



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Control de la oxidación y desarrollo *in vitro* de
Dichromanthus cinnabarinus y
Dichromanthus aurantiacus
(Orchidaceae).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ ALEJANDRO VILLADA REYES



DIRECTOR DE TESIS:
DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana por su apoyo incondicional. Gracias por recordarme nunca claudicar y a siempre realizar mis actividades lo mejor posible. Así mismo al resto de mi familia, los cuales siempre me orientaron y apoyaron a lo largo de los años, inculcando los valores que rigen mi vida.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, por ser un gran mentor, agradeciendo su confianza y paciencia por este largo proceso. Además de sus valiosas sugerencias para mejorar siempre mi trabajo.

Al M. en C. Octavio González Caballero, por el tiempo que me dedicaste en este proceso y siempre estar atento a mis avances, además de presionarme a terminar el trabajo y no dejar esta etapa incompleta.

A la Dra. Pilar Ortega Larrocea, por dedicar parte de su tiempo a la revisión de mi trabajo, realizando las correcciones y recomendaciones necesarias.

A la M. en C. Iris Suárez Quijada responsable técnico del Laboratorio de Microcosmos Bioedáfico, del Departamento de Ciencias Ambientales y del Suelo del Instituto de Geología, UNAM, por la donación del materia biológico inicial para el desarrollo de este trabajo de tesis y por su valiosa asesoría técnica.

Al M. en C. Octavio González C., por el tiempo que me dedicaste en este proceso y siempre estar atento a mis avances, además de presionarme a terminar el trabajo y no dejar esta etapa incompleta.

A la Dra. Estela Sandoval Zapotitla, Biól. Barbara estrada y Biól Gabriel Olalde, por ser las personas que me recibieron en la estancia que realicé mientras cursaba la Preparatoria, gracias por su calidez humana y sobre todo por la amistad que se forjó al paso de los años.

A mis diversos compañeros del Lab. de cultivo de tejidos, fueron muchos a lo largo del proceso, no quiero omitir el nombre de alguno, saben ustedes que les agradezco haber compartido este proceso.

A mis amigos Sol Guerrero, Sergio Yañez, Roman Alfonso Castillo, C. Magali Sánchez G., Alfredo Salgado C., Miriam Valencia, David Herrera, José Manuel Torres, Xarini López, Patricia Aldaco y Dafne Uscanga, por los gratos momentos compartidos, su amistad sincera, apoyo incondicional y por siempre darme ánimos.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Villada
Reyes
José Alejandro
55 5763 5266
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
303097255

2. Datos del tutor

Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Ávila

3. Datos del sinodal 1

Dra.
María del Pilar
Ortega
Larrocea

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Octavio
González
Caballero

5. Datos del sinodal 3

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

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Laura Patricia
Olgín
Santos

7. Datos del trabajo escrito

Control de la oxidación y desarrollo *in vitro*
de *Dichromanthus cinnabarinus* y *Dichromanthus aurantiacus*
(Orchidaceae)
71 p.
2019

ÍNDICE

1	MARCO TEÓRICO	1
1.1	Megadiversidad de México.....	1
1.2	Familia Orchidaceae.....	1
1.3	Diversidad y distribución de la familia Orchidaceae en México	1
1.4	Características de la familia Orchidaceae.....	2
1.4.1	Hábitos de Crecimiento	2
1.4.2	Raíz	3
1.4.3	Micorriza	3
1.4.4	Tallo.....	4
1.4.5	Hojas.....	4
1.4.6	Flores.....	4
1.4.7	Polinizadores	6
1.4.8	Semillas y Germinación.....	6
1.5	Estado de conservación de la Familia Orchidaceae en México	7
1.6	Clasificación taxonómica <i>Dichromanthus cinnabarinus</i> (Lex.) Garay., 1982.....	9
1.7	Clasificación taxonómica <i>Dichromanthus aurantiacus</i> (Lex.) Salazar y Soto Arenas, 2002.	12
2	ANTECEDENTES	14
2.1	Cultivo de Tejidos Vegetales.....	14
2.2	Cultivo de Tejidos Vegetales en orquídeas.....	14
2.3	Cuerpos parecidos a protocormos (PLB's).....	16
2.4	Reguladores de Crecimiento Vegetal.....	17
2.4.1	Auxinas	18
2.4.2	Citocininas	18
2.4.3	Interacción entre auxina- citocinina.....	19
2.5	Compuestos adsorbentes	20
2.5.1	Carbón activado	20
2.5.2	Polivinil pirrolidona (PVP).....	20

2.6	Compuestos orgánicos.....	21
2.6.1	Extracto de plátano.....	21
2.6.2	Caseína hidrolizada.....	21
3	JUSTIFICACIÓN	22
4	OBJETIVOS	24
4.1	General.....	24
4.2	Particulares.....	24
5	ATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1	Material biológico.....	24
5.1.1	Mantenimiento de los cultivos de protocormos donados	24
5.1.2	Medio de cultivo MS modificado	25
5.1.3	Cultivo de cuerpos parecidos a protocormos (PLB's).....	25
5.1.4	Registro de fotográfico de PLB's (medio MS modificado).	25
5.2	Desarrollo de Protocolos	25
5.2.1	Protocolo 1 (Compuestos orgánicos)	25
5.2.2	Protocolo 2 (Compuestos adsorbentes).....	26
6	RESULTADOS	27
6.1	Cultivo de PLB's donados en medio MS modificado.	27
6.2	Protocolo 1 (Compuestos orgánicos).....	33
6.2.1	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	33
6.2.2	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	39
6.3	Protocolo 2 (Compuestos adsorbentes).....	44
6.3.1	Carbón activado 1 g/L	44
6.3.2	Carbón activado 2 g/L	44
6.3.3	Polyvinyl-pirrolidona (PVP) 1 g/L.....	45
6.3.4	Polyvinyl-pirrolidona (PVP) 2 g/L.....	45
7	DISCUSIÓN	46
7.1	Cultivo de PLB's donados en medio MS modificado	46
7.2	Protocolo 1 (Compuestos orgánicos)	47

7.3	Protocolo 2 (Compuestos adsorbentes).....	54
8	CONCLUSIONES	58
9	APÉNDICE	60
9.1	APÉNDICE A. Medio de cultivo de MS modificado.....	60
10	BIBLIOGRAFIA	61

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Megadiversidad de México

El concepto de países megadiversos está enfocado a la existencia de áreas con alta biodiversidad, particularmente con gran cantidad de especies y una alta concentración de endemismos (Sarukahán y Dirzo, 2001). Algunos países Megadiversos son Brasil, China, Costa Rica, Colombia, Ecuador, India, Indonesia, Kenia, México, Perú, Sudáfrica y Venezuela.

En el territorio mexicano se tienen representadas casi todas las comunidades vegetales que existen en el mundo, diversidad que sólo la India y Perú presentan, debido a la combinación de varios factores ambientales. Los principales factores en México son su ubicación en una zona de transición entre dos regiones biogeográficas, el Neártico y el Neotropical; una accidentada orografía; una historia geológica de distintas épocas y la presencia de casi todos los climas del mundo (Carabias *et al.*, 1994).

1.2 Familia Orchidaceae.

Cuentan con una gran diversidad de especies; las estimaciones recientes de esta familia sugieren que deben existir entre 20,000 y 30,000, descubriéndose cada día una mayor cantidad, lo que hace evidente la necesidad de su estudio, lo cual permitirá establecer con una mayor exactitud el tamaño de la flora de los países tropicales. Esta enorme diversidad es el resultado de la larga evolución de este linaje desde que la primera orquídea apareció en la tierra hace unos 100 o 110 millones de años (Chase, 2001; Chase *et al.*, 2003). Las orquídeas comprenden cerca del 10% de especies de plantas en el mundo (Koopowitz, 2001).

Es una familia cosmopolita, debido a que se distribuye en todo el mundo, excepto en regiones polares o en zonas extremadamente desérticas, gracias a sus adaptaciones para soportar muy distintas condiciones contrastantes. Alcanzan su mayor diversidad en las regiones tropicales, lo cual corresponde al 56% del total mundial de orquídeas (10,849 especies) se encuentran en los trópicos (UICN/ SSC Orchid Specialist Group, 1996), siendo América Tropical la región con mayor número de especies, particularmente los países ricos en especies son Costa Rica (1,400), México (1,300), Brasil (1,500), Ecuador (4,016) y Panamá (1,365) (Koopowitz, 2001).

1.3 Diversidad y distribución de la familia Orchidaceae en México

En México se reconocen actualmente más de 1,200 especies de orquídeas y se estima que el número final de especies estará entre 1,300 y 1,400. Esto coloca a la familia Orchidaceae en tercer lugar en cuanto a riqueza de especies vegetales mexicanas, sólo la familia Asteraceae y Fabaceae la superan (Hágsater *et al.*, 2005).

La flora mexicana de orquídeas es una mezcla de distintos orígenes. La flora tropical de México, Centroamérica y las Antillas no son una extensión empobrecida de la flora tropical de Sur América, es una flora distinta, con una historia evolutiva diferente y que se mezcló con los orígenes del sur (Soto-Arenas y Salazar, 2004). Actualmente las diversas condiciones ambientales generadas por las regiones biogeográficas aumentan la riqueza y diversidad de especies de orquídeas en México, dichas regiones biogeográficas se definen cómo áreas con distinta composición de especies y corresponden al concepto de áreas de endemismo (Rosen, 1988). No existe un consenso de cuántas provincias florísticas hay en México debido a la falta de análisis cuantitativos de un gran número de plantas, pero la clasificación más utilizada es la Rzedowski (1978). En México su distribución se conoce por varias provincias orquideológicas, que coinciden con la propuesta por Rzedowski, encontrándose desde el nivel del mar hasta los 3 557m sobre el nivel del mar, así como en las distintas provincias biogeográficas y que representan áreas de endemismo identificadas por medio de análisis, cómo el de la orquideoflora de Oaxaca (Soto-Arenas y Salazar, 2004; Hágsater *et a.l.*, 2005).

1.4 Características de la familia Orchidaceae

1.4.1 Hábitos de Crecimiento

Las orquídeas son plantas herbáceas con una estructura básica similar a la de muchas otras monocotiledóneas. Está constituida por vástagos organizados en dos 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 (monopodio) y se le conoce como crecimiento monopodial (Figura 1). 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, este conjunto de vástagos forma un eje compuesto (simpodio) y el hábito es llamado entonces simpodial (Figura 2) (Bell y Bryan, 1991).



Figura 1.- Crecimiento monopodial (Género *Vanda*) (Clark, 1977).

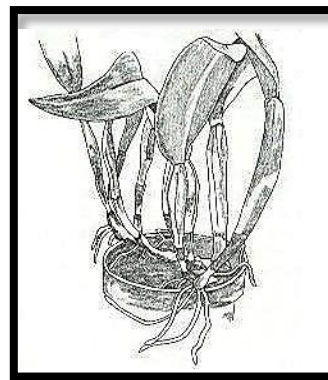


Figura 2.- Crecimiento simpodial (Género *Cattleya*) (Clark, 1977).

1.4.2 Raíz

Las raíces de las orquídeas son simples o ramificadas, carnosas y con un diámetro aproximado de 1 a 10 mm, dependiendo de la especie. Su organización anatómica consiste en un cilindro vascular en el centro, rodeado de una endodermis, que envuelve a su vez por la corteza, esta última constituye el mayor volumen de la raíz y se encuentra delimitada hacia fuera por la exodermis, formada por algunas células de pared gruesa e impenetrable y otras de pared delgada que permiten el paso de agua del exterior hacia la corteza. 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 solo sus paredes parcialmente engrosadas. Está cubierta de células muertas llamada "velamen" puede tener entre 1 y 8 células de grosor y es lo que le confiere el aspecto blanquecino característico a muchas raíces de orquídeas epífitas (Hágsater *et al.*, 2005).

Muchas orquídeas terrestres de las tribus Cranichidae y Orchidae en la subfamilia Orchidoideae tienen raíces tuberoideas que son órganos de penetración que persisten enterrados en el suelo durante la temporada más seca y fría del año, y que sustentan los brotes en la siguiente temporada de crecimiento (Pridgeon y Chase, 1995).

1.4.3 Micorriza

Una importante función adicional de las raíces es el poder albergar hongos simbioses que constituyen la micorriza. Las hifas de los hongos penetran la raíz a través de las células epidérmicas o los pelos radicales hasta una zona específica de la corteza, donde se enrollan formando "pelotones" y tiene lugar su digestión por parte de las células de las orquídeas. Los hongos asociados con las orquídeas pueden ser auténticos saprófitos que viven en la degradación de detritos orgánicos en el suelo o ser parásitos de otras plantas. De hecho entre los hongos que forman micorrizas con orquídeas se encuentran algunos patógenos severos de otras plantas, como *Rhizoctonia solani*, causante de pudriciones y otras enfermedades. Se considera que los hongos les proporcionan a las orquídeas nutrientes minerales, carbohidratos y aminoácidos (Arditti, 1992; Zettler *et al.*, 2003). Cabe resaltar el hecho de que existen al menos 200 especies de orquídeas en el mundo que carecen de clorofila y no realizan fotosíntesis, por lo que su única fuente de nutrición son los hongos simbioses. Estas orquídeas han sido consideradas saprófitas, pero hoy en día se sabe que son "micótrofas" o "micoheterótrofas" lo que significa que su nutrición depende de una fuente externa, específicamente de hongos. Estos son indicios de que algunas de ellas son "epiparásitas" viviendo a expensas de hongos que a su vez parasitan o forman micorrizas con las raíces de otras plantas (Zettler, *et al.*, 2003).

1.4.4 Tallo

La estructura básica del tallo de las orquídeas es comparable a una caña o carrizo y está formado por segmentos o entrenudos delimitados por nudos o anillos cicatrizales donde originalmente se insertan las hojas, vainas o escamas foliares. El hábito simpodial con tallos delgados y erectos es quizá la condición ancestral en la familia, como lo sugiere su presencia en orquídeas apostasioides. Los pseudobulbos son tallos aéreos notablemente engrosados. Están presentes en muchas orquídeas epífitas y algunas terrestres o rupícolas. Sus contrapartes subterráneas son los cormos, característicos de algunos grupos de orquídeas epidendroides terrestres. Ambos tipos de tallos engrosados constituyen almacenes de agua y sustancias de reserva, como almidón, que son utilizados en parte para sustentar la producción de flores y frutos, así como el desarrollo de nuevos vástagos (Hágsater *et al.*, 2005).

1.4.5 Hojas

Además de las funciones básicas que desempeñan las hojas de la mayoría de las plantas, es decir, transpiración, intercambio gaseoso y la producción de nutrientes mediante la fotosíntesis, las hojas de algunas orquídeas presentan modificaciones y funciones particulares, en el caso del género *Trichocentrum* presentan tallos pequeños y hojas suculentas para reservar nutrientes con tallos pequeños (Pridgeon, 1982). La presencia de follaje deciduo es más común entre las orquídeas terrestres, incluyendo grupos tan dispares como las orquídeas spirantinas. Todas ellas tienen sólo hojas delgadas o incluso membranáceas, que presentan únicamente durante la parte más húmeda del año. Al finalizar dicho periodo, que en México va de junio a octubre, las hojas se pierden y sólo quedan las partes subterráneas, sean estas raíces engrosadas, tubérculos, cormos o rizomas, que generan el nuevo vástago del año siguiente (Hágsater *et al.*, 2005).

1.4.6 Flores

Las flores, son sin duda, la parte más conspicua y atractiva de las orquídeas y han sido objeto de numerosos estudios de polinización (Van der Pijl y Dodson, 1966; Endress, 1994; Szlachetko y Rutkowski, 2000). Suelen estar agregadas en racimos, espigas, panículas y umbela, aunque en ocasiones son producidas de manera individual, la inflorescencia puede formarse casi a cualquier altura en el tallo o pseudobulbo, aunque en la mayor parte de los géneros aparecen ya sea en la base o en el ápice.

Muchas tienen nectarios florales que atraen a las hormigas a las que se les ve patrullando sin cesar a la inflorescencia y ahuyentando a los insectos que se posan en ellas, ésta interacción puede observarse en el género *Myrmecophila*, las hormigas habitan los pseudobulbos huecos y durante la floración recogen néctar producido por las flores durante su desarrollo. Cabe destacar que el néctar, producido en el exterior de las brácteas de la inflorescencia o en las vainas que envuelven al brote en desarrollo, es una recompensa para los guardianes, no para los

polinizadores. La presencia de nectarios extraflorales para atraer hormigas y beneficiarse de su protección es una estrategia utilizada por muchas otras plantas aparte de las orquídeas (Bentley, 1977).

La estructura básica de las orquídeas es muy similar a la de los lirios, como el iris o las azucenas, pero poseen las siguientes características distintivas:

a) Tiene simetría bilateral, por lo que es posible imaginar un plano que divide a la flor en dos partes que son imágenes en el espejo una de la otra. De manera excepcional, la simetría se ve alterada por la torsión o flexión de la columna, el labelo o ambos. En otros casos a primera vista la flor parece tener simetría radial, es decir, con varios planos de simetría que parten del centro, pero dicho aspecto se limita a los sépalos y el resto de las estructuras florales son definitivamente bilaterales.

b) Presentan una fusión, al menos parcial, entre los filamentos de los estambres y el estilo para constituir una estructura única que incluye los órganos sexuales masculinos y femeninos, llamados columna o ginostemio.

c) Experimentan una compresión en los estambres en un lado de la flor, de hecho, la mayoría solo posee un estambre fértil.

d) Uno de los pétalos, el opuesto al de los estambres, suele ser diferente de los otros dos, ya sea en cuanto a tamaño, forma o coloración, además que puede presentar engrosamientos o áreas que producen néctar, compuestos aromáticos, aceites o pseudopolen. Este pétalo modificado llamado labio o labelo, es por lo general la parte más vista de la flor y tiene la función de atraer, guiar o servir como plataforma de aterrizaje a los polinizadores.

e) Aunque durante el desarrollo de la flor el labio está ubicado en el lado superior, en las flores maduras por lo común se encuentra en el lado inferior, condición conocida como “resupinación”. Este cambio de posición se logra mediante varios mecanismos, ya sea que la inflorescencia cuelgue libremente, que el pedicelo u ovario se flexionen, o con más frecuencia, que se tuerza 180°.

f) Salvo las orquídeas Apostasioides y algunos representantes de Cypripedioideae y Vanilloideae en los que los granos de polen son individuales, el polen presenta algún grado de agregación y en la mayoría es liberado en unidades formadas por cuatro granos (“tétradas”), que a su vez constituyen cuerpos más o menos sólidos llamados polinios. Los polinios varían en consistencia, dependiendo del grupo del que se trate, de suaves a granulados, duros y cerosos o “cartilaginosos”. El número de polinios en una flor, varía dependiendo del grupo, entre dos y ocho y pueden ser removidos de una antera y depositados en el estigma todos ellos juntos o por

separado. La unidad de dispersión que incluye a los polinios y, en muchos casos, estructuras accesorias para pegarlos a los polinizadores, es llamada polinario. Durante la polinización la deposición de los polinios duros en el estigma es un evento de “todo o nada”, mientras que un polinizador que porta polinios granulados o formados por masa puede polinizar varias flores con un solo polinio o juego de ellos, dejando fragmentos de los mismos en diferentes estigmas.

g) Con la excepción de las orquídeas Apostasioides y Cyripedioides, la columna presenta un “rostelo”, una parte no receptiva del lóbulo medio del estigma que separa a los polinios de la superficie fértil del estigma e interviene en la dispersión de éstos (Richard, 1817; Dressler, 1993; Kurzweil, 1988). El rostelo por lo general produce una porción adhesiva que permite fijar el polinario al polinizador. La parte adhesiva puede estar pegada al polinario constituyendo un “viscido”, o producir una sustancia viscosa que sólo entra en contacto con los polinios mediante la intervención del polinizador, siendo entonces llamado “viscario” (Dressler, 1993; Dressler y Salazar, 1991).

Las flores de las orquídeas por lo general son hermafroditas y portan tanto órganos sexuales masculinos (estambres y anteras) como femeninos (ovario, estilo y estigma). Sin embargo hay algunos casos en que los sexos están separados ya sea en el tiempo o en el espacio. En el primer caso las flores son protándricas, es decir, al principio funcionan como “machos” o donadores de polinios pero no pueden ser polinizadas, después de algún tiempo cambian a la función receptiva, en algunas flores de manera espontánea y en otras sólo después de que sus propios polinios han sido removidos. Esta situación es muy frecuente en el género *Mormodes* y en otros grupos de orquídeas, incluyendo terrestres, como varias *Godyerinae*, *Spiranthes* y algunos géneros de *Presscottia* (Akerman, 1975; Catling, 1982,1983; Singer y Sazima, 2001a, 2001b).

