



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Propagación *in vitro* de *Prosthechea cochleata*
(Orchidaceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SARAY CHAVERO CRUZ



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Víctor Manuel

Chávez Avila

(CIUDAD DE MÉXICO, 2020)



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Chavero
Cruz
Saray
56 44 95 12
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308078110
2. Datos del tutor
Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Avila
3. Datos del sinodal 1
M. en C.
Octavio
González
Caballero
4. Datos del sinodal 2
M. en C.
María de los Ángeles Aída
Téllez
Velasco
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Wendy Rocio
Juárez
Pérez
6. Datos del sinodal 4
Dra.
María del Pilar
Ortega
Larrocea
7. Datos del trabajo escrito
Propagación *in vitro* de *Prosthechea cochleata* (Orchidaceae)
87 p
2020

**LA PRESENTE INVESTIGACIÓN FUE
REALIZADA EN EL LABORATORIO DE
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DEL
JARDÍN BOTÁNICO DEL INSTITUTO DE
BIOLOGÍA DE LA U.N.A.M BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR. VÍCTOR MANUEL
CHÁVEZ AVILA**

*A mis padres, por siempre brindarme los recursos
y apoyo necesario para lograr mi formación académica,
mi admiración y respeto siempre.*

**“Marco Polo describe un puente, piedra por piedra.
-¿Pero, cuál es la piedra que sostiene el puente?-pregunta Kublai Kan
-El puente no está sostenido por esta piedra o por aquella- responde
Marco-, sino por la línea del arco que ellas forman.
Kublai permanece silencioso, reflexionando. Después añade:
-¿Por qué me hablas de las piedras? Lo único que me importa es el arco.
Polo responde
-Sin piedras no hay arco.”
-Italo Calvino**

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la casa de estudios que me permitió desarrollarme profesionalmente, por la disposición de los recursos necesarios para una enseñanza de calidad.

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, en especial al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por abrirme las puertas para realizar esta investigación, por brindarme el espacio, el tiempo y las herramientas necesarias para concluirlo.

Al jurado asignado, Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, M. en C. Octavio González Caballero, M. en C. María de los Ángeles Aida Téllez Velasco, M. en C. Wendy Rocio Juárez Pérez, Dra. María del Pilar Ortega Larrocea, por tomarse el tiempo para revisar mi trabajo y por todos sus comentarios y aportaciones para mejorarlo.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, por aceptar ser mi tutor, por la paciencia, los consejos y enseñanzas, por el impulso que le da a cada uno de sus alumnos para cumplir sus objetivos. Pero también gracias por la calidez humana, por preocuparse y ocuparse de cada uno de sus alumnos, por las risas, por la convivencia, por creer en mí.

A todos los miembros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, que hicieron de mi estancia un tiempo agradable, por su disposición a ayudar y enseñar. A mis amigos Alex, Alo y Alan, un gusto compartir con ustedes y por su valiosa ayuda para concluir mi trabajo, Alex, gracias. A Magaly por apoyarme en las cuestiones de edición y formato.

A C. Insaurralde, por darme ese último empujón que necesitaba para concluir este proyecto, por enseñarme que hay que ser muy valientes para cumplir nuestros sueños y/o alcanzar nuestras metas, y que si X veces caemos, X veces hay que levantarnos, tomar fuerza y seguir. Sin duda alguna agradezco la coincidencia en esta vida. De corazón gracias, siempre te tendré presente.

A E. Noriega porque pese a todas las circunstancias, siempre estás ahí, dándome el soporte y la fuerza necesaria para enfrentar cualquier situación, aconsejarme, o simplemente para escuchar, por tu amistad y amor. Gracias por ser y estar....

