Structural changes during the *in vitro* germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Ann. Bot. 61: 139-145.
- Pierik, R. L. M., and Steegmans, H. M. 1972. The effect of 6-benzylamino purine on growth and development of *Cattleya* seedlings grown from unripe seeds. Z. Pflanzenphysiol. 68:228-234.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Editorial Mundi Prensa. Madrid.
- Poole, H. A. and Sheehan, T. J. 1977. Effects of media and supplementary microelement fertilization on growth and chemical composition of *Cattleya*. Am. Orchid Soc. Bull. 46(8):155-160.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. and Plzáková Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biol. Plant. 42(4): 481-497.
- Ramírez, F. M. C. 1990. Establecimiento del cultivo *in vitro* de orquídeas mexicanas en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Ramsay, M.M. and K. W. Dixon. 2003. Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. In: Dixon, K. W., S.P. Kell, and P.J. Cribb (ed). Orchid conservation. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu Sabah.
- Rangel, G. L. M. 1995. Regeneración *in vitro* a partir del cultivo de ápices de tallo de *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl. (Orchidaceae), especie mexicana en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 66 p.

- Razdan, M. K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. Second edition. Science Publishers, Inc. USA. 375 p.
- Razdan, M.K. 2002. Introduction to plant tissue culture. 2 ed. Enfield, New Hampshire. Science Publishers (eds) 128 pp
- Rivera-Domínguez, M., Manzanilla-Ramírez, M. A., Robles-González M. and Gómez-Lim, M. A. 2004. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration of 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica*) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 101–104.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 953 p.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. 1993. Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Editores técnicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT) Cali, Colombia.
- Rodríguez, F. L. M. 2000. Germinación y desarrollo *in vitro* de *Paphiopedilum exstaminodum* (Castaño, Hagsater, & Aguirre) V. A. Albert & Börge Pett. y *Paphiopedilum caudatum* (Rolfe) V. A. Albert & Börge Pett. (Orchidaceae), especies en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 65 p.
- Rojas, B. F. 2007. Regeneración *in vitro* de *Vanilla Planifolia*, Salisbury (Orchidaceae), especie endémica mexicana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Rublío, A. 1985. Preservación de germoplasma vegetal *in vitro*. Robert M., V. M. Loyola (eds.). El cultivo de tejidos vegetales en México. P. 35-53
- Rublío, A., Chávez, V., Martínez, A, P. and Martínez-Vázquez O. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacto through *in vitro* culture. Biological Conservation 63: 163-169.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa, México, D.F. 432 p.
- Rzedowski, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. pp. 129-145. In: Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A. and Fa, J. (Eds.). Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press. New York.

- Salazar, R. V. M. 2003. Micropropagación de *Mormodes tuxtlensis* Salazar, *Cuitlautzina pendula* La Llave & Lex. y *Lycaste skinneri* (Batem. Ex. Lind.) Lind. (Orchidaceae) a partir de protocormos. Tesis de licenciatura. Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 106 p.
- Salisbury, F., Ross, C. 1992. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamérica. México, D.F. 423-435 pp.
- Salisbury, F., Ross, C. 2000. Fisiología vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. España: Thomson editores Paraninfo.
- Sandoval, E. Z. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38. Instituto de Biología, UNAM. 278 p.
- Santos, D. M. S., Carranza, Á. C. 2009. Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like body derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a Mexican threatened orchid. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 45:162-170.
- Santos, H. L., Martínez, G. M., Campos, J.E. y Aguirre, L. E. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. Hort. Sci. 40(2): 439-442.
- Sarmiento, M. P. y Romero, C. G. 2000. Orquídeas mexicanas. Grupo Editorial Miguel Angel Porrúa. México. 147 p.
- Sarukhán, J., y R. Dirzo. 2001. Biodiversity-rich countries, en S.A. Levin (ed.), Encyclopedia of biodiversity, vol. 1. Academic Press, San Diego, pp. 419-436.
- Sagawa, Y. 1991. Clonal Propagation of orchids. pp. 1-7. In: Plant Cell Tissue Culture Manual C1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Sagawa, Y. and Kunisaki, J.T. 1984. Clonal propagation: Orchids. pp. 61-67. In: Vasil, I.K. (ed.). Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 1. Academic Press Inc. Orlando.
- Seabrook J. E. A. 1980. Laboratory culture. En: Staba, E. J. (ed.) Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press, Inc, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 1-20
- Semarnat. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 30 de diciembre de 2010.