1.4.7 Polinizadores

La vasta diversidad de formas, tamaños y estructuras florales desplegada por las orquídeas tiene como finalidad la polinización cruzada, es decir, la transferencia de polen entre la antera de una flor y el estigma de otra de la misma especie. Todas las orquídeas que no se auto polinizan son polinizadas por animales, sobre todo insectos como abejas y avispas, diversas clases de moscas y mariposas diurnas y nocturnas, además de aves como los colibríes (Hágsater *et al.*, 2005).

1.4.8 Semillas y Germinación

Los frutos de las orquídeas son cápsulas que al madurar presentan varias aberturas longitudinales a través de las cuales son liberadas las semillas. El número de semillas por fruto puede variar entre unos pocos miles y cuatro millones; su tamaño es muy pequeño, miden entre 0.3 y 4mm de largo y pesan por lo general entre 0.4 y 2 µg (Arditti, 1992).

El reducido tamaño de las semillas es una severa limitante al tamaño del embrión. Por ende, en las orquídeas éste es diminuto e indiferenciado, es decir, no presenta órganos incipientes como en las semillas de muchas otras plantas, sino que consiste por lo general en una mera masa de células. La semilla carece de reservas nutritivas, por lo que su germinación requiere de la asociación con ciertos hongos que le proporcionen nutrientes. Si después de salir de la cápsula madura la semilla llega a un ambiente con las condiciones fisicoquímicas y de humedad apropiadas, en el que además se encuentre el hongo apropiado, el embrión absorberá humedad y aumentará de tamaño formando protocormos (Arditti, 1992). En la figura 3 se esquematiza el proceso de germinación de *Spiranthes*, el cual es muy similar al resto de la subtribu Spiranthinae.

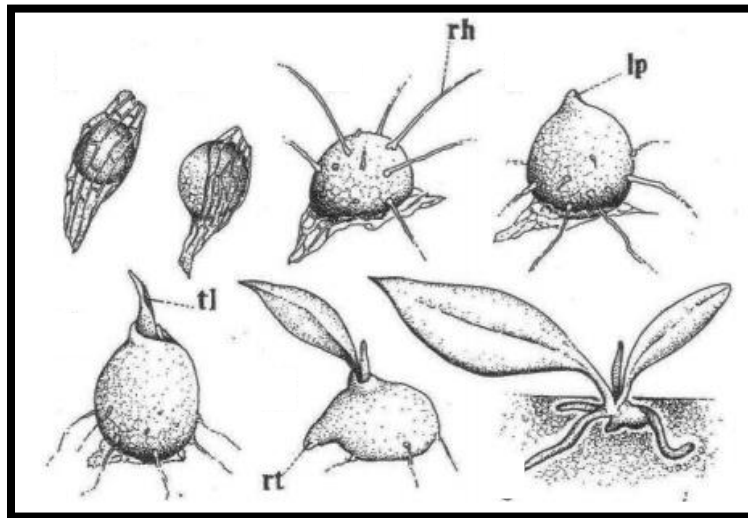


Figura 3.- Diagrama de germinación de una semilla *Spiranthes cernua* y sus diferentes etapas de desarrollo y crecimiento; rh, rizoides; lp, primordio foliar; tl, hoja verdadera; rt, raíz. (Zettler y McInnis, 1993).

1.5 Estado de conservación de la Familia Orchidaceae en México

México cuenta con más de 1,200 especies de orquídeas, las cuales tienen una distribución heterogénea, ya que el 60% de las especies se encuentran en el bosque de neblina, el cual ocupa menos del 1% del territorio, dichos bosques han y están siendo talados de manera indiscriminada.

La deforestación en México ha alcanzado niveles importantes y hoy se estima en 4.2% anual (Villalobos y Thorpe, 1991). Algunos autores han calculado que 75% del territorio del país ya habría sido deforestado para el año 2000 (Toledo, 1988), si bien esta cifra podría ser una sobreestimación en vista de la gran extensión aún cubierta por matorrales xerófilos; la deforestación se debe principalmente a la ganadería extensiva, agricultura y producción forestal, otras fuentes importantes del deterioro son los incendios forestales, el crecimiento desmedido de las ciudades, los asentamientos humanos irregulares, la contaminación del aire, agua y suelo, la desecación de los humedales y el establecimiento de presas y complejos hidroeléctricos, por mencionar algunas

(Hágsater *et al.*, 2005). Se sabe que en los dos últimos siglos se extinguieron dos especies de orquídeas en el país, es el caso de *Plectrophora alata* y *Malaxis lyonnetii*; y que a partir de 1998 se han extinguido por lo menos 22, por mencionar algunas especies como *Laelia gouldiana*, *Dracula pusilla*, *Lycaste lassioglossa*, entre otras (Hágsater y Soto-Arenas, 1998; Soto-Arenas, 1994; 1996; Soto-Arenas y Solano, 2004).

En México se cuenta con la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, una Ley General de Vida Silvestre y su reglamento, así como una Norma Oficial Mexicana que categoriza diversos organismos dependiendo de su rareza y grado de amenaza, la cual es la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), en la que se enlistan 186 especies de orquídeas en alguna categoría de riesgo, siendo la segunda familia de plantas con mayor especies enlistadas después de las cactáceas. Ambas especies *Dichromanthus cinnabarinus* y *Dichromanthus aurantiacus* no se encuentran categorizadas en la Norma Oficial Mexicana-059-SEMARNAT-2010.

A nivel mundial la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) tiene categorizada a toda la familia Orchidaceae en el Apéndice I, II y III dependiendo su situación. Así, la Convención establece que las especies amenazadas cuyo comercio es regulado, deben ser colocadas en tres apéndices, en donde se agrupan para ofrecer diferentes niveles y tipos de protección. En el Apéndice I se incluyen las especies de animales y plantas con un alto riesgo de extinción, su comercio está prohibido, excepto en condiciones especiales, por ejemplo, con fines de investigación científica. En el Apéndice II se incluyen especies que no están amenazadas de extinción, pero que podrían llegar a estarlo si su comercio no es regulado estrictamente, por lo que se requiere tramitar un permiso de exportación para su comercio. En el Apéndice III se incluyen las especies que pueden estar amenazadas de extinción a nivel local, debido a una sobreexplotación comercial, y que no se incluyen en los Apéndices I o II (Ayensu y Defilipps, 1981; Rodan y Campbell, 1996).

1.6 Clasificación taxonómica *Dichromanthus cinnabarinus* (Lex.) Garay., 1982.

REINO Plantae

DIVISIÓN Magnoliophyta

CLASE Liliopsidae

SUBCLASE Liliidae

ORDEN Orchidales

FAMILIA Orchidaceae

SUBFAMILIA Spiranthoideae

TRIBU Cranichideae

SUBTRIBU Spiranthinae

GÉNERO *Dichromanthus*

ESPECIE *Dichromanthus cinnabarinus*



DESCRIPCION BOTÁNICA (Soto-Arenas, 2002)

Hierba terrestre de 34 – 120 cm de alto. **Raíces** fasciculadas, hasta 30 cm, cilíndrico-fusiformes, 4-15 cm de largo, 8-10 mm de grosor. **Tallo** de 10 -50 cm de alto (a veces acaulecente y formando una roseta basal), 5-8 mm de grosor, continuo por el pedúnculo. **Hojas** caulinares de 3-5, presentes durante la floración, las mayores cerca de la mitad del tallo, otras más reducidas y similares a vainas y brácteas hacia la base y ápice, oblongo-ablanceoladas o linear-lanceoladas, agudas u obtusas, largamente tubular- envainantes en la base, verde grisáceo, más pálidas en el envés; la lámina de 9-28 x 0.85 cm, la vaina hasta 12 cm de largo. **Inflorescencia** con el pedúnculo glabro abajo, pubescente arriba (pelos septados, glandulares), de 20-45 cm de largo, casi totalmente revestido por brácteas tubulares, agudas, herbáceas, de 2.5-15 cm de largo; la espiga muy vistosa, cónica o cilíndrica, de 4.5-22 x 4-5 cm, densa, con 18-65 flores, sucesivas, dispuestas helicoidalmente, las flores algo dirigidas hacia un lado. **Brácteas florales** lanceoladas u ovadas, acuminadas, sésiles, cóncavas, escarlata, pubescentes-ciliadas, 14-32 x 3-8.5 mm, **Ovario** sésil, ascendente, elipsoide-fusiforme, muy carnoso, conspicuamente torcido, carinado, piloso, anaranjado piloso, anaranjado-verdoso, 5-8 x 3-5.6 mm. **Flores** descendentes, tubulares, con el ápice de todos los segmentos fuertemente recurvado, carnosas. **Sépalos** dorsalmente papilosos pubescentes en la base; el dorsal adherente a los laterales de 7-10 mm, triangular o lanceolado, agudo-acuminado, 15-22 x 3-4.5 mm, los laterales lanceolados, oblicuos, agudo-acuminados recurrentes sobre el pie de la columna, 14-22 x 2.2-3.8 mm. **Pétalos** adherentes a todos los sépalos, al labelo y a los estaminodios, recurrentes sobre el pie de la columna, sigmoideo lanceolados falcados, agudos-subagudos, a veces mucronados, atenuados hacia la base, 14-22 x

2.1-3.2mm. **Labelo** sésil, de 17-22 mm de largo, lanceolado-panduriforme en contorno general; formado por una base, un disco y un ápice, la base oblonga, canaliculada, de 2.5-3 x 1.5-2 mm, con dos engrosamientos marginales, lisos, aparentemente secretores de néctar; el disco elíptico u ovado, de 7-12 x 3.8-6 mm, con los márgenes erectos y unidos a los estaminodios; el ápice extendido a recurvado, triangular-lanceolado, acuminado, 7-10 x 1.8-2.2 mm (ancho en la base); pubescente-papilosos en ambas superficies en el 1/3 basal. **Columna** con un cuerpo de 7-9 mm de largo incluyendo el rostelo; clavado, dorsiventralmente comprimido, recto, centralmente pubescente, con un pie largamente recurrente sobre el ovario, de 5-6 mm de largo; estaminodios erectos, ovados, agudos. **Estigma** ventral, bilobado, de 1.8 x 1.8 mm. Rostelo angostamente triangular-sublinear, laminar, submembranáceo, triangular y envolviendo ligeramente al viscidio; el ápice extremo del remanente subtruncado, 2-3 dentado. **Antera** dorsal, bilocular, ovada-angostamente, triangular acuminada, cordada en la base, dorsamente surcada, 4-4.5 x 2.5 mm. **Polinario** de 6.5-7 x 1.5 mm, con dos polinios amarillos cremosos, largamente clavados, dorsalmente surcados, nudos por un viscidio central, fusiforme-ablanceolado, adhesivo, subapical, de 2.3 x 0.25 mm, largamente elíptico. **Cápsula** erecta, elipsoide, 3-carinada, lanuginosa, 9-14 x 6-8 mm. (Icones Orchidacearum. 2002). (Figura 4).

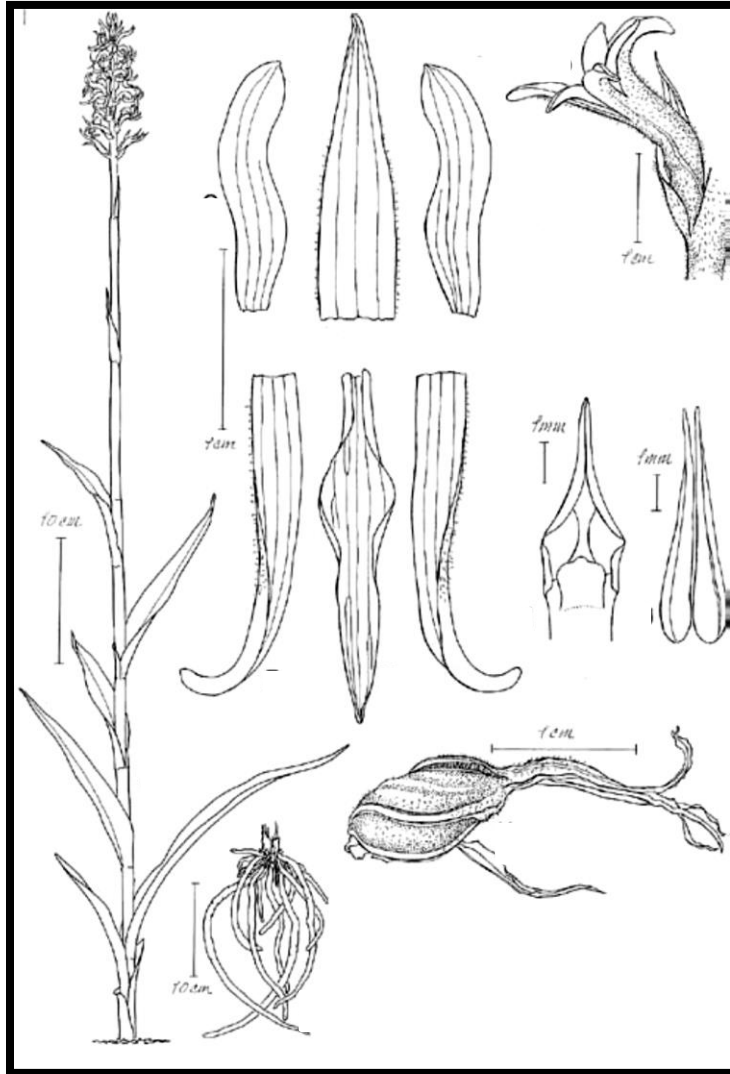


Figura 4.- Esquema general de la planta de *Dichromanthus cinnabarinus* (Garay), se muestra la morfología de las flores y cápsula (Tellez y Flores, 2007).

1.7 **Clasificación taxonómica** *Dichromanthus aurantiacus* (Lex.) Salazar y Soto Arenas, 2002.

REINO Plantae

DIVISIÓN Magnoliophyta

CLASE Liliopsidae

SUBCLASE Liliidae

ORDEN Orchidales

FAMILIA Orchidaceae

SUBFAMILIA Spiranthoideae

TRIBU Cranichideae

SUBTRIBU Spiranthinae

GÉNERO *Dichromanthus*

ESPECIE *Dichromanthus aurantiacus*



Planta herbácea perenne, densamente pilosa en la parte superior, ennegreciéndose al secar, hasta de 1 m de alto; **raíces** abundantes, fasciculadas, algo carnosas, de unos 5 cm de largo y ± 1 de ancho; **tallos** erguidos con hojas alternas a todo su largo, convirtiéndose en vainas hacia el escapo floral; lámina orbicular-ovada a oblongo-lanceolada, de 7 a 25 cm de largo por 4 a 8.5 cm de ancho, subobtusamente aguda, margen ondulado; **inflorescencia** en forma de espiga densa hasta de 25 cm, con pocas a 20 flores, **bráctea floral** vistosa, de color naranja a amarillo, a veces verdosa, de 3 a 6 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, a veces hasta del doble del largo de la flor y cubriéndola en buena parte; **ovario** casi sésil, pubescente; **flor** pubescente, de color naranja o rojo-anaranjado, tubulosa, de 2.5 a 3 cm de largo; sépalos de 2 a 2.5 cm de largo por 5 a 7 mm de ancho, el dorsal oblongo a lanceolado, con duplicado en la base, con sus márgenes adherentes a los pétalos de la mitad hacia el ápice, sépalos laterales libres, oblongo-lanceolados; **pétalos** oblicuamente linear-oblongos, de 2 a 2.5 cm de largo por 3 a 4 mm de ancho, obtusos a subagudos, recurvados; **labelo** ovado-lanceolado, obtuso y recurvado en el ápice, lámina de 1.5 a 2 cm de largo y 6 a 9 mm de ancho cerca de la base, que es adherente a la columna y que se estrecha en una parte basal libre de 7 a 8 mm de largo, discos con dos callosidades cerca de la base; **columna** claviforme, de alrededor de 1 cm de largo; **cápsula** ampliamente elipsoide a subglobosa, de 1.5 de largo por 1 a 1.2 cm de ancho. Se distribuye desde Chihuahua hasta Centroamérica (Figura 5).

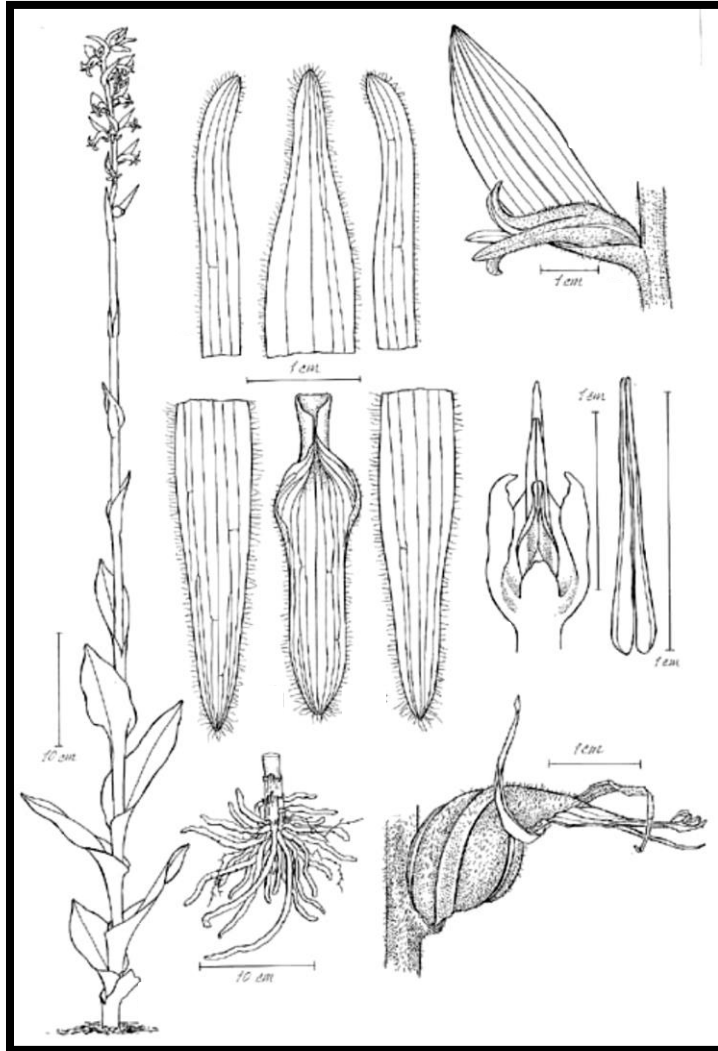


Figura. 5.- Lámina de *Dichromanthus aurantiacus* (Lex.) Salazar y Soto-Arenas, se muestra la morfología de las flores y forma de la planta (Tellez y Flores, 2007).

2 ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de Tejidos Vegetales

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902, con los intentos realizados por Haberlandt al cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencialidad celular, el cual es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro* (Jiménez, 1998). La capacidad de cualquier célula vegetal para dividirse, crecer y desarrollarse como un organismo multicelular, hasta constituir una planta completa, es lo que se denomina como totipotencialidad celular (Razdan, 2002). Reinert, Steward y colaboradores reportaron la formación de embriones somáticos (embriones adventicios originados en células somáticas) originados a partir de células aisladas, con lo que se demostró la totipotencialidad de las células vegetales (Litz y Jarret, 1991).

La aplicación del Cultivo de Tejidos Vegetales, se justifica en especies que se propagan vegetativamente (ajo, papa, camote, etc.), en aquellas que producen semillas recalcitrantes (la mayor parte de los frutos tropicales) (Chávez y Rublo, 1995), así como cuando por los métodos tradicionales la germinación de las semillas y la producción de nuevos individuos es muy lenta y limitada, cuando resulta difícil establecer un sistema de propagación clonal y masiva o cuando una especie se encuentra en peligro de extinción y existen muy pocos individuos (Martínez, 1991)

El cultivo de tejidos vegetales ha sido extensamente explorado, no solo por la rápida y gran escala de propagación en orquídeas, sino también en la conservación *ex situ*. Los protocolos de cultivo han sido desarrollados debido a la gran escala de propagación de diversas especies de orquídeas a través del cultivo *in vitro* de diversas partes de la planta (Arditti y Ernst, 1993). Este potencial regenerativo ha sido exitosamente probado en muchas especies que representan a diversas afinidades taxonómicas, hábitos de crecimiento y hábitats (Churchill *et al.*, 1970, 1971; Seeni y Latha, 1992; Nayak *et al.*, 1997), en donde a pesar de la gran cantidad de semillas que se producen por fruto (miles a millones), del 1-2% de las semillas logran germinar en condiciones naturales como las orquídeas (Philip y Nainar, 1988).