Índice

FIGURAS.....	1
CUADROS.....	2
GRÁFICAS.....	2
ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 Biodiversidad.....	4
2.2 México país megadiverso.....	5
2.3 Familia Orchidaceae.....	6
2.4 Semillas, germinación y desarrollo embrionario.....	7
2.5 Género <i>Prosthechea</i> (Knowles & Westc) y especie de estudio.....	9
2.6 Importancia de la especie y problemática que enfrenta.....	12
2.7 Protección de especies silvestres.....	14
2.8 El uso del Cultivo de Tejidos Vegetales.....	15
2.9 Medios de cultivo.....	21
2.10 Hormonas vegetales/RCV.....	24
2.11 Complejos orgánicos.....	25
2.12 Vías de regeneración <i>in vitro</i>	26
2.13 Cultivo de tejidos en orquídeas.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo general.....	32
4.2 Objetivos particulares.....	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1 Fuente de material biológico.....	32
5.2 Viabilidad, conteo y caracterización de las semillas maduras.....	33
5.3 Desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de las semillas maduras e inmaduras.....	33
Desinfección, germinación de semillas maduras y desarrollo de protocormos en medio MS 50/100 y KC.....	33
Desinfección y germinación de semillas maduras en medio MS 50/100 adicionado con 0, 10, 20 y 30 % de agua de coco v/v.....	36
Desinfección y germinación de semillas inmaduras.....	38
5.4 Inducción de explantes de hoja, tallo y raíz en medio MS 50/100 adicionado con RCV ANA/Kin.....	39
5.5 Análisis estadístico.....	41
5.6 Aclimatización.....	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42

6.1 Viabilidad, conteo y caracterización de las semillas maduras	42
6.2 Desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de las semillas maduras e inmaduras	45
6.3. Germinación y desarrollo de las semillas maduras en medio MS 50/100 y KC.....	46
Efecto del medio de cultivo en la germinación.....	46
Efecto de la luz/oscuridad en la germinación de <i>P. cochleata</i>	48
Efecto del medio de los medios de cultivo MS 50/100 y KC, en el desarrollo de las plántulas	49
6.4 Desinfección y germinación de semillas maduras en medio MS 50/100 adicionado con 0, 10, 20 y 30% v/v de agua de coco.....	55
6.5 Viabilidad y germinación de las semillas inmaduras	58
6.6 Inducción de explantes de hoja, tallo y raíz en medio MS 50/100 adicionado con RCV ANA/Kin.....	59
Oxidación de los explantes	60
Regeneración de brotes.....	63
Enraizamiento de los brotes.....	67
6.7 Aclimatización	70
7. CONCLUSIONES	72
8. PERSPECTIVAS	74
9. BIBLIOGRAFÍA.....	76