- Shiau, Y., Nalawade, S., Hisia, C., Mulabagala V. y Tasay, 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
- Shu-Fung L., Satish, M. N., Chao-Lin, K., Chung-Li, C., and Hsin-Sheng, T. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense makino* – A medicinally important orchid. Society for in vitro biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 40:528–535.
- Sierra, H. 2006 Germinación *in vitro* y adaptación *ex vitro* de *Laelia autumnalis* (La Llave & Laxarza) Lindl (Orchidaceae). Tesis de licenciatura en biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 117p. México, D.F
- Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131.
- Sosa, V. and Platas, T. 1998. Extinction and persistence of rare orchids in Veracruz, Mexico. *Conservation Biology* 12: 451– 455.
- Soto, M. A. 1994. Population studies in Mexican orchids. pp. 153-160. In: Pridgeon, A. M. (ed.) *Proceedings, 14th World Orchid congress*. HMSO, Edinburgh.
- SOTO, M. A. 1996. México [tratamiento regional]. Pp. 53-58 en: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. *Orchids– status survey and conservation action plan*. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.
- Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, A. R. 2007. Ficha técnica de *Barkeria whartonia*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). *Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000*. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.
- Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, A. R. 2007. Ficha técnica de *Barkeria scandens*. En: Soto- Arenas, M. A. (compilador). *Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000*. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.

- Soto, M.A., E. Hagsater, R. Jiménez, G.A. Salazar, R. Solano, R. Flores E I. Contreras. 2007. Las orquídeas de México: catálogo digital. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.
- Steeves, T. A. and Sussex, I. M. 1989. Patterns in plant development. Cambridge University Press. New York. 388 p.
- Stewart, J. 1988. A Brief Overview of the Genus *Oeceoclades*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 57(9):972-975.
- Street H. E. 1977. Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.
- Stushnoff, C. and C. Fear, 1985. The Potential Use of in vitro Storage for Temperate Fruit Germplasm. A Status Report, IBPGR, Rome
- 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.
- Sweet, H. C. and Bolton, W.E. 1979. The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. *Amer. J. Bot.* 66(6): 692-698.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. Second edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland Massachusetts. 690 p.
- Terzi, M. and Loschiavo, F. 1990. Somatic embryogenesis. pp. 54-66. In: Bhojwani, S. S. Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier Science Publishers. The Netherlands.
- Thien, L. B. y Dressler, R. L. 1970. Taxonomy of *Barkeria* (Orchidaceae). *Brittonia.* 22 (4): 289-302.
- Thompson, D., Trevor, J., Van, J. 2006. Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability in vitro: relationships, requirements and first-time reports. *Plant Growth Regulation.* 49:269–284.
- Thorpe, T. A. 1990. The current status of plant tissue culture, in *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations* (Bhojwani, S. S., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 1–33.

- Thorpe, T. A. and Stasolla, C. 2001. Somatic Embryogenesis. pp. 279-336. In: Bhojwani, S. S. and Soh, W. Y. (eds.). Current Trends in the Embriology of Angiosperms. Kluwer Academic Publishers. London.
- 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 Adquisicion de competencia para la micropopagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya x esbetts* (orchidacea) Tesis de Licenciatura Biología. Facultad de estudios speriores Zaragosa, UNAM. 127 p.
- Tinoco, J. M. S. y Mata-Rosas, M. 2007. Adquisición de competencia para la micropopagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya X Esbetts* (Orchidaceae). Lankesteriana, 7(1-2):404-418.
- Tisserat, B. 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. M. 1988. La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo. 81: 18-30.
- Toledo, V. M. 1994. La diversidad biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventas. Ciencias. 34: 43-59.
- Toledo, V. M. y Ordóñez, J. M. 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. pp. 739-757. In: Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (eds.). Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. UNAM. México.
- Tommasi, F. and Scaramuzzi, F. 2004. *In vitro* propagation of *Ginkgo biloba* by using various bud cultures. *Biologia Plantarum*. 48(2): 297-300.
- Torres, J. y Mogollón, N. 2000. Micropopagación de *Cattleya mossiae* Parker ex Hook mediante brotación axilar inducida por tidiazurón. BIOAGRO 12(1): 10-14.
- Trejo, I., y R. Dirzo. 2000. Deforestation of seasonally dry tropical forest: A national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation* 94: 133142.

- Vaasa, A., Rosenberg, V. 2004. Preservation of the rare wild orchids in vitro. Abstracts of International Conference “Plant tissue culture: from theory to practice”, Latvia, p: 33
- 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
- Van der Pijl, L y Dodson, C. H. 1966. Orchid Flowers. Their Pollination and Evolution. Fairchild Tropical Gardens and the University of Miami Press. Coral Gables, Florida.
- Villalobos, V. M. y Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. pp. 127-142. In: Roca, W. M. y Mroginski, L. A. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia.
- Villaseñor, J. L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 28: 160-167.
- Wilson, E.O. 1988. Biodiversity. National Academic of Sciences. Washington, DC.
- Withers, L. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. AGP: IBPGR/80/8. Rome
- Withner, C. L. 1998. The *cattleyas* and their relatives: volume 5. *Brassavola*, *Encyclia* and other genera of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon.
- Wood, J. 1988. *Barkeria melanocaulon*. Kew Mag. 5 (4): 154-156.
- Yeung E.C. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture system. In vitro cellular and Developmental biology. Volume 35 (2), 137-143.
- Zaid, A. 1987. *In vitro* browning of tissue and media with special emphasis to date palm cultures-A review. En: *In vitro*, problems related to mass propagation. Acta Horticulturae 212: 561-564.