2.2 Cultivo de Tejidos Vegetales en orquídeas

La propagación moderna de orquídeas se desarrolló en 1949, cuando “un nuevo (cultivo de tejido *in vitro*), simple y práctico método de propagación vegetativa (clonal) de *Phalaenopsis* (orquídea) fue desarrollado en la universidad de Cornell” (Rotor, 1949). En 1954 se publica el primer reporte de los métodos usados para la micropropagación. El medio nutritivo usado para los cultivos fue Knudson C formulado para la germinación asimbiótica de orquídeas, diseñado por Lewis Knudson (Arditti, 1990). En orquídeas, el cultivo de tejidos de células somáticas puede formar cuerpos parecidos a protocormos (PLB'S por sus siglas en inglés), los cuales pueden convertirse en plantas individuales (Arditti y Erns, 1993). La regeneración vía multiplicación de PLB's es un eficiente

método de propagación clonal de orquídeas. Tres líneas de investigación condujeron al desarrollo de los métodos de micropropagación de orquídeas: 1) el cultivo *in vitro* de meristemas de tallo de otras plantas y la regeneración de plántulas de los mismos, 2) la producción libre de enfermedades (principalmente virus) de clones de cultivos importantes, y 3) la propagación clonal. Los antecedentes de estos estudios se han hecho por separado y llegado hasta el punto en el que convergen (Tanaka *et al.*, 1974).

Existen diversos factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación, como son: 1) El tipo de explante, en donde, su estado fisiológico influye significativamente en su capacidad morfogénica, 2) los reguladores de crecimiento empleados y sus concentraciones y 3) el medio de cultivo, en donde el éxito de la micropropagación dependerá de su composición y forma física (Villalobos y Thorpe, 1991).

De acuerdo con Pérez-Molphe-Balch (1999), los aspectos fundamentales para lograr el éxito en un sistema de cultivo de tejidos vegetales son los siguientes:

Elección del explante. El explante es el órgano o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, tallo, cotiledón o raíz, entre otros. En teoría, cualquier segmento de tejido vegetal que contenga células vivas puede ser utilizado como explante. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el tipo de explante que se elija será determinante en la obtención de la respuesta deseada, ya que cada uno de ellos responderá de manera diferente al cultivo. Por regla general, entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*.

Elección del medio y condiciones de cultivo. El medio de cultivo junto con el tipo de explante determina la respuesta que se obtendrá del mismo. Los medios de cultivo más usados en el cultivo *in vitro* de orquídeas son Knudson C (Kc) y Murashige y Skoog (MS). A grandes rasgos, el medio de cultivo consiste en dos grupos de componentes. Los primeros son los esenciales, es decir, aquéllos que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del tejido cultivado. Este grupo incluye a los nutrientes minerales como macro y micro nutrientes, la fuente de carbono y algunas vitaminas. El segundo grupo de compuestos, son los llamados opcionales, que si bien en ocasiones no son indispensables para mantener la vida del tejido en cultivo, sí determinan en gran medida el tipo de respuesta que se obtendrá de éste, y por lo tanto influyen en el éxito o fracaso del establecimiento y respuesta de los cultivos *in vitro*. A este grupo pertenecen las fitohormonas, siendo a menudo críticas en el cultivo *in vitro* de células de plantas, tejidos y órganos. Además de la formulación del medio, es importante considerar las condiciones físicas del mismo, semisólido o líquido, así como las condiciones de incubación de los cultivos (luz, fotoperiodo, temperatura y humedad), ya que éstas también influyen a la respuesta del explante.

Condiciones asépticas. Para que el cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, debe excluirse del mismo a cualquier microorganismo patógeno. Lo cual resulta difícil en muchos casos, debido a que los medios de cultivo utilizados, son muy ricos en nutrientes y generalmente tienen un alto contenido de carbohidratos, lo que los hace ideales para el desarrollo de prácticamente cualquier microorganismo. Por tanto, el material vegetal, debe desinfectarse para evitar cualquier tipo de contaminación.

De acuerdo con George y Sherrington (1984), existen tres vías diferentes para lograr la regeneración de plantas *in vitro*: la organogénesis, embriogénesis somática y activación de yemas preformadas. Éstas pueden ocurrir de manera directa a partir del explante inicial o bien mediante la formación de callo y su posterior diferenciación.

La organogénesis en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se refiere a la formación de *novo* de órganos a partir de los explantes cultivados. Entre los órganos que se pueden formar se encuentran las raíces, tallos o los llamados brotes adventicios, que son estructuras similares a una yema y tienen la capacidad de originar una nueva planta después de elongarse y formar raíces (Terzi y Loschiavo, 1990).

La embriogénesis somática es una vía en la que las células somáticas o asexuales presentes en las células vegetales, forman un embrión sin la necesidad de la fusión de gametos, mediante un proceso muy similar a la embriogénesis cigótica (Thorpe y Stasolla, 2001). Estas estructuras son capaces de crecer y formar plantas completas (Gómez, 1998). Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa (ESD) y la indirecta (ESI). En la embriogénesis somática directa, los embriones aparecen directamente sobre el explante original, mientras que en la embriogénesis somática indirecta, como primer paso es indispensable obtener callo a partir del cual se obtendrá la diferenciación de los embriones somáticos en un segundo paso. Éste es un proceso más complejo que la embriogénesis somática directa. La ESD, ocurre cuando en el explante original existen ya células proembriogénicas, por lo que no es necesario el proceso de inducción y sólo se requiere proporcionar al tejido las condiciones adecuadas para que suceda la diferenciación de los embriones somáticos. En la ESI, el explante original no tiene células proembriogénicas, por lo que se requiere primero darle al tejido las condiciones para que ocurra la inducción, y después cambiarlo a otras que sean propicias para la diferenciación de los embriones. Las células de tejidos muy jóvenes son en gran proporción células proembriogénicas, o si no, son fácilmente inducibles para que lo sean, mientras que las células más diferenciadas o de tejidos adultos, muy difícilmente o casi nunca se llegan a convertir en proembriogénicas (Gómez, 1998; Pérez-Molphe-Balch, 1999).

2.3 Cuerpos parecidos a protocormos (PLB's)

En orquídeas, células somáticas provenientes de tejidos cultivados *in vitro* pueden formar cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) que podrían convertirse en plantas individuales (Arditti y Ernst,

1993). La regeneración vía multiplicación de PLB's es un método eficiente en la propagación clonal de orquídeas (Tanaka *et al.*, 1975; Arditti y Ernst, 1993; Park *et al.*, 1996). La alta regeneración de brotes en hojas jóvenes y semillas de orquídeas es atribuida a la edad fisiológica de los explantes (Vij *et al.* 1984, 1986, Mathews y Roa, 1980, Vij y Pathak, 1990), los PLB's al ser un tejido celular joven, no diferenciado y con alta totipotencialidad puede ser dirigidos a organogénesis directa o formación de embriones somáticos. En condiciones *in vitro* se ha demostrado que la clonación de PLB's sigue dos caminos: (Figura 6) la formación de un gran número de brotes apicales, con una mayor producción endógena de raíces adventicias (A) y la formación de numerosos PLB's secundarios provenientes de células epidermales de un protocormo simple (B) (Batygina y Vasilyeva, 1983a,b; Batygina y Shevtsova, 1985; Shevtsova *et al.*, 1986; Andronova,1988; Batygina, 1998; Andronova *et al.*, 2000; Batygina y Andronova, 2000).

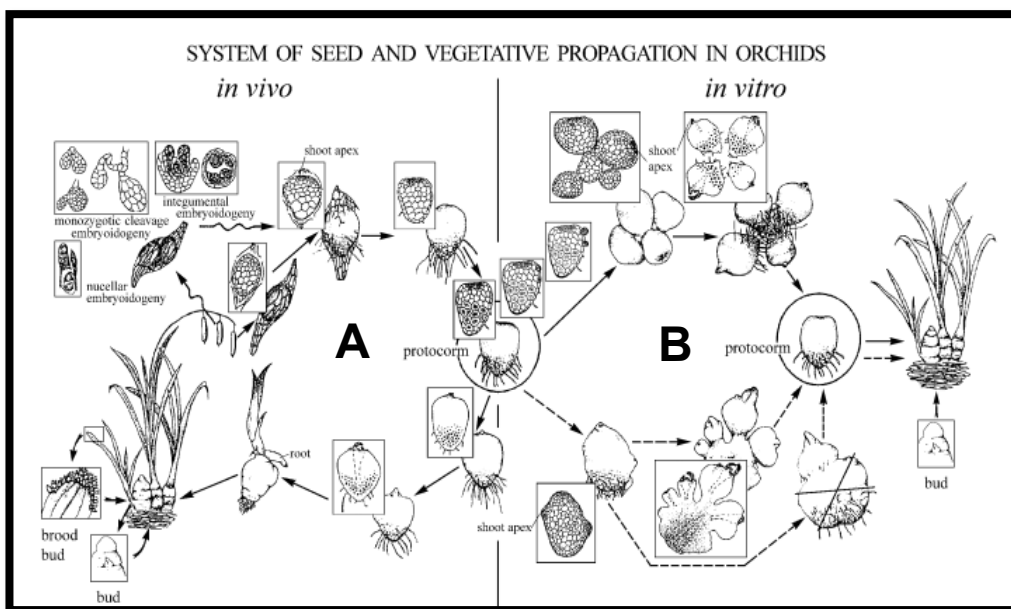


Figura 6.- Diagrama que muestra las dos rutas que puede seguir la clonación *in vitro* de PLB's, ruta de formación de protocormos apicales (A) y ruta de formación de protocormos secundarios (B) (Batygina, 1998., modificado).

2.4 Reguladores de Crecimiento Vegetal

Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan las hormonas vegetales o fitohormonas. Las fitohormonas son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades modifican, estimulan o inhiben el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Pérez-Molphe-Balch, 1999).

Se reconocen cinco grupos básicos de reguladores de crecimiento vegetal, dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: 1) auxinas, 2) citocininas, 3) giberelinas, 4) etileno y 5)

ácido abscísico. De todos éstos, los dos primeros son los más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis en el cultivo de órganos y tejidos (George y Sherrington, 1984).

2.4.1 Auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos cuyo precursor es el triptófano, sintetizados por lo general en los ápices de las plantas (sitios de crecimiento activo), los cuales están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. En las plantas completas, las auxinas tienen que ver con la dominancia apical, afectan la senescencia y abscisión de las hojas y coordinan algunas respuestas trópicas (Pérez-Molphe-Balch, 1999). En el cultivo de tejidos vegetales promueven el crecimiento de callo, así como el crecimiento y elongación celular, la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos (raíces) (George y Sherrington, 1984). La auxina natural más común es el ácido-3-indolacético (AIA), pero dependiendo de la especie, edad de la planta, estación del año y condiciones de crecimiento pueden aparecer otras auxinas en los tejidos, se desarrollaron auxinas sintéticas como el ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido indol-3-acético (IAA) o el ácido indol-3-butírico (IBA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) (George y Sherrington, 1984; Pérez-Molphe-Balch, 1999).

En cultivo de tejidos dependiendo la especie y concentración a usar es la inducción de callo, formación de clorofila, formación de raíces y embriogénesis. En algunos géneros de orquídeas como *Paphiopedilum* y *Vanilla*, la aplicación de auxinas puede iniciar el desarrollo del fruto sin que ocurra la polinización. Las auxinas también estimulan el desarrollo del óvulo en los géneros *Cymbidium*, *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Vanda* y *Phaius*, entre otros (Arditti, 1992).

2.4.2 Citocininas

Las citocininas generalmente son derivados de la adenina, y son sintetizadas en tejidos jóvenes y raíces. Los embriones y frutos jóvenes, presentan concentraciones altas de citocininas, sin embargo, éstas necesitan ser aisladas a partir de raíces, hojas y flores, entre otras (Arditti, 1992). Las citocininas naturales más comunes son la zeatina, la 2-isopentiladenina (2iP) y el ribósido de zeatina. Estas citocininas naturales se caracterizan por poseer un esqueleto de adenina con una cadena lateral isoprenoide. Las citocininas sintéticas son benciladenina (BA) y kinetina (Kin), son las más utilizadas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Algunos herbicidas sintéticos como las fenilureas tienen actividad de citocinina en bajas concentraciones. Un ejemplo de éstos es el N-fenil-N'-1,2,3-tidiazolil-5-urea (Tidiazurón) (Pérez-Molphe-Balch, 1999). Poseen dos propiedades que las hacen muy útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales; por un lado, estimulan la división celular y por otro rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar.

En las plantas completas, las citocininas promueven la brotación de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia (Pérez-Molphe-Balch, 1999). En las orquídeas,

las citocininas se han utilizado principalmente para: 1) el inicio y mantenimiento de cultivos de tejidos vegetales, 2) mejorar la producción de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de callo, 3) inducir la floración en híbridos como *Dendrobium* y *Aranda* y 4) para incrementar el número de brotes laterales (Arditti, 1992).

2.4.3 Interacción entre auxina- citocinina

Muchos aspectos de la diferenciación celular y organogénesis en el cultivo de tejidos se ha encontrado que son controladas por la interacción entre las concentraciones de auxinas y citocininas. El balance entre estos dos reguladores es frecuentemente requerido para iniciar el crecimiento o diferenciación en el cultivo de tejidos; la interacción entre estos dos reguladores es compleja y más de una combinación de estas sustancias es probable que produzca óptimos resultados en la formación de brotes, raíces o formación de plántulas (George y Sherrington, 1984). Las auxinas son conocidas desde hace largo tiempo por jugar un rol crucial en la especificidad de las células de la raíz durante la embriogénesis, la función de las citocininas en la embriogénesis temprana es sugerida de manera reciente por una transitoria y antagónica interacción entre las auxinas y citocininas (Müller y Sheen, 2008), estudios en la regulación química en el crecimiento y formación de órganos en cultivo de tejido *in vitro* ha indicado que los excesos de citocininas sobre auxinas promueve la formación de callo (Skoog and Miller, 1957), diversos estudios han demostrado que las citocininas y auxinas regulan mutuamente los caminos de señalización o su metabolismo a través de ciertos integradores, los cuales son la base de la interacción entre éstas dos hormonas para determinar el desarrollo específico en el desarrollo del meristemo de raíz (Dello loio *et al.*, 2008; Moubayidin *et al.*, 2009; Růžičkaa *et al.*, 2009), también es responsable en el control de la división celular y la diferenciación en el meristemo de la raíz (Dello loio *et al.*, 2008; Moubayidin *et al.*, 2009). La interacción entre auxina y citocinina es el control de eventos de mayor especificidad celular durante la embriogénesis (Müller y Sheen, 2008; Möller y Weijers, 2009).

En las orquídeas, la información relacionada con los efectos de las interacciones hormonales sobre la formación de plántulas es muy escasa. En algunos trabajos, se reporta que la combinación de auxinas como el ANA y el 2,4-D y citocininas como la Kin o la BA, pueden incrementar el crecimiento, pero los efectos de estas combinaciones pueden variar dependiendo de los reguladores de crecimiento utilizados, sus concentraciones y las especies bajo estudio (Arditti y Ernst, 1984).

2.5 Compuestos adsorbentes

2.5.1 Carbón activado

El Carbón activado se produce de madera, residuos de madera, residuos de fábricas de papel y turbas, sometidos a altas temperaturas superiores a los 500°C, por largos periodos de tiempo (más de 10 horas) (El-Hendawy *et al.*, 2001). Es ampliamente utilizado en el cultivo de tejido de plantas, adicionado al medio líquido o semi-sólido, la adición de Carbón activado al medio de cultivo de tejidos puede tener efectos benéficos o adversos en el crecimiento y desarrollo, dependiendo del medio, tejido usado y/o objetivos a investigar, mejorando el crecimiento, desarrollo celular y de tejido en plantas, es promotor de la embriogénesis somática, formación de raíces, elongación de brotes y raíces, formación de bulbos y como inhibidor en la oxidación de tejidos (Pan y Van Staden, 1998). Estos efectos benéficos pueden ser por varias razones, como el oscurecimiento y aeración en el medio de cultivo (Johansson *et al.*, 1990). Las concentraciones más comunes de Carbón activado empleadas en la literatura varían desde 0.5 a 10 g/L siendo más frecuentes las concentraciones de 2 y 3 g/L (Azofeifa, 2007). Por lo anterior para *D. cinnabarinus* y *D. aurantiacus* se decidió utilizar 1 y 2 g/L, siendo 2g/L la concentración más usada en especies del género *Paphiopedilum* (George, 1996), la cual también es una orquídea de hábitos terrestres.

En orquídeas el uso de Carbón activado tiene respuestas muy diversas, en *Cymbidium forrestii* promueve el crecimiento de rizomas e inhibe la formación de brotes (Paek y Yeung, 1991), en *Vanilla planifolia* promueve la formación de raíz (George y Ravishankar, 1997).

2.5.2 Polivinil pirrolidona (PVP)

El PVP es una poliamida. Esta sustancia fue inicialmente utilizada como adsorbente en la técnica de separación por cromatografía de sustancias ácidas aromáticas, aldehídos y fenoles. Para el caso de los fenoles, estos son adsorbidos a través de uniones hidrógeno, previniendo la oxidación y polimerización (George, 1996).

Tanto el PVP como la polivinilpirrolidona (PVPP) han sido utilizados en la prevención del oscurecimiento de tejidos, ya sea, aplicado como enjuagues al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo. El PVP se ha aplicado como tratamiento al momento de separar el explante de la planta donadora (Amin y Jaiswal, 1988) como pretratamiento anterior o posterior al proceso de desinfección (Gannoun *et al.*, 1995, Figueiredo *et al.*, 2001).

En especies como *Anacardium occidentale* (D´Silva y D´Souza, 1993), *Dendrocalamus latiflorus* (Huang *et al.*, 2002), *Parakmeria lotungensis* (Mengyun y Jingmin, 2004) y *Spomdias purpurea* (Azofeifa, 2007), la adición de PVP al medio de cultivo no ayudó a controlar el problema. Como efecto indirecto, Bonga y Durzan (1982) mencionan que el PVP agregado al medio de cultivo, con

el fin de reducir la actividad de la hormona polifenol oxidasa (PPO), fue inhibitorio para el crecimiento de callos en *Eucalyptus grandis* (Saxena y Dhawan, 1999)

Las concentraciones más frecuentes en el uso de PVP adicionado al medio de cultivo en la literatura varían de 0.001 a 20 g/L (Abdullah *et al.*, 1989; Walkey, 1972).

2.6 Compuestos orgánicos

2.6.1 Extracto de plátano

Es catalogado como compuesto orgánico indefinido, utilizado con frecuencia en lugar de vitaminas o aminoácidos ya definidos, incluso como suplemento adicional. El Extracto de plátano ha sido reportado rico en potasio, fósforo, sodio, calcio, magnesio y micro elementos como hierro, cobre, zinc boro y magnesio (Hardisson *et al.*, 2001).

El Extracto de plátano es a veces añadido al medio de cultivo de orquídeas y ha sido reportado como promotor de crecimiento (George y Sherrington, 1984). La razón para este efecto estimulante aún no ha sido explicada. Se ha mencionado que posiblemente ayude a estabilizar el pH del medio de cultivo. Pierik *et al.*, reportó en 1998 que inhibe ligeramente la germinación de *Paphiopedilum ciliolare*, pero promueve el crecimiento de plántulas una vez germinadas. Ernst (1974) señaló que parece amortiguar el medio de cultivo en el que se cultivaron plántulas del género *Paphiopedilum*. Bembemcha *et al.* (2016) reportaron que al usar MS al 50% adicionado con Extracto de plátano *Vanda stangeana* presentó la mejor respuesta en el desarrollo de plántulas. Un alto número de plántulas y hojas desarrolladas por plántulas fueron obtenidas en el cultivo de *Hadrolaelia purpurata* y *Encyclia randii* cuando se suplementó medio KC con Extracto de plátano (Gonçalves *et al.*, 2011)

En protocolos de investigación el medio de cultivo debe ser siempre el mismo cada vez que se prepara, la composición de este compuesto orgánico puede variar, a pesar de mejorar los resultados se recomienda prescindir de él (George y Sherrington, 1984).

2.6.2 Caseína hidrolizada

Las proteínas, las cuales han sido hidrolizadas por ácidos o enzimas las descomponen en moléculas más pequeñas. El grado de degradación varía, algunas proteínas hidrolizadas consisten en una mezcla de aminoácidos junto con otros compuestos nitrogenados, tales como fragmentos de péptidos, vitaminas y elementos que podrían ser considerados macro o micro nutrientes (George *et al.*, 2008).

La Caseína hidrolizada es una fuente de calcio, fosfato, diversos micro elementos, vitaminas y de manera más importante una mezcla de 18 aminoácidos. Diversas investigaciones han concluido que la Caseína hidrolizada mejora el crecimiento de plántulas sólo si hay una deficiencia de

fosforo, enriquece el medio de cultivo con aminoácidos, principalmente con Glutamina; y provee una fuente inmediata de nitrógeno para el cultivo de células o tejidos (Anderson, 1976)

El uso de Caseína hidrolizada ha demostrado diversas respuestas, formación de embriones zigóticos en *Aescalus hippocastrum* (Radojevic, 1988), callo a partir de hoja de *Trigonella foenumgraecum* (Gupta, et al., 1987), formación de PLB'S en *Vanda cœerulea* (Seenii y Latha, 2000).

3 JUSTIFICACIÓN

Las orquídeas son plantas muy apreciadas a nivel mundial, pertenecen a la familia Orchidaceae que es una de las más grandes, aproximadamente 20 a 25 mil especies, su principal atractivo son las formas, colores y aroma, esto las ha llevado a que la gran mayoría esté al borde de la extinción por colecta ilegal para su venta en el mercado nacional o internacional, efectos antropogénicos como la deforestación, ganadería extensiva, reducción de sus hábitats, contaminación de agua, suelo y aire, así también la urbanización.

Dichromanthus cinabarinus y *Dichromanthus aurantiacus* son especies terrestres muy atractivas, presentan colores amarillos-naranja o rojizos con el centro amarillo, por lo cual están casi erradicadas en la cuenca de México, las pocas comunidades registradas que se conservan se localizan principalmente en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en el Campus Universitario, esto se debe a la colecta con fines ornamentales en la cuenca de México y otros estados de la República, la desaparición en estas regiones se debe también a la alteración de su hábitat. Actualmente no existe alguna norma mexicana que proteja a estas especies, sin embargo CITES es el único tratado que categoriza a estas especies para regular su comercio internacional e incluye a toda la familia Orchidaceae.

Las orquídeas terrestres presentan problemas para su germinación en condiciones naturales por los microambientes en que deben desarrollarse. La propagación y conservación de especies escasas o próximas a extinguirse en la naturaleza ha empleado el Cultivo de Tejidos Vegetales ya que se ha demostrado que múltiples especies se han logrado regenerar y conservar en condiciones *in vitro* o en macetas en los jardines botánicos. Aun así en condiciones *in vitro* presentan problemas de bajo índice en la germinación, poca sobrevivencia durante el proceso de aclimatización y reintroducción al hábitat; estos problemas no se presentan cuando las semillas son micorrizadas en la naturaleza o *in vitro*. La micorriza le permite una buena germinación, desarrollo y altos niveles de sobrevivencia en condiciones *in* y *ex vitro* comparado con semillas no micorrizadas.

Aunado a estos problemas la gran mayoría de las investigaciones en propagación de orquídeas está enfocada en especies epífitas en alguna categoría de riesgo de extinción o fines comerciales para generar híbridos de gran interés ornamental o variedades importantes. Pocos son los géneros terrestres en los que se realizan nuevos estudios, principalmente del género *Phragmipedium* y *Paphiopedilum*, ambos con fines comerciales.

Las especies terrestres no comerciales tienen un bajo interés en su propagación y conservación, al no tener un valor funcional o estético, comparado con las otras especies de orquídeas.

El material biológico fue donado por la M. en C. Iris Suárez Q. y la Dra. Ma. Del Pilar Ortelga L. del laboratorio de Microcosmos del Instituto de Geología de la UNAM, y consistió en 23 protocormos de *D. cinnabarinus* (Figuras 7 y 8) y 16 protocormos de *D. aurantiacus* (Figuras 9 y 10), de entre cuatro y seis meses de cultivo en Medio MS modificado (50% macro y micronutrientes, 0.5 g/L Caseína hidrolizada y Extracto de plátano 10% p/v). Los explantes de *D. cinnabarinus* y *D. aurantiacus* provenían de raíces de plántulas germinadas *in vitro* y de manera asimbótica. Los segmentos utilizados tenían de tres a cuatro centímetros de longitud, los explantes se obtuvieron de diversas zonas de la raíz, éstos formaron masas de celulares que proliferaban, oxidaban y germinaban, llegando a formar nuevas plántulas (Suárez, 2010) lo cual ha sido un resultado importante y no reportado, sin embargo la oxidación ha sido un carácter que ha limitado la maduración y el desarrollo de los protocormos, de ahí que la presente investigación explore su control y proliferación, esto representa un gran avance y nueva información útil en la propagación *in vitro* como un medio para la conservación de orquídeas terrestres.



Figura 7.- Protocormos de *D. cinnabarinus* después de cuatro meses de cultivo en medio MS modificado.



Figura 8.- Protormos de *D. cinnabarinus* después de seis meses de cultivo en medio MS modificado.



Figura 9.- Protocormos de *D. aurantiacus* después de cuatro meses de cultivo en medio MS modificado.



Figura 10.- Protocormos de *D. aurantiacus* después de seis meses de cultivo en medio MS modificado.

4 OBJETIVOS

4.1 General

- Controlar la oxidación y promover la proliferación *in vitro* de PLB's de *Dichromanthus cinnabarinus* y *Dichromanthus aurantiacus*.

4.2 Particulares

- Mitigar la oxidación en los PLB's de *D. aurantiacus* y *D. cinnabarinus* mediante el uso de antioxidantes (PVP y Carbón activado).
- Promover la proliferación, maduración y germinación de los PLB's de *Dichromanthus cinnabarinus* y *Dichromanthus aurantiacus* mediante el uso de compuestos orgánicos (Extracto de plátano y Caseína hidrolizada).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

5.1.1 Mantenimiento de los cultivos de protocormos donados

Inmediatamente después de la donación, los protocormos (PLB's) de ambas especies de *Dichromanthus*, fueron subcultivados al medio MS modificado (Suárez, 2010) (Apéndice A). Bajo condiciones de asepsi, en una cámara de flujo laminar, los PLB's fueron transferidos a medio de cultivo evitando la segmentación accidental y colocando tres por frásco y de cinco a siete PLB's en cajas de Petri. Los cultivos fueron almacenados a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, por dos meses antes de iniciar los protocolos de investigación.

5.1.2 Medio de cultivo MS modificado

Para la presente investigación se utilizó el mismo medio de cultivo empleado para ambas especies de *Dichromanthus* por Suárez (2010) (Apéndice A), el cual consiste en el medio MS al 50% de macro y micro nutrientes, Caseína hidrolizada 0.5 g/L, Extracto de plátano 10% p/v, sacarosa 30 g/L. Los suplementos orgánicos se agregaron antes de ajustarse y mediar el pH a 5.7, para ello se usaron soluciones buffer 1N, 0.5N y 0.1N de ácido clorhídrico (HCL) e Hidroxido de sodio (NaOH), adicionando 3.5 g/L de Gelrite®. Se repartió el medio de cultivo colocando 25 ml de medio en cada frasco Gerber. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos, 120°C y 1.5 Kg/cm². También se vertió 25 ml de medio ya esterilizado en cajas Petri de cristal en condiciones acépticas, todas las cajas fueron almacenadas en el estuche de esterilización y se mantuvieron en un lugar limpio y fresco.

5.1.3 Cultivo de cuerpos parecidos a protocormos (PLB's).

Bajo condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar, fueron transferidos al medio de cultivo evitando la segmentación accidental y colocando tres PLB's por frasco y de cinco a siete explantes en las cajas Petri. Los cultivos fueron almacenados a una temperatura de 25±1°C, fotoperiodo de 16 horas luz (lámparas de luz blanca de 1200 lux) y 8 horas oscuridad.

5.1.4 Registro de fotográfico de PLB's (medio MS modificado).

En ambos protocolos se realizó el registro durante cuatro meses (120 días), cada 15 días se documentó mediante registro fotográfico aspectos como oxidación, regeneración, proliferación y germinación de los PLB's de ambas especies a partir de la fecha de subcultivo de los PLB's.

5.2 Desarrollo de Protocolos

Para la obtención de datos acerca de la oxidación, proliferación y germinación de los PLB's en ambas especies se desarrollaron dos protocolos, el primero consistió en eliminar los compuestos orgánicos que fueron adicionados al medio de cultivo MS modificado y dando como respuesta la formación de PLB's a partir de explantes de raíz en ambas especies. Al eliminar uno o dos de los compuestos orgánicos del medio MS modificado podremos identificar cual de ellos induce la proliferación, desarrollo o germinación de los PLB's. El segundo protocolo tuvo la finalidad de reducir la oxidación mediante el uso de compuestos adsorbentes como Carbón activado y polivinilpirrolidona (PVP). En ambos protocolos se realizó el registro de datos y cada 15 días se tomaron fotografías, el periodo total que duraron los protocolos fueron 120 días (4 meses).

5.2.1 Protocolo 1 (Compuestos orgánicos)

Consistió en cuatro tratamientos modificando la presencia o ausencia de los compuestos orgánicos (Caseína hidrolizada y Extracto de plátano) en la composición del medio MS modificado, incluyendo al control, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Combinación de compuestos orgánicos en el medio de cultivo MS modificado

	Compuestos orgánicos	
	Caseína hidrolizada (0.5 g/L)	Extracto de plátano (10% P/v)
Medio MS modificado	✓	✓
	✓	----
	----	✓
	----	----

✓ El signo representa la presencia del compuesto orgánico en el medio de cultivo.

Como explantes se utilizaron PLB's segmentados con un tamaño aproximado de 3-5 mm de longitud. Fueron sembrados en MS modificado en los cuatro tratamientos de la Tabla 1. Por cada tratamiento se sembraron 10 explantes (uno por frasco) con 10 repeticiones. Los cultivos fueron incubados a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz (lámparas de luz blanca de 1200 lux) y ocho horas oscuridad.

La evaluación de los cultivos se llevó a cabo por cuatro meses (120 días), cada cinco días a partir de la siembra. Los datos registrados fueron el número de PLB's regenerados y embriones germinados por explante. El conteo de embriones somáticos se realizó con un microscopio estereoscópico. Los datos obtenidos se evaluaron a través de una suma acumulada a lo largo del tratamiento.

5.2.2 Protocolo 2 (Compuestos adsorbentes)

Se usaron los adsorbentes polivinilpirrolidona (PVP) y Carbón activado, adicionando al medio de cultivo MS modificado usando las concentraciones que se muestran en la Tabla 2, la finalidad fue reducir la oxidación. Se decidió aplicar el protocolo únicamente a la especie *D. cinnabarinus* ya que la especie presentaba una mayor oxidación y fue uno de los principales objetivos de la experimentación.

Tabla 2. Tipo de adsorbentes y concentraciones usadas en los tratamientos

Medio de cultivo	Adsorbente	Concentración
MS modificado	PVP	0 g/L
		1 g/L
		2 g/L
MS modificado	Carbón activado	0 g/L
		1 g/L
		2 g/L

Al contar con poco material biológico, solo se realizó el ensayo con una repetición, usando PLB's con un diámetro aproximado de 3-5 mm, colocando un explante por tratamiento. Se evaluó indirectamente el control de la oxidación mediante la observación de la respuesta de proliferación y germinación, esto debido a que las respuestas morfogénicas antes mencionadas se veían inhibidas por la oxidación de los explantes, reactivándose posterior a los 30 días de cultivo.

Los cultivos fueron evaluados por cuatro meses, (120 días), cada cinco días a partir del inicio del cultivo. Los datos registrados fueron el número de PLB's regenerados y germinados por explante. El conteo de embriones se realizó usando un microscopio estereoscópico. Los cultivos fueron almacenados a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz (lámparas de luz blanca de 1200 lux) y ocho horas oscuridad.

6 RESULTADOS

6.1 Cultivo de PLB's donados en medio MS modificado.

Los protocormos de *D. cinnabarinus* presentaron un color marrón oscuro, lo cual indicó un mayor grado de oxidación, algunos explantes se disgregaban al momento del subcultivo, esto permitió obtener un mayor número de explantes sin maltratarlos de manera mecánica, su consistencia era poco rígida.

En contraparte, los protocormos de *D. aurantiacus* tenían un color beige claro, no se disgregón tan fácilmente, su consistencia era muy rígida y compacta. El número de PLB's por frasco y caja Petri se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.- Numero de PLB's obtenidos en ambas especies al sembrarse en un nuevo medio de cultivo

Especie	PLB's por contenedor	PLB's totales
<i>D. cinnabarinus</i>	10	29
<i>D. aurantiacus</i>	8	16

Después de 5 días, los explantes de *D. cinnabarinus* presentaron un alto nivel de oxidación. Los PLB's que habían regenerado (color blanco) antes de ser subcultivados se tornaron marrón oscuro (Figura 11 y 12), muy pocos presentaban una coloración más clara (Figura 13).

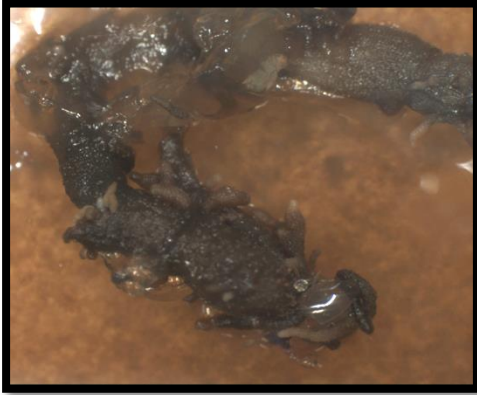


Figura 11.- Explante de raíz de *D. cinnabarinus* con PLB's completamente oxidados después de cinco días de cultivo en MS modificado (aumento 0.8x).

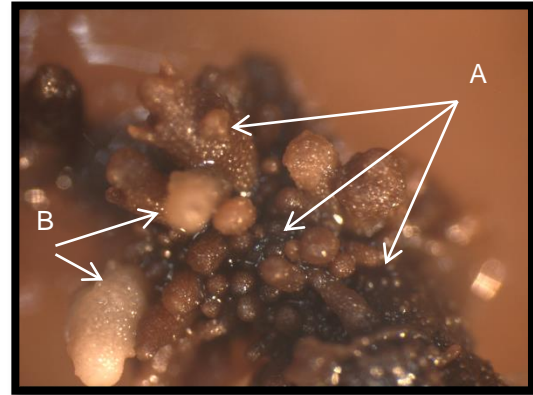


Figura 12.- Oxidación de PLB's en diversas etapas de crecimiento (A). Formación de nuevos PLB's (B) a partir de los ya oxidados en explantes de *D. cinnabarinus* (aumento 3.2x).

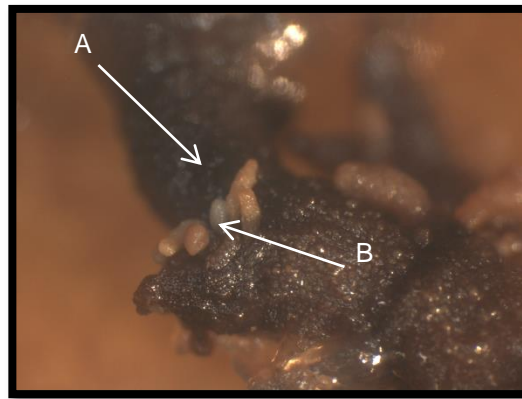


Figura 13.- Explante de *D. cinnabarinus* oxidado, PLB's oxidados de (A) y PLB's en desarrollo con coloración más clara (B) (aumento 1.25x).

Del día cinco hasta el día 60 no se presentó proliferación de PLB's en los explantes; a partir de los 60 días, el 70% de los explantes presentaron proliferación de PLB's (Figura 14 y 15), al ser observados bajo el microscopio estereoscópico se observaron nodulos de color blanco, los cuales resaltaban del color marrón oscuro de los tejidos que provenían.



Figura 14.- Formación y proliferación de PLB's en *D. cinnabarinus*, con coloración blanca (aumento 0.8x).

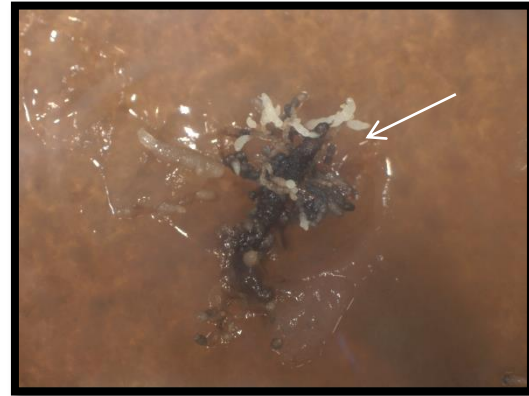


Figura 15.- Formación y proliferación de PLB's en *D. cinnabarinus* (aumento 0.8x).

A los 70 días los nódulos ya tenían una coloración blanca-hialina, de forma oval. Posterior a los 80 días la mayoría de los PLB's formados presentaban proliferación a partir de ellos mismos (Figura 16 y 17). Se realizó una estimación de los embriones somáticos formados. Debido al rápido desarrollo, este proceso se localizó principalmente en la región basal y media del explante. En un solo explante la proliferación se presentó en toda su superficie (Figura 17). A partir de los 80 días y hasta el final del registro (120 días) la proliferación fue constante en los explantes sin presentar germinación en alguno de ellos.



Figura 16.- Nuevos PLB's de *D. cinnabarinus* a partir de PLB's oxidados, su coloración es blanca-hialina, cultivados en medio MS modificado después de 80 días de cultivo (aumento 4x).



Figura 17.- Proliferación y formación de PLB's de *D. cinnabarinus* después de 80 días en medio MS modificado, a partir de PLB's oxidados. (aumento 8.0x).

En *D. aurantiacus* a partir del día 5, en la mayoría explantes presentaron una coloración beige claro, algunos tenían una coloración marrón oscuro (Figura 18 y 19).



Figura 18.- Explante de *D. aurantiacus*, con PLB's casi totalmente oxidados y algunos con presencia de rizoides (0.8x).

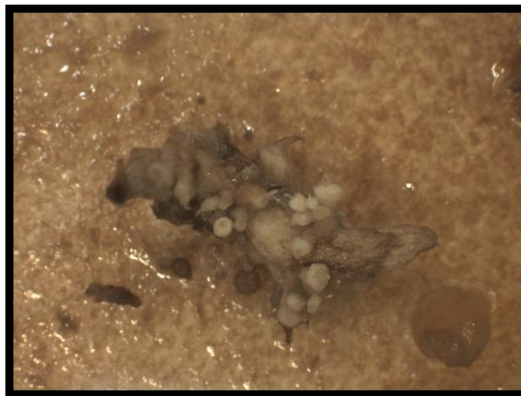


Figura 19.- Explante de *D. aurantiacus*, explante de PLB's con coloracion beige claro (0.8x).

Del día cinco hasta el 50 la proliferación de PLB's en los explantes se detuvo, después del día 50 se empezaron a formar nuevos PLB's (Figura 20), este proceso se llevó a cabo en la región central y superior del explante que no está en contacto con el medio de cultivo. A partir del día 70 los nuevos PLB's presentaban una coloración blanco-amarillenta y forma ovalada. Los primeros PLB's formados después del día 50 presentaron un rápido aumento de volumen, elongación y segmentación, llegando a germinar dos PLB's en este periodo; dichas características se registraron a los 75 días. En esta fecha se observó el desarrollo de PLB's provenientes de otros formados en días anteriores, localizándose en la parte media y basal, algunos en los segmentos de los PLB's más desarrollados (Figura 21). Hasta los 120 días de registro, los dos PLB's germinados llegaron a formar de una a dos hojas de color verde claro y con una longitud máxima de 3 cm (Figura 22).



Figura 20.- Formación de un PLB de *D. aurantiacus*, se difrencia de los oxidados por la coloración beige hialina (5x).



Figura 21.- PLB desarrollado y segmentado de *D. aurantiacus*, se observa la formación de nuevos PLB's en la base de cada segmento (1.6x).



Figura 22.- PLB de *D. aurantiacus* germinado y con presencia de hojas, se observan también los segmentos y a partir de ellos la formación de nuevos PLB's (1x).

La oxidación de los PLB's se presentó después del primer subcultivo, al no poder ser cuantificada se estimó y designando los valores de acuerdo a la intensidad en la coloración de los explantes, usando los valores de oxidación ligera, media y drástica. Los PLB's de *D. cinnabarinus* mostraron oxidación media y drástica; mientras que *D. aurantiacus* la oxidación de PLB's fue ligera, esta información había sido reportada con anterioridad por Suárez (2010).

El inicio de proliferación ocurrió en el día 60 para *D. cinnabarinus* y 50 días en *D. aurantiacus*. Una vez iniciado este proceso de proliferación, los PLB's generados aumentaban su volumen y longitud en un periodo de 20 días, transcurrido este tiempo a partir de PLB's formados se regenerarón, contabilizando entre 20 a 40 nuevos PLB's a lo largo de los explantes, presentándose en la región media y basal de los primeros PLB's.

La formación de un gran número de brotes apicales también presentó una mayor producción de raíces adventicias en *D. cinnabarinus*, los primeros PLB's generados aumentaban de tamaño y maduraban sin llegar a la germinación, a partir de éstos y algunos oxidados, la proliferación se originaba en la región apical como se muestra en la Figura 23, los PLB's formados en la región apical terminaron su desarrollo en protocormos diferenciados, entre cinco y ocho PLB's iniciaban su germinación o proceso de proliferación, coincidiendo con lo reportado por diversos autores en el ciclo A de la Figura 6.

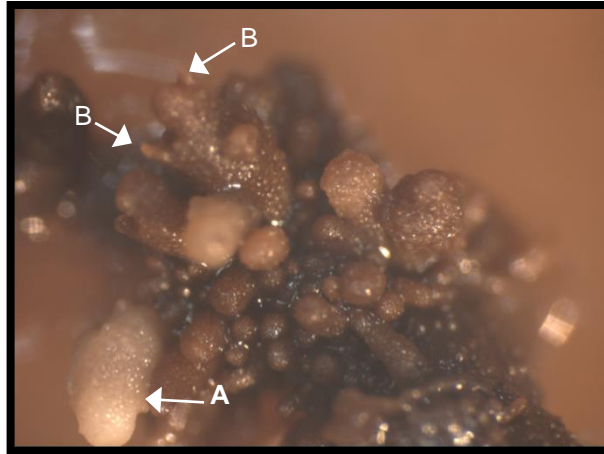


Figura 23.- Formación de nuevos PLB's color beige claro a partir de células oxidadas (A) y PLB's oxidados en distintas etapas de desarrollo en la especie *D. cinnabarinus* (aumento 5x).

La formación de protocormos secundarios a partir de un protocormo simple en *D. aurantiacus* se presentó en la región apical de los PLB's recién formados y oxidados. En esta especie, los PLB's recién formados no habían obtenido un tamaño considerable cuando se activó la proliferación en su región apical, de igual manera dicho proceso se inició en los PLB's oxidados. Durante el proceso se desarrollaron rizoides a lo largo de los PLB's, estando ausentes en regiones cercanas al ápice, los rizoides no frenaron la formación de nuevos PLB's (Figura 24). La presencia simultánea de rizoides y PLB's en la misma región no se presentó en *D. cinnabarinus*; en dicha especie únicamente se desarrollaron PLB's, los cuales posteriormente germinaron, formando raíces y más PLB's, mismo proceso que es reportado y sigue el desarrollo de la Figura 6 en el ciclo B.

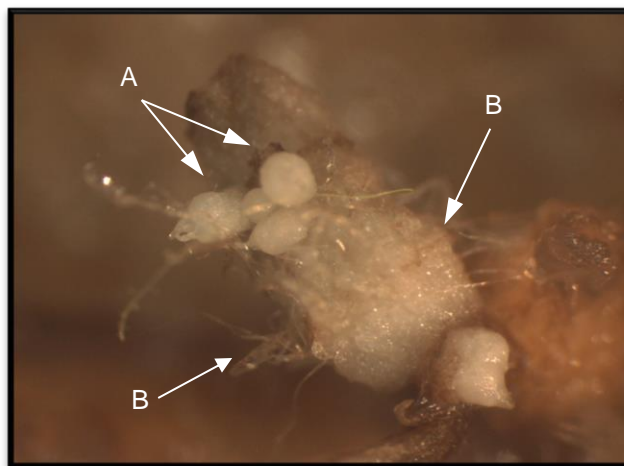


Figura 24.- Proliferación de PLB's en la región apical a partir de PLB's ya generados (A) y desarrollo de rizoides en el PLB inicial (B) en *D. aurantiacus* (aumento 2.0x).

De acuerdo con Teixeira da Silva y Tanaka (2006) mencionan que los PLB's primarios pueden formar segundos PLB's en lo que ellos denominan ruta de PLB, estos segundos PLB's pueden ser usados como PLB's primarios si se dejan en el mismo medio indefinidamente, esto es así debido a que la disponibilidad de nutrientes y sustancias promotoras de crecimiento se localizan en este sitio de regeneración y debido a la eliminación del control de otros tejidos (Teixeira da Silva *et al.*, 2005), todo el proceso antes descrito se presentó a lo largo de los protocolos en *D. cinnabarnus* y *D. aurantiacus* una vez que la proliferación se reactivó, como mencionan los autores citados, los explantes fueron mantenidos en medio de cultivo que no presentaba variaciones en su composición, sin embargo, al realizar los diversos tratamiento uno o algunos de los compuestos orgánicos presentes en el medio mantenía estable este proceso de proliferación en los PLB's.

6.2 Protocolo 1 (Compuestos orgánicos)

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos en los diversos tratamientos con la presencia de compuestos orgánicos para las especies *D. cinnabarinus* y *D. aurantiacus* después de 120 días de tratamiento (4 meses).

Tabla 4. Efectos en la respuesta de crecimiento y proliferación por la presencia de compuestos orgánicos en el medio de cultivo

Días / Tratamiento	<i>D. cinnabarinus</i>					<i>D. aurantiacus</i>				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1.- MS modificado	Ox	Ox	P	P, G	P	Ox	Ox, P	P, G	P, G	P, G
2.- MS + Caseína hidrolizada	Ox	Ox	P	P	--	Ox	Ox	--	--	--
3.- MS + Extracto de plátano	Ox	Ox	P	P, G	P	Ox	Ox	P	P, G	P, G
4.- MS 50% (macro y micronutrientes)	So	So, P, G	P, G	P, G	P, G	So	So, P	P	P, G	P, G

Ox: Oxidación, **So:** sin oxidación, **P:** proliferación de PLB's, **G:** germinación, (--) : sin respuesta

6.2.1 *Dichromanthus cinnabarinus*

En los primeros cinco días posteriores al cultivo, los explantes presentaron oxidación de manera drástica en los tratamientos MS modificado, MS+Caseína hidrolizada y MS+Extracto de plátano), cambiando de color blanco a marrón oscuro, excepto los explantes del tratamiento MS 50%, éstos también presentaron oxidación, la cual no pareció ser de manera drástica, la coloración cambio de blanco a café claro. Los resultados obtenidos por tratamiento se muestran a continuación.

6.2.1.1 Medio MS modificado (Caseína hidrolizada + Extracto de plátano)

En los primeros cinco días posteriores al cultivo los explantes presentaron oxidación, cambiando de color beige claro a marrón oscuro. La proliferación de PLB's se reactivó cerca de los 55 días de iniciado el tratamiento y de manera simultánea, identificada por la aparición de puntos blancos en distintas regiones de los explantes oxidados, antes de este periodo no se presentó respuesta alguna, los datos se muestran en la tabla 5. En este mismo intervalo de tiempo se registró la germinación de PLB's.

Tabla 5. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's de *D. cinnabarinus* en MS + Caseína hidrolizada + Extracto de plátano

Días Explan- te	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	0	16	36	41	0	0	0	2	0
2	0	0	4	15	33	0	0	1	0	1
3	0	0	9	17	40	0	0	0	0	1
4	0	0	6	16	41	0	0	0	0	1
5	0	0	8	20	38	0	0	0	1	0
6	0	0	11	22	35	0	0	2	0	0
7	0	0	7	19	43	0	0	1	0	1
8	0	0	8	14	50	0	0	0	2	2
9	0	0	9	18	37	0	0	0	2	4
10	0	0	5	27	35	0	0	0	0	1
Total acumulado	0	0	83	204	393	0	0	4	7	11

6.2.1.2 Medio MS + Caseína hidrolizada

Presentaron oxidación en los primeros cinco días de subcultivo cambiando de color beige claro a marrón oscuro. Se presentó la proliferación de PLB's a los 59 días de iniciado el tratamiento, dicho proceso únicamente se presentó en cuatro explantes y la proliferación no fue constante en ellos, los demás explantes no presentaron proliferación en el tratamiento. La germinación estuvo ausente en todos los explantes, los datos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's de *D. cinnabarinus* en MS + Caseína hidrolizada

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	4	19	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	3	7	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Total acumulado	0	0	15	26	0	0	0	0	0	0

6.2.1.3 Medio MS + Extracto de plátano

De la misma manera que los tratamientos anteriores los explantes presentaron oxidación de manera considerable una vez subcultivados cambiando su coloración de color beige claro a marrón oscuro. La proliferación de PLB's se presentó en el día 60, algunos explantes presentaron el proceso mencionado el día 86 (explante 5, 7 y 9). El proceso de germinación fue muy bajo, solo generó un PLB por explante, la excepción fue el número seis único con 2 PLB's germinados durante la duración del tratamiento. Cabe resaltar que el explante cuatro no presentó proliferación y germinación durante todo el tratamiento. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's de *D. cinnabarinus* en MS + Extracto de plátano

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	0	15	29	71	0	0	0	0	1
2	0	0	3	10	56	0	0	0	0	1
3	0	0	6	17	49	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	2	19	0	0	0	0	1
6	0	0	7	21	65	0	0	0	0	2
7	0	0	0	10	46	0	0	0	0	1
8	0	0	9	28	80	0	0	0	0	1
9	0	0	0	15	36	0	0	0	0	1
10	0	0	13	23	51	0	0	0	0	1
Total acumulado	0	0	53	155	437	0	0	0	1	9

6.2.1.4 Medio MS 50% (macro y micro nutrientes)

Se observó que los explantes presentaron una ligera oxidación, no tan drástica como ocurría en los otros cultivos de la misma especie, el cambio de color fue de blanco a un beige claro. La proliferación de PLB's se reactivó a los 30 días posteriores al subcultivo, en el mismo periodo de tiempo la mayoría de los explantes presentó germinación de PLB's, ambos procesos se mantuvieron durante la duración del tratamiento. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's de *D. cinnabarinus* en MS 50%

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	6	18	51	62	0	2	1	5	4
2	0	10	14	46	58	0	6	1	4	8
3	0	9	13	44	57	0	1	2	6	6
4	0	4	16	29	50	0	0	4	4	9
5	0	5	15	47	59	0	2	1	5	11
6	0	7	21	56	40	0	1	2	8	4
7	0	6	19	42	73	0	1	3	3	6
8	0	8	35	36	65	0	0	4	4	5
9	0	10	22	59	61	0	2	2	6	8
10	0	12	34	41	84	0	1	3	5	3
Total acumulado	0	77	207	451	609	0	16	23	50	64

Se graficó el número total de PLB's proliferados y generados en la especie *D. cinnabarinus*. Los resultados se muestran en las figuras 25 y 26.

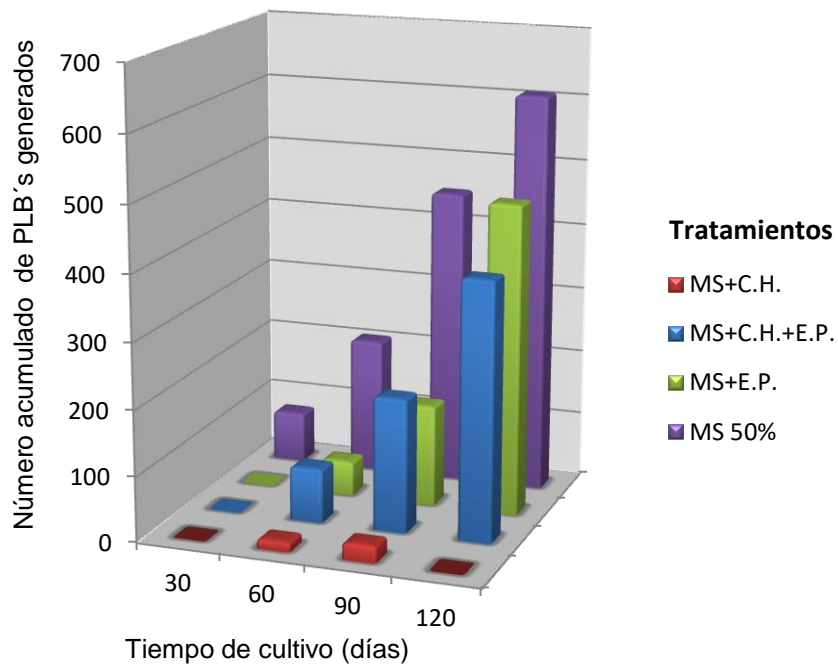


Figura 25.- Número de PLB's en *D. cinnabarinus*

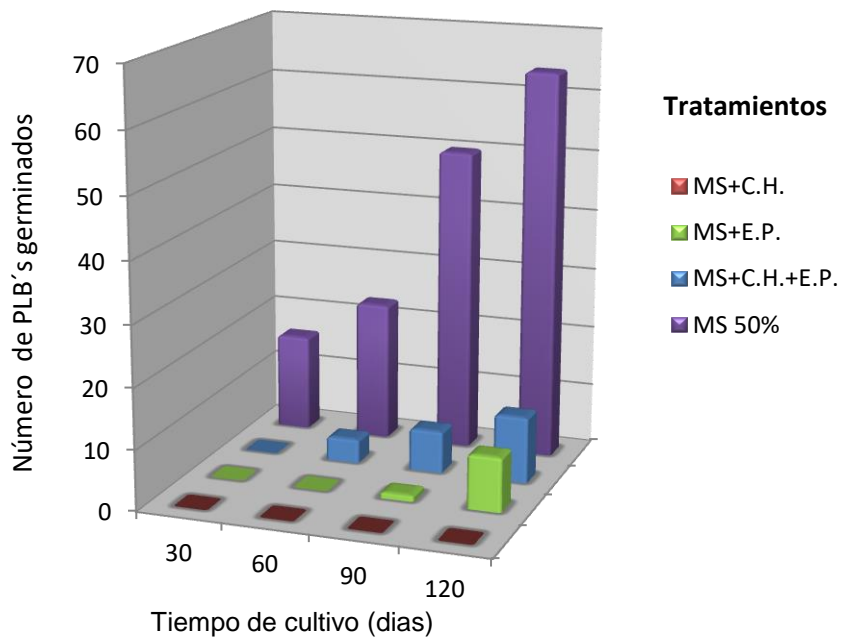


Fig. 26.- Número de germinación de PLB's en *D. cinnabarinus*

6.2.2 *Dichromanthus aurantiacus*

6.2.2.1 Medio MS modificado (Caseína hidrolizada + Extracto de plátano)

Los explantes presentaron oxidación muy ligera, su color cambió de blanco a beige, en dos explantes la proliferación de PLB's se reinició a los 30 días, los restantes cerca del día 60. Con respecto a la germinación de PLB's, cinco explantes presentaron dicho proceso en los primeros 30 días, sin embargo hasta el día 90 todos los explantes presentaban germinación de PLB's, antes de este periodo no todos los explantes tenían PLB's germinados, los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's de *D. aurantiacus* en MS + Caseína hidrolizada + Extracto de plátano

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	0	12	28	90	0	0	3	1	2
2	0	0	19	40	110	0	0	0	2	1
3	0	0	15	36	106	0	0	0	3	4
4	0	2	21	17	89	0	5	5	4	2
5	0	0	17	32	93	0	0	0	4	3
6	0	0	8	26	100	0	4	4	3	2
7	0	0	10	30	91	0	1	1	3	19
8	0	1	20	44	70	0	3	3	1	3
9	0	0	18	33	98	0	1	1	1	4
10	0	0	18	39	108	0	0	0	1	2
Total acumulado	0	3	158	325	955	0	14	17	23	42

6.2.2.2 Medio MS + Caseína hidrolizada

La oxidación estuvo presente en todos los explantes, el proceso de proliferación de PLB's inició en dos explantes cerca del día 60, en el día 90, sólo seis explantes presentaron proliferación de PLB's, en el día 120 únicamente dos explantes seguían con la proliferación, siendo muy irregular en los días posteriores, cabe resaltar que cuatro explantes no presentaron proliferación durante la duración del protocolo. La germinación de PLB's fue bastante baja, solo tres PLB's germinaron en distintos explantes, presentándose a los 90 días y 120 respectivamente, los explantes restantes no tuvieron germinación de PLB's ya que éste proceso está relacionado de manera directa con la proliferación, como se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's de *D. aurantiacus* en MS + Caseína hidrolizada

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	3	11	0	0	0	0	2	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	5	9	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0
Total acumulado	0	0	4	33	12	0	0	0	2	1

6.2.2.3 Medio MS + Extracto de plátano

La oxidación se presentó en los primeros días de cultivo y fue muy ligera, cambió de color blanco a beige claro. La proliferación y germinación de PLB's se presentó cerca al día 60 de manera muy abundante en comparación con los demás tratamientos, en los días 90 o 120 el número de PLB's aumentó de manera exponencial, los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's de *D. aurantiacus* en MS + Extracto de plátano

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	0	22	88	231	0	0	6	9	27
2	0	0	36	91	195	0	0	3	10	32
3	0	0	27	86	173	0	0	4	26	20
4	0	0	40	96	186	0	0	9	20	19
5	0	0	51	93	218	0	0	2	15	33
6	0	0	46	82	201	0	0	1	24	28
7	0	0	38	99	166	0	0	5	31	40
8	0	0	47	111	227	0	0	4	29	15
9	0	0	58	84	182	0	0	3	27	37
10	0	0	56	98	227	0	0	5	25	36
Total acumulado	0	0	421	928	2006	0	0	42	216	287

6.2.2.4 Medio MS 50% (macro y micro nutrientes)

Con este tratamiento los explantes no presentaron oxidación a lo largo de la duración del tratamiento, su color blanco se mantuvo sin cambio aparente. La proliferación de PLB's inició en tres explantes cerca del día 30, el resto de los explantes iniciaron la proliferación en el día 60. El proceso de germinación de PLB's inició cerca el día 60 en algunos explantes, cabe resaltar que dicho proceso en fechas posteriores fue muy irregular, ya que algunos explantes podían o no presentar germinación a lo largo del tratamiento como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's en *D. aurantiacus* en MS 50%

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	5	8	14	50	0	0	2	0	4
2	0	0	9	11	33	0	0	0	3	1
3	0	0	17	16	30	0	0	1	0	3
4	0	0	8	13	41	0	0	0	2	3
5	0	0	4	10	47	0	0	4	0	0
6	0	3	7	17	42	0	0	0	8	0
7	0	1	10	16	61	0	0	2	6	9
8	0	0	6	28	29	0	0	1	1	0
9	0	0	12	17	36	0	0	0	0	4
10	0	0	15	13	28	0	0	4	0	2
Total acumulado	0	9	96	155	397	0	0	14	20	26

Al igual que los datos obtenidos con la especie anterior, se graficaron los resultados de *D. aurantiacus*, los datos se presentan en las figuras 27 y 28 respectivamente.

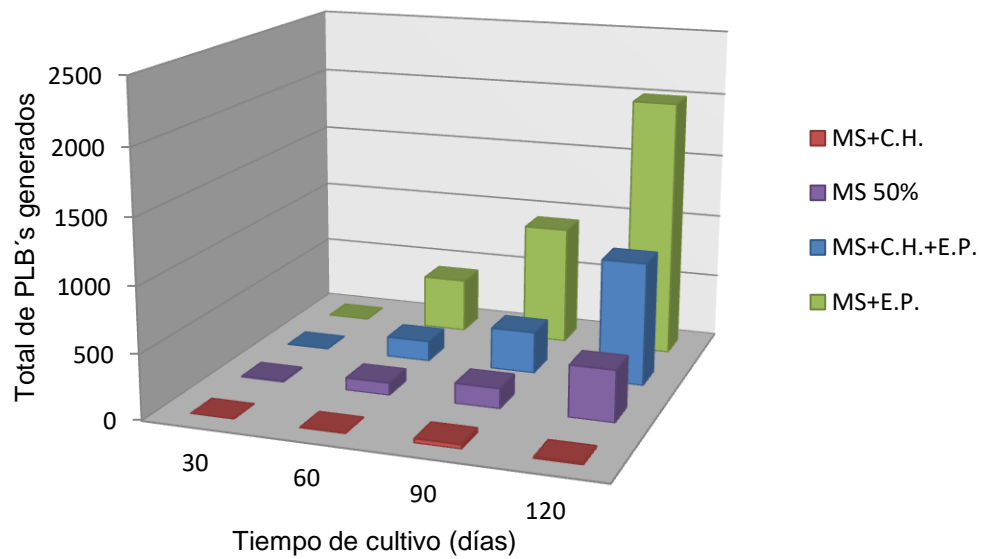


Figura 27.- Grafica de proliferación de PLB's en *D. aurantiacus*

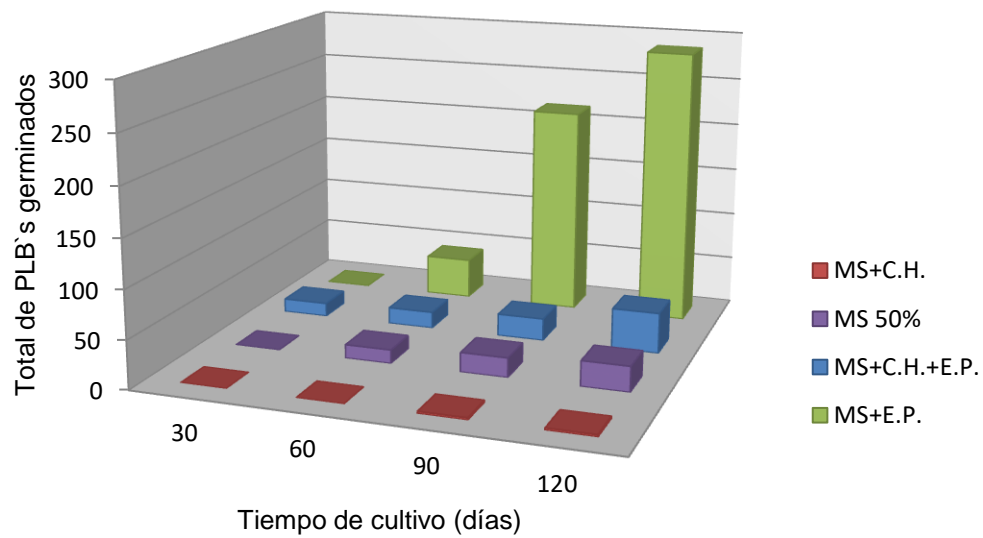


Figura 28.- Germinación de PLB's en *D. aurantiacus*

6.3 Protocolo 2 (Compuestos adsorbentes)

Los resultados obtenidos de los tratamientos con Carbón activado y PVP en sus respectivas concentraciones, fueron los siguientes, buscando mitigar la oxidación de los explantes con PLB's.

6.3.1 Carbón activado 1 g/L

La oxidación se presentó desde los primeros días de cultivo, cambiando la coloración de los explantes de beige claro a marrón oscuro. El proceso de proliferación se reactivó cercano a los 30 días, manteniendo dicho proceso durante los 120 días que duró el protocolo. En este tratamiento no se presentó germinación de PLB's durante el tratamiento. El número de PLB's proliferados se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's en *D. cinnabarinus* con Carbón activado 1 g/L

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	6	10	11	16	0	0	0	0	0
2	0	4	7	13	19	0	0	0	0	0
3	0	3	9	9	14	0	0	0	0	0
Total acumulado	0	13	26	33	49	0	0	0	0	0

6.3.2 Carbón activado 2 g/L

La oxidación al igual que en tratamiento anterior, se presentó desde los primeros días de cultivo, cambiando la coloración de los explantes de beige a marrón oscuro, se reactivó la proliferación de PLB's cercano al día 30 de cultivo, la proliferación se mantuvo el tratamiento, ningún PLB's germinó durante este periodo. El número de PLB's proliferados se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's en *D. cinnabarinus* en Carbón activado 2 g/L

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	4	7	11	16	0	0	0	0	0
2	0	8	6	9	10	0	0	0	0	0
3	0	1	9	14	13	0	0	0	0	0
Total acumulado	0	13	22	34	39	0	0	0	0	0

6.3.3 Polyvinyl-pirrolidona (PVP) 1 g/L

La oxidación se presentó únicamente en dos explantes, cambiando su coloración de beige a marrón oscuro, en el tercer explante no se presentó oxidación, en él se mantuvo su coloración beige. En todos los explantese el proceso proliferativo se reactivó cercano a los 30 días de cultivo, manteniéndose a lo largo de todo el tratamiento; la germinación no se presentó. El número de PLB's generados se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's en *D. cinnabarinus* en PVP 1 g/L

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	3	7	6	9	0	0	0	0	0
2	0	4	5	11	3	0	0	0	0	0
3	0	2	9	8	12	0	0	0	0	0
Total acumulado	0	9	21	25	24	0	0	0	0	0

6.3.4 Polyvinyl-pirrolidona (PVP) 2 g/L

La oxidación se presentó en todos los explantes desde los primeros días de cultivo, cambiando la coloración de beige a marrón oscuro. En este tratamiento cerca del día 60 los cultivos iniciaron el proceso proliferativo y la germinación también se mantuvo ausente. El número de PLB's generados se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's en *D. cinnabarinus* en PVP 2 g/L

Días Explante	PLB's Generados					PLB's Germinados				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
1	0	0	7	5	9	0	0	0	0	0
2	0	0	5	11	7	0	0	0	0	0
3	0	0	3	9	16	0	0	0	0	0
Total acumulado	0	0	15	25	32	0	0	0	0	0

7 DISCUSIÓN

Los explantes de raíz de ambas especies de *Dichromanthus* en condiciones *in vitro*, generaron cuerpos parecidos a protocormos (PLB's), dicha respuesta en orquídeas terrestres no ha sido reportada en la literatura, por lo cual representa una nueva e importante fuente de conocimientos en especies terrestres y específicamente de *Dichromanthus cinabarinus* y *Dichromanthus aurantiacus*.

7.1 Cultivo de PLB's donados en medio MS modificado

De acuerdo con la literatura, un problema usual en la micropropagación de orquídeas con PLB's obtenidos de plantas maduras es la liberación de exudados en el medio. Las células de orquídeas en cultivo de tejidos liberan una gran cantidad de fenoles que pueden ser tóxicos para las células cuando se oxidan (Chugh *et al.*, 2009; Lim-Ho, 1981), de esta manera los PLB's al ser cultivados en nuevo medio presentan oxidación, que puede ser debido a varios factores ambientales o biológicos como la hiperoxia, luz, desecación, alta salinidad, frío, iones metálicos, xenobioticos, contaminación, toxinas, reoxigenación después de anoxia, manipulación experimental y patógenos infecciosos (Bartosz, 1997). También Low y Merida (1996) han reportado que los cambios en el nivel osmótico en el medio de cultivo generan estrés oxidativo. Hay que destacar que de acuerdo a la literatura el medio de cultivo elaborado con Extracto de plátano presenta liberación de fenoles, ya que durante el proceso de maceración, ajuste de pH y esterilización se rompen células y se liberan fenoles causando oxidación, presentando una coloración marrón. Se decidió seguir usando el Extracto de plátano ya que debían mantenerse las características del medio de cultivo y posiblemente fuese una fuente de hormonas que induzcan la formación de PLB's en los explantes. Estos fenoles son almacenados en el medio de cultivo al solidificarse, probablemente sean un factor en el grado de oxidación de los PLB's en ambas especies.

Estas dos especies se ven afectadas por la oxidación de sus PLB's, *D. aurantiacus* tiene una mayor resistencia al estrés causado por la liberación de fenoles y la manipulación mecánica, esto se observa por la consistencia rígida, compacta y poca disgregación de PLB's, así como un ligero cambio de color a beige claro, el proceso de adaptación a un nuevo nivel osmótico repercute de manera directa en los procesos regenerativos, por ello, el tiempo en que los procesos de proliferación y germinación se reactivaron fue de 50 días de cultivo; en cambio la especie *D. cinnabarinus* se ve drásticamente afectada por liberación de fenoles en su tejidos y los presentes en medio de cultivo, causando oxidación, necrosis por manipulación y un nivel osmótico diferente, presentando los PLB's una colocación marrón oscura en la mayor parte del explante, una consistencia ligeramente flácida y fácil disgregación de los PLB's.

7.2 Protocolo 1 (Compuestos orgánicos)

El comportamiento de *D. cinnabarinus* y *D. aurantiacus* permitió el desarrollo de nuevos PLB's y su germinación.

El tratamiento MS modificado (MS+C.H.+E.P.) representó el tratamiento control y a partir de él se realizó la comparación, al no verse afectadas las características del medio los procesos de oxidación, proliferación y germinación de PLB's. El resto de los tratamientos, tuvieron respuestas muy diversas, esto es debido a la composición del medio de cultivo, permitiendo identificar el efecto de cada uno de los compuestos orgánicos adicionados al medio de cultivo en los procesos de proliferación y germinación de los PLB's.

El uso de complejos orgánicos como endospermo de coco, Extracto de plátano o jugo de tomate libre de semillas es utilizado en diversos medios de cultivo (Chen *et al.*, 1999). Los complejos orgánicos se han utilizado como precursores de la respuesta embriogénica y desarrollo de raíz, dichas estructuras han sido reportados por Ishii *et al.* (1998) utilizando endospermos de coco líquido y Seeni y Latha (2000) utilizando pulpa de plátano y Caseína hidrolizada; permitiendo que los cultivos tengan la capacidad para inducir diversas respuestas morfogenéticas.

La Caseína hidrolizada adicionada al medio en los tratamientos MS modificado y MS+ Caseína hidrolizada, causó diversos efectos en los explantes cultiados en ambos tratamientos y entre ambas especies de *Dichromanthus*. Específicamente en el tratamiento MS+C.H., como único compuesto orgánico adicionado al medio fue la Caseína hidrolizada, la respuesta que tuvieron ambas especies de *Dichromanthus* fue una baja cantidad en la formación de PLB's después de 120 días, *D. cinnabarinus* generó 31 PLB's (Tabla 6) y *D. aurantiacus* 49 PLB's (Tabla 10).

Ambas cantidades fueron comparadas con las obtenidas en el tratamiento 1 (MS+C.H.+ E.P.); *D. cinabarinus* 680 PLB's (Tabla 5) y *D. aurantiacus* 1441 PLB's (Tabla 9), Withner (1974) reportó el efecto positivo que tienen los compuestos orgánicos como la Caseína hidrolizada y peptona para inducir la formación de brotes y PLB's. La respuesta en la formación y proliferación de PLB's para *D. cinnabarinus* y *D. aurantiacus* usando únicamente Caseína hidrolizada como compuesto orgánico no mostró los resultados reportados (Figura 29 y 30).



Figura 29.- PLB's de *D.aurantiacus* oxidados y sin respuesta de proliferación y germinación. Después de 120 días cultivados en medio MS+C.H.



Figura 30.- PLB's de *D.cinnabarinus*, presentando proliferación de nuevos PLB's (color beige claro) y sin germinación, cultivados 120 días en medio MS+C.H.

Cuando se adicionó Caseína hidrolizada como único compuesto orgánico aumentó el nivel de nitrógeno en el medio de cultivo, inhibiendo la proliferación y germinación de PLB's en diversos niveles como lo reportó Stewart y Kane (2006), demostraron que una fuente orgánica de nitrógeno como peptona, Caseína hidrolizada u otros compuestos orgánicos en altas concentraciones, influye en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), además que ciertos niveles de nitrógeno inorgánico pueden limitar la germinación, posiblemente debido a la baja actividad de la enzima nitrato reductasa durante la germinación de semillas y el temprano desarrollo de protocormos en diversas especies (Malmgren, 1992), por ello la respuesta obtenida fue una alta inhibición en la germinación y proliferación de PLB's en *D. aurantiacus*, generando 49 y germinando 4 PLB's a lo largo del tratamiento, para *D. cinnabarinus* proliferaron 41 PLB's y no se presentó germinación durante el tratamiento. Siendo el tratamiento con muy baja respuesta morfogénica, no se recomienda esta concentración para proliferar o germinar embriones de estas especies. Sin embargo se ha reportado que al reducir la concentración de nitrógeno en el medio MS se logró un incremento en la velocidad para la formación de brotes en *Cymbidium kanran* (Shimasaki y Uemoto, 1990), *C. ensifolium* (Ogura y Okubo, 2003), y *C. sinense* (Huang y Okubo, 2005), además la Caseína hidrolizada se ha utilizado junto con otros compuestos orgánicos para iniciar cultivos de hojas y bases de hojas en *Vanda coerulea* adicionando al medio 500mg/l de peptona y 10% de agua de coco además de NAA y BA en diversas concentraciones para generar PLB's (Seeni y Latha, 2000), Liu *et al* (2006) adicionó al medio peptona 1g/l y 150 ml de agua de coco para identificar en un comparativo el medio de cultivo ideal que aumentara la proliferación de PLB's en *Phalaenopsis* y *Doritaenopsis* sin la presencia de otros reguladores de crecimiento, generando como respuesta la formación de PLB's en un medio no saturado de nitrógeno.

El tratamiento de MS+E.P. *D. aurantiacus* presentó la mayor de germinación y proliferación (Figura 31), para *D. cinnabarinus* la germinación y proliferación fue menor que el medio de cultivo control (Figura 32); el Extracto de plátano fue el único compuesto orgánico adicionado al medio de cultivo; Withner (1974) y Arditti (1993) publicaron que el Extracto de plátano es una rica fuente natural de citocininas, las cuales promueven en ciertas etapas de los cultivos la diferenciación y crecimiento de brotes, una de ellas, la kinetina se conoce por tener diversas respuestas morfogenéticas en procesos asociados a la propagación de orquídeas (Martin, 2003); en orquídeas, diversas concentraciones de citocininas son un buen inductor de cuerpos parecidos a protocormos PLB's (Murthy y Pyati, 2001; Lee y Lee, 2003), siendo un indicativo que a partir del uso de Extracto de plátano en el medio y sus ricos niveles de citocininas permitieron que los explantes de raíz se llevara a cabo la proliferación y germinación de PLB's en *D. cinnabarinus* y *D.aurantiacus* utilizados posteriormente en este trabajo.



Figura 31.- Proliferación y germinación de PLB's, así como desarrollo de plántulas de *D. aurantiacus*, después de 120 días de cultivo en medio MS+E.P.



Figura 32.- Baja respuesta en la proliferación y germinación de PLB's de *D. cinnabarinus*, respuesta después de 120 de cultivo en medio MS+E.P.

D. cinnabarinus inició la proliferación cerca de los 60 días de cultivo, igual que el grupo control (MS+ C.H.+ E.P.), mientras que en *D. aurantiacus* inició en el día 30, es de resaltar que la mayoría de los protocolos para la inducción de PLB's en diversas especies de orquídeas utilizan principalmente explantes de hojas (Chen *et al.* 1999; Chen y Chang, 2001), y otros tejidos como raíz y tallos (Chen y Chang, 2000), algunos reportan su formación a partir de rizomas en especies de *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* (Chang y Chang, 1998) y en *Phalaenopsis* (Ishii *et al.*, 1998), todas ellas especies epífitas, en orquídeas terrestres no se cuenta con información acerca de la formación de PLB's en raíces utilizando compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo. Algunos compuestos sintéticos como el Tidiazuron (TDZ), han sido ampliamente usados en diversas especies de orquídeas para inducir la embriogénesis somática de *Oncidium* (Chen *et al.*, 1999; Chen y Chang, 2001), la regeneración de brotes en *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* y *Cymbidium* epífitos (Ernst, 1994; Chen y Piluek, 1995; Nayak *et al.*, 1997) y fue efectivo en la inducción y formación de PLB's a partir de entrenudos del tallo de las flores de *Epidendrum radicans* (Chen, *et al.*, 2002). Chen *et al* (1999) menciona que en concentraciones bajas de TDZ (0.3 y 1 mg/L) se forman embriones somáticos en *Oncidium*, otros compuestos con acción hormonal para la formación de PLB's ha sido reportado por Murthy y Pyati (2001) usando de BA (2 mg/l) y KN (1 mg/L) obtenían el 90.2% y 90% respectivamente en regeneración de PLB's a partir de explantes de hoja de *Aerides maculosum* (Orchidaceae), de acuerdo con la literatura, los niveles de citocininas naturales contenidas en el Extracto de plátano utilizado se encuentran en

un rango adecuado para la inducción y formación de PLB's en estas especies del género de *Dichromanthus*, se desconoce la concentración específica de citocininas presentes en dicho extracto, por lo cual se tienen diversas respuestas en el número de PLB's durante la proliferación de ambas especies, quizá la respuesta obtenida en inducción y formación de PLB's pudo ser mayor o menor si se hubiesen utilizados diversas proporciones de Extracto de plátano en el medio de cultivo.

La concentración de Extracto de plátano utilizada fue del 10% P/v , ésta concentración mantuvo la proliferación de PLB's en los tratamientos probados, además que presentó inducción, proliferación y germinación de PLB's por primera vez en explantes de raíz de *D. cinnabarinus* y *D. aurantiacus*; Seenii y Latha (2000) recomiendan la suplementación del medio de cultivo con 3.5% de Extracto de plátano, lo cual es benéfico para la multiplicación de PLB's y para una temprana diferenciación de los brotes; Murthy y Pyati (2001) probaron el uso de endospermo de coco en concentraciones de 10 y 15% v/v para regenerar PLB's con un porcentaje del 36 al 38% en un periodo de 12 semanas en explantes de hoja de *A. maculosum*. Las respuesta en el número de PLB's generados en *D. cinnabarinus* no difirió mucho de los obtenidos en el tratamiento de MS+C.H.+E.P., en el cual fueron 680 y en este tratamiento se obtuvieron 681. En *D. aurantiacus* el comportamiento fue diferente entre el tratamiento MS modificado y MS+ E.P., en el tratamiento MS modificado cerca del día 30 de cultivo se reactivó la proliferación y germinación de PLB's, lo cual no ocurre en el tratamiento MS+E.P., reactivando los procesos antes mencionados cercanos al día 60 de cultivo, sin embargo en este tratamiento (MS+E.P.), existió un aumento considerable de proliferación de PLB's, que fue de 3355 PLB's generados y 545 PLB's germinados, ambos valores corresponden al total acumulado. En contra parte se generaron 1441 PLB's y germinaron 99 en el tratamiento MS+ C.H.+E.P. Estas respuestas se deben a que el 10% P/v de Extracto de plátano fue la concentración con la mejor respuesta de las diferentes concentraciones que se probaron, quizá concentraciones mayores a 10% P/v de Extracto de plátano puedan mostrar mayor respuesta proliferativa o la respuesta se mantenga, no se probó una concentración mayor al 10% P/v , la concentración 10% P/v funcionó para inducir una mayor proliferación de PLB's en *D. cinnabarinus* sin la presencia de Caseína hidrolizada en el medio; para *D. aurantiacus* ésta concentración de Extracto de plátano y la presencia o ausencia de la Caseína hidrolizada no representaron un factor de importancia en el número de PLB's generados, posiblemente otra concentración de Extracto de plátano tenga un efecto positivo en la proliferación de PLB's y/o germinación de embriones generados para esta especie.

En el tratamiento MS 50% las respuestas entre ambas especies siguieron divergiendo, para *D. cinnabarinus* éste tratamiento mitigó los altos niveles de oxidación, manteniendo la coloración beige-blanco durante toda la duración del tratamiento (Figura 33), también fue mayor la proliferación y germinación de PLB's comparado con los tratamientos anteriores para esta especie, obteniendo un proliferación total de 1344 PLB's y germinación de 153 PLB's durante la duración

del tratamiento, ambos valores corresponden al total acumulado; es importante resaltar que además de mitigar la oxidación el periodo en que se reactivaron los procesos de proliferación y germinación en *D. cinnabarinus* ocurrió antes del día 30, lo cual no sucede en los otros tratamientos, en los que se inició cerca de los 60 días.



Figura 33.-Mitigación de la oxidación, proliferación y germinación de PLB's de *D. cinnabarinus*, después de 120 días de cultivo en medio MS 50%



Figura. 34.- Respuesta en la proliferación y germinación de PLB's, en algunos casos formación de plántulas de *D. aurantiacus*, después de 120 días de cultivo en medio MS 50%, en comparación con el medio MS+E.P., éste tratamiento presenta una menor respuesta.

En *D. aurantiacus* la oxidación se presentaba en niveles muy bajos, apenas cambiando a un color ligeramente más oscuro, en éste tratamiento (MS 50%) la ligera oxidación también fue mitigada, en cambio la proliferación y germinación tuvieron niveles muy inferiores a los tratamientos que les fueron adicionados compuestos orgánicos (Figura 34), específicamente medio MS+E.P.; se

obtuvieron un total de 657 PLB's nuevos y 60 PLB's germinados; en éste tratamiento la proliferación inició cerca del día 30, al igual que en el tratamiento 1 para esta especie, en cambio la germinación inició cercana al día 60.

En este tratamiento no se usaron compuestos orgánicos, las respuestas esperadas eran un menor número de PLB's proliferados y germinados, debido a las características antes mencionadas de los compuestos orgánicos, ya que Arditti *et al.* (1993) recomiendan el uso de medios de cultivo sin la adición de complejos orgánicos y RCV para iniciar el establecimiento de los cultivos, Valmayot (1986) la adición extra de estos compuestos después de dos meses para promover la formación y multiplicación de PLB's en cultivos ya establecidos de *Vanda*, Seeni y Latha (2000) después de un cultivo inicial de 12 semanas sin adición de complejos orgánicos adicionar Extracto de plátano para la multiplicación de PLB's y la diferenciación de brotes, todos ellos buscan con un medio de cultivo basal establecer los cultivos que posteriormente serán tratados y que durante este periodo de establecimiento no se presenten respuestas morfogénicas que afecte posteriormente los tratamientos. En nuestro caso al provenir de cultivos inducidos por compuestos orgánicos se esperaba que la respuesta en cada especie fuera menor.

En *D. cinnabarinus* ésta ausencia de compuestos orgánicos en el medio le permitió tener una mayor proliferación y germinación, esto es sustentado por Lee y Lee (2003) reportando que diversas concentraciones de Extracto de plátano utilizadas en plántulas de *Cypripedium formosanum* presentaron efectos inhibitorios en la sobrevivencia de PLB's; Ichihashi e Islam (1999) también reportaron estos efectos en el crecimiento de callo en *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis*, y *Neofinetia*, lo cual sugiere que en *D. cinnabarinus* el uso de Extracto de plátano 10% v/v durante un periodo de tiempo cercano a 30 días a partir del cultivo es ideal para inducir las respuestas de proliferación y germinación de PLB's.

Para *D. aurantiacus* en el medio MS, la ausencia del Extracto de plátano representa una disminución sustancial en la respuesta de proliferación y germinación, sin llegar a suprimirse, se generaron 657 PLB's y germinaron 60 PLB's durante el periodo de tratamiento. Las concentraciones de citocininas, azúcares, aminoácidos y vitaminas en este tipo de compuestos son muy variables y hasta cierto punto desconocidas, que son factores para mantener estos procesos de manera muy activa. Los cultivos se mantuvieron por 120 días en este tratamiento. La baja respuesta morfogénica por la ausencia de compuestos orgánicos permitió que el medio MS 50% (macro y micro nutrientes) pudiera mantener reservorios de estos cultivos por más tiempo, manteniendo la respuesta en proliferación y germinación, además de mitigar la oxidación.

7.3 Protocolo 2 (Compuestos adsorbentes)

Usando los adsorbentes Carbón activado y PVP en concentraciones de 1 y 2 g/L cada uno no se logró mitigar la oxidación en los explantes de *D. cinnabarinus*, además de verse afectado el número de PLB's y embriones germinados comparado grupo control.

El problema de oxidación en los explantes se presenta cuando son subcultivados an alguno de los medios utilizados (MS modificado, MS+ C.H., MS+ E.P. y MS 50% (macro y micro nutrientes)), en el cual se mantiene la concentración de nutrientes y compuestos orgánicos, oscureciéndose los tejidos del explante al igual que el medio, Teixeira da Silva, Dobránszki y Ross (2013) reportaron que este proceso es causado por la presencia de polifenoles, los cuales son muy usuales en el cultivo de orquídeas e impactan de manera negativa en su crecimiento y desarrollo, siendo este el comportamiento que presentaron los cultivos de *D. cinnabarinus*, los cuales fueron afectados en la proliferación de PLB's y disminución de la germinación (Figura 35).



Figura 35.- PLB's bastante oxidados y sin respuesta de proliferación y germinación en *D. cinnabarinus*, después de 120 de cultivo en medio MS+PVP 1 g/L.

A medida que el Carbón activado tiene una mayor importancia en la determinación del crecimiento y desarrollo de plantas en cultivo *in vitro*, la ausencia de información precisa en la literatura sobre sus concentraciones reales impide en muchos casos el establecimiento exitoso de los protocolos de cultivo (Ebert y Taylor, 1990), el uso de Carbón activado en protocolos se atribuye a sus propiedades en la absorción de múltiples sustancias (Reinert y Bajaj, 1977), como lo reportaron Johansson et al (1982) y Johansson (1983), el efecto negativo del Carbón activado como estimulante en el crecimiento de las plántulas puede ser causado por la absorción de hormonas, compuestos fenólicos y/o inhibición de sustancias nutritivas en el medio, tales como 6-benciladenida (BA) y en particular etileno como factor en la maduración de los tejidos. Esto permite

inferir que al adicionar Carbón activado al medio MS modificado (Caseína hidrolizada + Extracto de plátano) la disponibilidad de nutrientes y RCV (provenientes de los compuestos orgánicos) fueron absorbidas por el Carbón activado, disminuyendo la actividad proliferativa y de germinación usando ambas concentraciones (imagen 26), esta hipótesis se sustenta en el reporte de Ebert y Taylor (1990), reportaron que en medio de cultivo MS semi-sólido, los rangos de absorción de 2,4-D por el Carbón activado (2.5 g/l) son muy notables (70-80%), manteniéndose la concentración únicamente por 10 o 20 días, dependiendo la concentración usada y disminuyendo aún más después de unos días. Estas diferencias en las concentración de reguladores de crecimiento durante los primeros días o semanas posteriores a la preparación del medio, genera respuestas muy marcadas en el crecimiento de cultivo de tejidos *in vitro*. Esto puede indicar que las concentraciones de 1 y 2 g/L de Carbón activado son muy altas, disminuyendo de manera considerable la disponibilidad de nutrientes y compuestos orgánicos presentes en el medio en los primeros días, disminuyendo aún más durante el cultivo de los explantes de *D. cinnabarinus*; hay que resaltar que al adicionar Carbón activado (1 y 2 g/L) al medio, la germinación de embriones en *D. cinnabarinus* fue nula comparada con el grupo control, en los cuales se presenta oxidación en los explantes y al paso de tres mes se recupera la actividad proliferativa y la germinación, esto coincide con lo reportado por Pedrosa y Mican (2006), la adición de Carbón activado en concentraciones del 5% (peso/volumen) usada en tres medios basales no mejoró la germinación de semillas de *Odontoglossum gloriosum*, Lint *et al.* (1994) también observaron que al adicionar Carbón activado no se estimula la germinación y desarrollo en plántulas de *Bletia formosana*. Otro factor no considerado para el análisis en esta investigación es el cambio de pH al adicionar Carbón activado al medio, como lo reporta Sáens *et al.*, (2010), el Carbón activado altera el pH paulatinamente con el tiempo, modificando la disponibilidad de metales como Fe, Mn, Cu y P, repercutiendo de manera directa en la formación de callo embriogénico en la especie *Cocos nucifera*, esta alteración en el medio posiblemente fue otro de los factores que ocasionó una proliferación muy baja en los explantes de *D. cinnabarinus* y también la ausencia en la germinación,.

Probablemente en concentraciones menores a 1 g/L de Carbón activado permitan mantener la proliferación de PLB's por la disponibilidad de compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo. La concentración de 1 g/L de Carbón activado en el medio de cultivo permitió mantener la formación de algunos embriones y mitigar la oxidación (Figura 36). Si se quiere mitigación la oxidación, la concentración de Carbón activado posiblemente tenga que ser mayor a 2 g/L, ya que la presencia de compuestos fenólicos liberados por el Extracto de plátano logró saturar la capacidad de adsorción del Carbón activado y por consiguiente los compuestos fenólicos liberados por el estrés de los explantes no puedan adsorberse.



Figura 36.-Mejor respuesta obtenida en la mitigación de la oxidación, proliferación y sin germinación de *D. cinnabarinus*, despues de 120 de cultivo en medio MS modificado + 1 g/L de Carbón activado.

En contraparte a la respuesta obtenida en esta investigación, se ha reportado que la presencia de Carbón activado estimula el enraizamiento, proliferación, germinación y maduración de plántulas en orquídeas de las especies *Renanthera imschootiana* (Seeni y latha, 1992), *Cymbidium faberi*, (Ket et al., 2004) e híbridos de *Dendrobium* (Martin y Madassery, 2006). Un factor importante en esta discusión es que *D. cinnabarinus* es una especie de orquídea terrestre, la mayoría de las publicaciones consultadas mencionan especies con hábitos epífitos o son especies de otras familias, complicando las comparativas entre los resultados obtenidos en nuestro protocolo por falta de información. Con respecto a los resultados obtenidos usando PVP como adsorbente no fueron muy diferentes en los que se usó Carbón activado. Se conoce el efecto del PVP por sus propiedades adsorbentes y capacidad de unirse a compuestos fenólicos y toxinas dejándolas inactivas a partir de uniones hidrógeno y su polimerización (Abdelwahd *et al.*, 2008; George, 1996), al usar PVP en este protocolo su actividad adsorbente no tuvo efecto esperado y muy probablemente no fue la concentración suficiente, al igual que en el Carbón activado en concentraciones de 1 y 2 g/L no puedan adsorber los compuestos fenólicos liberados por el Extracto de plátano y los explantes, también puede suponerse que es un factor indirecto, como ocurre con el Carbón activado, el cual suprime la actividad proliferativa y germinatoria de los explantes de *D. cinnabarinus*, cómo lo reportó Bonga y Durzan (1982) mencionando que el PVP agregado al medio de cultivo, con el fin de reducir la actividad de compuestos fenólicos y radicales oxígeno, fue inhibitorio para el crecimiento de tejidos en *Eucalyptus grandis*. La concentración de 1 g/L de PVP en cultivos de *D. cinnabarinus* presentó un menor tiempo en permitir la proliferación en los explantes, 30 días, comparado con el 60 días utilizando 2 g/L, sin embargo el número de embriones generados entre ambos tratamientos no diverge mucho. Posiblemente una concentración menor a 1 g/L de PVP permita que los procesos morfogénéticos en los explantes de

D. cinnabarinus puedan activarse nuevamente en un menor tiempo (proliferación de PLB's), pero esta concentración no permitiría controlar el proceso de oxidación.

Se ha reportado en cultivos de otras familias de plantas que la adición de PVP en el medio de cultivo (sin presencia de compuestos orgánicos) no controlan el problema de oxidación en concentraciones muy diversas de PVP, con en el caso de *Anacardium occidentale* (D' Silva y D' Souza, 1993), *Dendrocalamus latiflorus* (Huang *et al.*, 2002), *Parakmeria lotungensis* (Mengyun y Jingmin, 2004), *Phyllostachis nigra* (Ogita, 2005) y *Spondias purpurea* (Azofeifa, 2007).

El mejor resultado en la mitigación y control de la oxidación en explantes de *D. cinnabarinus* no fue usando alguna concentración de PVP y Carbón activado como adsorbentes, se presentó en el primer protocolo de esta investigación cultivando los explantes de la especie antes mencionada en MS 50% (Figura 37), lo cual nos indica que la presencia de los compuestos orgánicos, principalmente el Extracto de plátano, al ser adicionada al medio de cultivo libera compuestos fenólicos que inducen la drástica oxidación de los explantes, inactivándolos por un periodo cercano a los 90 días. Con respecto a la proliferación de PLB's y embriones cultivados en MS 50% se reactivan a los 30 días de cultivo, una respuesta muy similar a la que se observó usando 1 g/L de PVP, pero sin el proceso de oxidación.

Probablemente las concentraciones usadas sean muy baja para mitigar la oxidación en los explantes, o quizá, estas concentraciones sean muy altas y adsorben un gran porcentaje de los compuestos disponibles en el medio; ambas posibilidades de reportan en la literatura, como inhibidores en la proliferación de PLB's y germinación de los embriones.

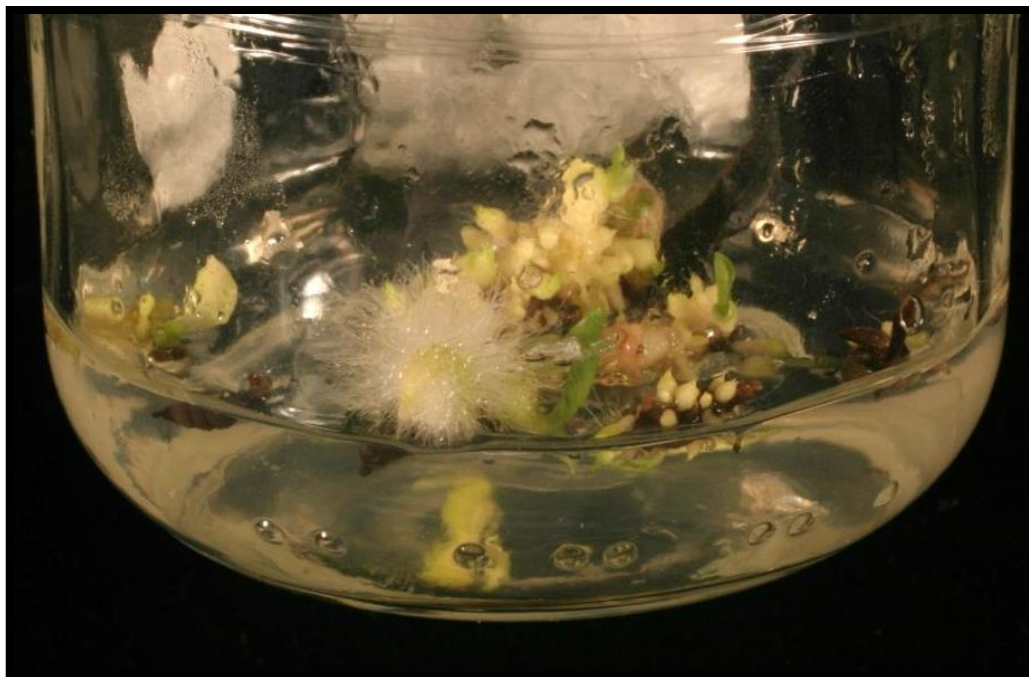


Figura 37.- PLB's de *D. cinnabarinus* sin oxidación, así como germinación y formación de plátunas después de 120 de cultivo en medio MS 50%.

8 CONCLUSIONES

- El Extracto de plátano y Caseína hidrolizada son compuestos orgánicos que permiten obtener la mejor respuesta de proliferación y germinación de PLB's en *D. cinnabarinus* y *D. aurantiacus*; pero debido a su complejidad de nutrientes y variabilidad en sus concentraciones, es muy complejo identificar el compuesto y concentración que inducen las respuestas antes mencionadas.
- La presencia de Caseína hidrolizada (0.5 g/L) como único compuesto orgánico adicionado al medio de cultivo redujo la proliferación de PLB's y germinación de embriones, siendo poco recomendado mantener la formación de PLB's y germinación. En la especie *D. cinnabarinus* se contabilizó 41 PLB's y hubo ausencia en la germinación, mientras que *D. aurantiacus* registró 49 PLB's y la germinación de 4 embriones, siendo en ambas especies el registro más bajo de los tratamientos utilizados.
- Para *D. aurantiacus* el medio MS + Extracto de plátano tuvo una mejor respuesta que el resto de los tratamientos, permitiendo la formación total de 3355 PLB's y 545 embriones germinados, en comparación con el grupo control que generó 1441 PLB's y 99 embriones germinados. Esto nos indica que la presencia de Extracto de plátano durante todo el tratamiento mantiene una alta proliferación pero retrasa la reactivación de dichos procesos.
- El medio de cultivo MS 50% permitió tener mejores resultados en *D. cinnabarinus*, con un total de 1344 PLB's y 153 embriones germinados, superando por al grupo control (680 PLB's y 22 embriones germinados), por lo cual la presencia prolongada de compuestos orgánicos adicionales en el medio de cultivo no representó un mayor beneficio en los tratamientos.
- Aun cuando *D. cinnabarinus* y *D. aurantiacus* son especies muy cercanas y fueron cultivadas *in vitro* usando las mismas características en el medio de cultivo, *D. cinnabarinus* es muy susceptible a la oxidación si en el medio existe la presencia de compuestos orgánicos como es el caso de Caseína hidrolizada y Extracto de plátano en periodos prolongados.

- El uso de adsorbentes como PVP y Carbón activado en concentraciones 1 y 2 g/L adicionados al medio de cultivo no presentaron una respuesta eficiente en el control de la oxidación de *D. cinnabarinus*,
- El mejor medio de cultivo para evitar la oxidación en *D. cinnabarinus* fue la ausencia de Extracto de plátano y Caseína hidrolizada en el medio, lo cual indica que ambos compuestos orgánicos indujeron la oxidación de los explantes,
- Usando medio MS 50% se logra mitigar la oxidación en *D. cinnabarinus* sin detener la proliferación y germinación de los embriones. Para ambas especies de *Dichromanthus* es un medio ideal para mantener en cultivo *in vitro* por largo tiempo sin perder las respuestas morfogénicas obtenidas a partir de ser inducidas por el Extracto de plátano y Caseína hidrolizada.

9 APÉNDICE

9.1 APÉNDICE A. Medio de cultivo de MS modificado

N°	COMPONENTES	g/L
1	MACRONUTRIENTES	
	(NH ₄)NO ₃	1.65
	KNO ₃	1.9
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.37
	KH ₂ PO ₄	0.17
2	CALCIO	
	CaCl ₂	0.44
3	MICRONUTRIENTES	
	MnSO ₄ * H ₂ O	0.01689
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.0086
	H ₃ BO ₃	0.0062
	KI	0.00083
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.00025
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.000025
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.000025
4	FIERRO	
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278
	Na ₂ EDTA	0.0373
5	VITAMINAS	
	Tiamina * HCl	0.0001
	Ácido Nicotínico	0.0005
	Piridoxina * HCl	0.0005
6	INOSITOL	0.10
7	GLICINA	0.002
8	CARBOHIDRATOS	
	Sacarosa	30.0
9	COMPUESTOS ORGÁNICOS	
	Caseína hidrolizada	0.5
	Extracto de plátano	10% P/V
10	Gerilificante	
	Gelrite	3.5

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahd, R., Hakam., N., Labhilili, M., y Udupa, S. M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolic in *in vitro* plant regeneration of *Faba bean*. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 997- 1002.
- Abdullah, R., Thompson, J. A., Khush, G. S., Kaushik, R. P., y Cocking, E. C. (1989) Protoclonal variation in the seed progeny of plant regenerated from rice protoplast. *Plant Science*, 65, 97-101.
- Akerman, J. D. (1975). Reproductive biology of *Goodyera oblongifolia* (Orchidaceae). *Madroño*, (23), 191-198.
- Amin, M., Jaiswal, V. (1988). Micropropagation as a naid to rapid cloning of aguava cultivar. *Scientia Horticulturae*, (36), 89-95.
- Anderson J.O. (1976). Embryogenesis in wild carrot cells. *In Vitro*, 12, 332.
- Andronova, E. V. (1988). Embryogenesis and postseminal development of orchids (for example of *Dactylorhiza baltica*, *D. incarnata*, *Thunia alba*, *Bletilla striata*). (Ph.D. dissertation), Komarov Botanical Institute, Leningrad, Russia.
- Andronova, E. V., Batygina, T. B., y Vasilyeva, V. E. (2000). Protocorm. In Batygina T. B. (Ed.), *Embryology of flowering plants. Terminology and concepts*. Vol. 3, (pp 329–334). St. Petersburg.
- Arditti, J. (1990). Lewis Knudson (1884–1958): His science, his times and his legacy. *Lindleyana*, 5, 1–79.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology*. Wiley-Interscience, Nueva York.
- Arditti, J., y Ernst, R. (1984). Physiology of germination orchid seeds. *Orchid biology, reviews and perspective II*. Ithaca, USA.: Cornell University Press.
- Arditti, J., y Ernst, R. (1993). *Micropropagation of orchids*. Wiley-Interscience, Nueva York.
- Ayensu, E. S., y Defilipps, R. A. (1981). The international regulation of trade in endangered species of wild orchids. *American Orchid Society*, 50(8), 959-967.
- Azofeifa, A. (2007). *Desarrollo de metodologías para la caracterización de materiales promisorios de jocote (Spondias purpurea L.) por medio demarcadores moleculares, para el rescate de embriones y para el cultivo de yemas in vitro*. (Tesis MSc.). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Bartosz, G. (1997). Review: Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(1), 47-64.

- Batygina, T. B., y Amdronova, E. V. (2000). The orchid protocorm: an opinion. In Mukerji K. (ed.), *Glimpses in botany* (pp. 60-77). New Delhi, India: APH Publishing Corporation.
- Batygina, T. B., y Shevtsova, G. G. (1985). Metamorphosis in orchidontogenesis (on the example of *Cymbidium hybridum*, Orchidaceae). *Botanicheskii Zhurnal*, (70), 1614–1621. SSSR.
- Batygina, T. B., y Vasilyeva, V. E. (1983 a). Development of the embryo and seedling of some orchids. Abstracts of the II All-Union Conference “*Conservation and cultivation of the orchids*”. (pp 73-75). Kiev, USSR.
- Batygina, T. B., y Vasilyeva, V. E. (1983 b). System of the reproduction of Orchidaceae on example of *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó. Proceedings of the VII International Symposium “*Fertilization and Embryogenesis in ovulated plants*” (pp 27–33). High Tatra (Rackova dolina), Czechoslovakia.
- Batygina, T.B. (1998). Certain aspects of the reproductive system in orchids. *Byulleten’ Botanicheskogo Sada I.S.Kosenko*, (7), 155–157. Russian.
- Bell, A.D., y A. Bryan. (1991). *Plant form – An illustrated Guide to Flowering Plant Morphology*. Oxford University Press, Oxford.
- Bembemcha, Pebam., Kishor, Rajkumar y Bai, Narmatha. (2016). In vitro Immature Embryo Germination and Propagation of *Vanda stangeana*, Rchb. f., an Orchid Endemic to India. *Horticulture Environmental Biotechnology*, 57(6), 615-624
- Bentley, B.L. (1977). Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review. Ecology System*, (8), 407-427.
- Bonga, Jan. M., y Durzan, Don. (Eds.) (1982). *Tissue Culture in Forestry*. London, England: The Hague.
- Calderón de Rzedowski y G., Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México* (p. 1291). Michoacan, México: Instituto de Ecología A.C., Centro Regional del Bajío, Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad
- Carabias, J., V. Arriaga y V. Cervates. (1994). Los recursos naturales de México y el desarrollo. En P. Pascual y J. Woldenberg (Ed.), *Desarrollo, desigualdad y medio ambiente* (pp. 304-305.). México: Editorial Cal y Arena.
- Catling, P.M. (1982). Breeding system of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canada Journal of Botany*, (60), 1080–1093.
- Catling, P.M. (1983). Pollination of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canada Journal of Botany*, (60), 1080-1093

- Chase, M.W. (2001). The Origin and biogeography of Orchidaceae. En A. M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase y E.N. Rasmussen (Eds), *Genera Orchidacearum, vol. 2, Orchidoideae* (part one), (pp.1-9), Oxford, U.K.: Oxford University Press.
- Chase, M.W., Cameron, K. M., Barrett, R. L., y Freudenstein, J. V. (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. En K. W. Dixon, Kell, S.P., Barrett, R. L., y Cribb, P. J. (Eds), *Orchid conservation* (pp. 69-89). Borneo: Natural History Publications.
- Chávez, A. V. M., y Rublo, I. A. (1995). El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. En Linares, E., Dávila, P., Chiang, F., Bye, R., y Elias, T. S. (Eds.) *Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques* (pp. 123-131). México: Instituto de Biología. UNAM.
- Chen, J. T., Chang, C., y Chang W. C. (1999). Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Reports*, (19), 143-149.
- Chugh, S., Guha, S., y Usha Rao, I. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*. (122), 507-520.
- Churchill, M. E., Arditti, J., y Ball, E. A. (1971). Clonal propagation of orchids from leaf tips. *American Orchids Society Bulletin*, (42), 109-113.
- Churchill, M. E., Ball, E. A., y Arditti J. (1970). Production orchids plants from seedling leaf tips. *Orchids Digest*, (34), 271-273.
- Clark, D. E. (1977). *How to grow orchids*. California, U.S.A: Lane Publishing Co., Second edition.
- Darwin, C. (1877). *The various contrivances by which orchid flowers are fertilized by insects*. Chicago, U.S.A.: University of Chicago Press, 2a ed. (reimpresión de 1984)
- Dello Iorio R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perillis, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Costantino, p., y Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, (322), 1380–1384.
- Dressler, R.L. (1993). *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Portland, U.S.A.: Dioscorides Press.
- Dressler, R. L., y Salazar, G. A. (1991). Viscarium, a term of the glue-bearing area of the rostellum. *Orchid Press Newslett*, (17), 11-12.
- D´Silva, I., y D´Souza, L. (1993). Controlling contamination and browning of *in vitro* cultures of cashew. *Journal of Plantation Crops*, 21, 22-29.

- Ebert, A., y Taylor, H. F., (1990). Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, (20), 165-172.
- El-Hendawy, A. A., Samra, S. E, y Girgis, B. S. (2001) Adsorption characteristics of activated carbons obtained from corncobs. *Colloid Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, (180), 209–221.
- Endress, P.K. (1994). *Diversity and Evolution Biology of Tropical Flowers*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
- Ernst, R. (1974). The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of Paphiopedilum. *American Orchid Society Bulletin*, (43), 35-38.
- Figueiredo, S. F. L., Albarello, N., y Viana, V. R. C. (2001). Micropropagation of Rollinia mucosa (JACQ.) BAILL. *In vitro. Cellular and Development Biology-Plant*, (37),471-475.
- Gannoun, S., Lionakis, S., Gerasopoulos, D., Kaska, N., Kuden, A., Ferguson, L., y Michailides, T. (1995). Aspects of in vitro culture of Pistacia terebinthus and P. vera. *Acta Horticulturae*, (419), 201-206.
- George, E. F. y Sherrington, P. D. (1984). *Plant propagation by tissue culture*. Handbook and directory of commercial laboratories. England: Exegetics Ltd.
- George, Edwin F., Hall, Michael A., y Klerk, Greer-Jan. (Ed). (2008). *Plant Propagation by tissue Culture* (pp. 80-81). Netherlands: Springer, 3rd Edition, Vol 1. The Background.
- George, E., (1996). *Plant propagation by tissue culture; part 2* (pp. 1361). England: 2ed. Exegetics Limited.
- George, P. S., y Ravishankar, G. A. (1997). In vitro multiplication of Vanilla planifolia using axillary bud explants. *Plant Cell Report*, (16), 490–494.
- Gonçalves, L. M., Prizão, E. C., Maria, A. M. G., Claudete, A. M., y Maria de Fátima, P. S. M. (2011). Use of complex supplements and light-differential effects for micropropagation of Hadrolaelia purpurata (= Laelia purpurata) and Encyclia randii orchids. *Acta Scientiarum Agronomy*, (34), 459-463.
- Gómez, R. K. (1998). Embriogénesis somática. En Ponce, J. N. (Ed.), *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (pp. 57-77). Santa Clara, Cuba: Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas.
- Gupta, S., Sen, B., y Bhattacharya, S. (1987). Embryogenesis and differentiation in two species of Trigonella. *Phytomorphic*. (37), 95-101.
- Hágsater, E., y Soto-Arenas, M. A. (1998). *Orchid conservation in Mexico*. Selbyana, 19(1), 15-19.

- 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*. México: Instituto Chinoín.
- Hardisson A., Rubio, C., Baez A., Martín, M., Álvarez, A., Díaz, E. (2001). Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chemistry*, (73), 153-161
- Huang, L. C., Lee, Y. L., Huang, B. L., Kuo, C. L., y Shaw, J. F. (2002). High polyphenol oxidase activity and low titratable activity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. (38), 358–365.
- Ishii Y., Takamura T., Goi M., y Tamaka M. (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Report*. (17), 446-450.
- Jiménez, E. G. (1998). Generalidades del cultivo in vitro. En Ponce, J. N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología (pp. 13-24.). Santa Clara, Cuba: Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas.
- Johansson, L., Andersson, B., y Eriksson, T. (1982). Improvement of and there culture technique: activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physiology Plant*, (54), 24–30.
- Johansson, L., Calleberg, E., y Gedin, A. (1990). Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis*. *Physiology Plant*, (80), 243–249.
- Johansson, L. (1983). Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiology Plant*, (59), 397–403.
- Ket, N. V., Hahn, E. J., Park, S. Y., Chakrabarty, D., y Paek, K. Y., 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus ormosanus*. *Biology Plant*, (48), 339–344.
- Koopowitz Harold. (2001). *Orchids and their Conservation*. Portland, Or. U.S.A: Timber Press.
- Kurzweil, H. (1988). Developmental studies in orchids flowers III: Neottiid species. *Nordic Journal Botany*, (8), 271 -282.
- Lim-Ho, C.L. (1981). Tissue culture of orchid hybrids and Singapore Botanic Garden. En Rao, A. N. (Ed.) Proceedings of Costed Symposium on *Tissue Culture of Economically Important Plants* (pp 295-300), Singapore.
- Litz, R. E. y Jarret, R. L. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En Roca, W. M. y Mroginski, L. A. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones* (pp.143-172). Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- Low, P. S., y Merida, J. R. (1996). The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiology Plantarum*. (96), 533-542.
- Malmgren, S. (1996). Orchids propagation: theory and practice. En Allen C (Ed.) *North American native terrestrial orchids: propagation and production*. North American Native Terrestrial Orchids Conference, Germantown, Maryland, U.S.A. pp 63-71.
- McVaugh, R. (1985). Orchidaceae. Pp. 1-363, en: Anderson, W. R. (Ed.) *Flora Novo-Galiciana: a descriptive account of the vascular plants of Western Mexico*, Vol. 16. The University of Michigan Press, Michigan, U.S.A.
- Martin, K.P., y Madassery, J. (2006). Rapid in vitro propagation of Dendrobium hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae* (108), 95–99
- Martínez, P. A. (1991). *Propagación masiva in vitro y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción*. (Tesis de Maestría). (P. 107) Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Mathews, V. H., y Roa, P. S. (1980). In vitro multiplication of Vanda hybrids through tissue culture techniques. *Plant Science Letters*, (17), 383-389.
- Mengyun, S. y Jingmin, J., (2004). A study on techniques of inducing callus and controlling browning of stem segments of Parakmeria lotongensis. *Forest Research*, (17), 757-762.
- Möller, B. y Weijers, D. (2009). Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor Perspect. Biology*, 1(5), 15-45.
- Moubayidin, L., Di Mambro, R. y Sabatini, S. (2009). Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in Plant Science*. 14(10), 557–562.
- Müller, B. y Sheen J., (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*. 453(7198), 1094–1097.
- Nayak, N. R., Patnaik, S. y Rath, S. P. (1997). Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchids, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Reports*. 16(8),583-586.
- Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*, 22(2), 119–125.
- Paek, K.Y., y Yeung, E.C. (1991). The effects of 1-naphthalene acetic acid and N6-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 24(2): 65–71.
- Pan, M. J., y Van Staden, J., (1998). The use of charcoal in in vitro culture a review. *Plant Growth Regulators*, 26(3), 155–163.

- Park, Y. S., Kakuta, S., Kano, A., y Okabe, M. (1996). Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 45(1), 79–85.
- 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. Aguascalientes, México, p.179
- Philip, V. J., y Nainar, A. Z. (1988). Structural changes during the in vitro germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Annals of Botany*. 61, 139-145.
- Pierik, R. L. M., Sprenkels, P. A., Van Der Harst, B., y Van DerMeys, Q. G. (1988). Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *In vitro. Scientia Horticulturae*. 34(1), 139-153.
- Pridgeon, A. M. (1982). Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 69(6), 921-938.
- Pridgeon, A. M., y Chase, M.W. (1995). Subterranean axes in tribe Diuridae (Orchidaceae); Morphology, anatomy and systematic significance. *American Journal of Botany*, 82(12),1473-1495.
- Radojevic, L. (1988) Plant regeneration of *Aesculus hippocastanum* L. (Horse Chestnut) through somatic embryogenesis. *Journal of Plant Physiology*. 132(3), 322-326.
- Razdan, M. K. (2002). *Introduction to Plant Tissue Culture*. USA: Second Edition. Science Publishers, Inc. (p. 375).
- Reinert, R. A., y Mohr, H. C. (1967). Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 91,664–671.
- Richard, L.C. (1817). The Orchideis europaeis annotations. *Mémoires du Muséum d’Histoire Naturelle*, París.
- Rodan, B. D., y Campbell, F. T. (1996). CITES and sustainable management of *Swietenia macrophylla*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122, 83-87.
- Rosen, B.R. (1988). Biogeographic patterns: A perceptual overview. En Meyers, A. A., y Giller, P.S. (Eds), *Analytical Biogeography*, Londres, Champan and Hall. pp 23-25
- Rotor, G. (1949). A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. *American Orchid Society Bulletin*, 18, 738–739.
- Rudall, P., y Bateman, R. M. (2002). Roles of synorganisation, zygomorphy, and heterotopy in floral evolution: The gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocts. *Biological Reviews*, 77, 403 -441.

- Růžička, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, Marc C. E., y Benková, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4284–4289.
- Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*, México: Limusa, S.A., 504pp.
- Rzedowski, G. C de, J. Rzedowski. (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Michoacan, México: 2da. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sáens, L., Herrera-Herrera, G., Uicab-Ballote, F., Chan, J. L., y Oropeza, C. (2010). Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100(3), 301–308.
- Sarmiento, M, y Romero, C. (2000). Orquídeas Mexicanas. Banco Nacional de Obras y Servicios Públicos Miguel Ángel Porrúa, México, D.F.
- Sarukahán, J., y Dirzo, R. (2001). Biodiversity rich countries, En *Encyclopedia of biodiversity*, San Diego, USA, vol. 1. Academic Press, (pp. 419-436).
- Saxena, S., y Dhawan, V. (1999). Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 18(5), 438-443.
- Seeni S., y Latha P. G. (1992). Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 29(3), 167–172
- Seeni, S., y Latha, P. G. (2000). *In vitro* multiplication and eco rehabilitation of the endangered Blue Vanda. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 61, 1-8.
- 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.
- Shevtsova, G. G., Batygina, T. B., y Lavrenteva, A. N. (1986). Certain aspects of renewal system in orchids in *Cymbidium hybridum* (Orchidaceae) as an example. *Botanicheskii Zhurnal*, 71, 1457–1467.
- Singer. R.B., y Sazima, M. (2001a). Flower Morphology and pollination mechanism in three sympatric Goodyerinae orchids from southeastern Brazil. *Annals of Botany*, 88 989 -997.
- Singer. R.B., y Sazima, M. (2001b). The pollination mechanism of three sympatric Prescottia (Orchidaceae: Prescottinae) in southeastern Brazil. *Annals of Botany* 88, 999 – 1005.

- Skoog, F., y Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 54,118–130.
- Soto-Arenas, M. A. (1994). Population studies in Mexico orchids. En A. Prigdeon, *Proceedings of the 14th World Orchid Conference*, Glasgow, Her Majesty Stationery Office, Edimburgo.
- Soto-Arenas, M.A. (1996). México (regional account). En *UICN/SSC Orchids Specialist Group, Orchids: Status Survey and Conservation Action Plan*, UICN, Gland, pp 53-58.
- Soto-Arenas, M. A. (2002). *Dichromantus cinnabarinus*. En: Hágsater, E. y Soto, M. (Ed.), *Icones Orchidacearum. Orchids of Mexico Part 2*. Mexico: Asociación Mexicana de Orquideología. A.C.
- Soto-Arenas, M. A., y Hágsater, E. (1990). Algunas ideas sobre la conservación de orquídeas mexicanas. En J. L. Campillo y F. Rivera (Eds.). *Áreas naturales protegidas y especies en extinción*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, pp155-172.
- Soto-Arenas, M. A., y Solano, G. R. (2004), *Información actualizada sobre las especies de orquídeas del Proyecto NOM-059-Ecol-2000*. Reporte final del Proyecto W-029. Comisión Nacional Para el Conocimiento de la Biodiversidad.
- Stewart, S. y Keane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination an *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 149-158.
- Suárez, Q. I. (2010). Alternativas simbióticas y asimbióticas de conservación (micropropagación y reintroducción) de *Dichromanthus aurantiacus* (Orchidaceae), como especie modelo en la reserva ecológica el Pedregal de San Ángel. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Szlachetko, D. L. y Rutkowski, P. (2000). *Gynostemium orchidaleum* 1: Apostasiaceae, Cyripediaceae, Orchidaceae (Thelymitroideae, Orchidoideae, Tropidoideae, Spiranthoideae, Neottioidae, Vanilloideae). *Acta Botanica Fennica*, 169, 1 - 379
- Tanaka, M., Hasegawa, A. y Goi, M. (1974). Studies on the clonal propagation of monopodial orchids by tissue culture. Formation of protocorm-like bodies from leaf tissue in *Phalaenopsis* and *Vanda*. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, 44(1), 47–58.
- Teixeira da Silva, J.A., Singh, N. y Tanaka, M. (2006b). Priming biotic factors for optimal protocorm like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84(2),119-128.

- Teixeira da Silva, J. A. y Tanaka, M. (2006). Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(3):203–210
- Teixeira da Silva, J. A., Yam, T., Fukai, S., Nayak, N. y Tanaka, M. (2005). Establishment of optimum nutrient media for in vitro propagation of *Cymbidium* Sw. (Orchidaceae) using protocorm-like body segments. *Propagation of Ornamental Plants*, 5(3):129–136.
- Teixeira da Silva, J.A., Dobránszki, J., y Ross, S. (2013). Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49(1), 1–16.
- Teixeira, J., Sondahl, N., y Kirby, E. (1993). Somatic embryogenesis from in mature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 34(3), 227-233.
- Tellez, V., M. A. A., y Flores, V. L. (2007). *Orquídeas terrestres del Pedregal de san Ángel, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel*, D.F., México: UNAM.
- Terzi, M., y Loschiavo, F. (1990). Somatic embryogenesis. En Bhojwani, S. S. (Ed) *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations* (pp. 54-66). Netherlands: Elsevier Science Publishers.
- Thorpe, T. A. (1990). The Current Status of Plant Tissue Culture. En Bhojwani, S. S. (Ed.), *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations* (pp. 1-33). USA: Elsevier Science Publishers.
- Thorpe, T. A. y Stasolla, C. (2001). Somatic Embryogenesis. En Bhojwani, S. S. y Soh, W. Y. (Eds.). *Current Trends in the Embriology of Angiosperms* (pp. 279-336). Londres, Inglaterra: Kluwer Academic Publishers.
- Toledo, V.M. (1988). La diversidad Biológica de México. Ciencia y Desarrollo. XIV (81). pp 17-30.
- UICN/SSC Orchid Specialist Group. (1996). Orchids-Status Survey and Action Plan.
- Van der Pijl, L., y Dodson, C.H. (1966). *Orchid flowers: their Pollination and Evolution*. (Ed.) University Miami Press, Florida, USA
- Vij, S. P., y Pathak, P. (1990). Micropropagation of orchids through leaf segment. *Journal of the Orchids Society of India*. 4(1), 69-88.
- Vij, S. P., Sood, A., yPlaha, K. K. (1984). Propagation of *Rhynchostylis retusa* B1 (Orchidaceae) by direct organosenesis from leaf segment cultures. *Botanical Gazette*, 145, 210-214.
- Vij, S. P., Sood, A., y Sharma, M. (1986). In vitro leaf segment culture of *Vanda testacea* (Lindl.) Reichb. F. (=V.parviflora Lindl.) (Orchidaceae). *Current Science*, 55, 1100-1101.
- Villalobos, V. M., y Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (Ed.) *Cultivo de tejidos en la agricultura, Fundamentos y aplicaciones* (pp. 127-142). Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- www.cites.org/esp/resources/species.html.

- Walkey, D. G. A (1972). Production of Apple plantlets from axillary bud meristems. *Canadian Journal of Plant Science*, 52, 1085-1087.
- Whitner, C. (1974). *The orchids*. (Ed.) John Wiley y Sons, New York.
- Zettler, L. W., y McInnis, T. M. (1993). Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana*, 8(3), 155-162.
- Zettler, L.W., Sharma, J., y Rasmussen, F. N., (2003). Mycorrhizal diversity. En K.W. Dixon, S.P. Keel, R.L. Barrett y P.J. Cribb (Eds), *Orchid Conservation* (pp 205-226). Borneo: Natural History Publications.