FIGURAS

Figura 1. Rangos que abarca el concepto de biodiversidad. Modificado de CONABIO, (2000).....	4
Figura 2. <i>Prosthechea cochleata</i> . a) Planta completa. b) Vista frontal de la flor. c) Labelo y columna, vista frontal. d) Labelo, vista frontal. e) Labelo, vista posterior. f) Con ovario-pedúnculo, vista lateral. g) Columna, vista frontal. h) Columna, vista posterior (tomado de Mó et al., 2014).....	11
Figura 3. Vías de regeneración en el Cultivo de Tejidos Vegetales.....	27
Figura 4. Método de desinfección para semillas maduras.....	34
Figura 5. Medios de cultivo y tiempo en el que permanecieron las semillas maduras durante su germinación y desarrollo. AC:agua de coco, AOX:antioxidantes.....	36
Figura 6. Medios de cultivo utilizados en la germinación de semillas maduras.....	37
Figura 7. Medios de cultivo y tiempos empleados en la germinación de semillas inmaduras.....	39
Figura 8. Plántula de <i>Prosthechea cochleata</i> con siete meses de edad propagada a partir de la germinación asimbiótica. Se muestra con una línea punteada los cortes que se realizaron para la obtención de explantes. R: raíz, H: hoja, T: tallo.....	40
Figura 9. Plantas de 3-5 cm de altura utilizadas para aclimatización.....	42
Figura 10. Semillas maduras de <i>Prosthechea cochleata</i> , e: embrión teñido con TTZ, t: testa, semilla sin embrión.....	44
Figura 11. Fases de desarrollo en la germinación de las semillas de <i>Prosthechea cochleata</i> a lo largo de seis semanas en medio de cultivo MS 50/100 y KC expuestos a oscuridad y fotoperiodo 16 h luz, 8 h oscuridad. MS/L: Medio MS 50/100 expuesto a fotoperiodo, MS/O: Medio MS 50/100 expuesto a oscuridad, KC/L: Medio KC expuesto a fotoperiodo, KC/O: Medio KC expuesto a oscuridad. Ef: Embrión que muestra inicios de fotosíntesis, dada su coloración verde, Tr: Testa rota, Rz: Rizoides, Eh: embrión hinchado por la absorción de agua del medio, Sng: Semilla sin germinar.....	50
Figura 12. Fases de desarrollo en la germinación de las semillas de <i>Prosthechea cochleata</i> de la semana 8 a 12 en medio de cultivo MS 50/100 y KC expuestos a oscuridad y fotoperiodo 16 h luz, 8 h oscuridad. MS/L: Medio MS expuesto a fotoperiodo, MS/O: Medio MS expuesto a oscuridad, KC/L: Medio KC expuesto a fotoperiodo, KC/O: Medio KC expuesto a oscuridad. Rz: Rizoides, Rv: Raíz verdadera, Pf: Primordio foliar, Hv: hoja verdadera, P: Protocormo con ápice en punta, Sng: Semilla sin germinar.....	51
Figura 13. Plántulas de <i>Prosthechea cochleata</i> con siete meses de desarrollo, a) Plántula en medio MS 50/100, b) Plántula en medio KC. Pf: Primordio foliar, Rv: Raíz verdadera, Hv: Hoja verdadera.....	53
Figura 14. a) Semillas inmaduras de <i>Prosthechea cochleata</i> teñidas con TTZ. Se logra ver el poco desarrollo de los embriones comparados con los embriones de las semillas maduras b) Puntas de flecha: embriones inmaduros, e: embriones maduros, t: testa.....	59
Figura 15. Se muestra en la parte superior un explante de raíz elongado a las 14 semanas de sembrado, en la parte inferior se muestra un explante de raíz con el mismo tiempo de sembrado, el cual no mostró cambio alguno en tamaño.....	63
Figura 16. Brotes regenerados de <i>Prosthechea cochleata</i> a partir de explantes de tallo en distintos tiempos. a) 4 semanas en medio MS, b) 10 semanas en medio MS 1/0.5 mg/L ANA/ Kin, c) 6 semana procedentes de medio MS 0.5/0.5 mg/L ANA/ Kin, d) 20 semanas procedentes de medio MS 0.5/0.5 mg/L ANA/ Kin. Las flechas rojas indican los brotes.....	64
Figura 17. Explante de tallo en medio suplementado con ANA/Kin 1/0.5 mg/L, a las cuatro semanas de cultivado. Se puede observar la presencia de raíces que fueron generadas en la superficie cortada del explante.....	69

Figura 18. Plantas en proceso de aclimatización en mezcla de sustrato tepojal: corteza: agrolita: peat moss 2:1:1:1 v/v.....71

CUADROS

Cuadro 1. Biodiversidad de México con respecto a otros países megadiversos. (Llorente & Ocegueda, 2008).....	6
Cuadro 2. Principales plantas propagadas <i>in vitro</i> , en India, Estados Unidos, Alemania y México.....	16
Cuadro 3. Formulación de diferentes medios de cultivo (Parthibhan <i>et al.</i> , 2012; Bektas <i>et al.</i> , 2013; Mayo <i>et al.</i> , 2010; Murashige & Skoog, 1962).....	23
Cuadro 4. Principales características de algunas hormonas vegetales y RCV (Jankiewicz, 2003; George <i>et al.</i> , 2008).....	24
Cuadro 5. Cultivo de tejidos vegetales realizado con algunas especies de orquídeas de los géneros <i>Encyclia</i> y <i>Prosthechea</i>	29
Cuadro 6. Mejores tratamientos y respuestas obtenidas en trabajos realizados por propagación por cultivo de tejidos vegetales con explantes de algunas especies de <i>Encyclia</i> y <i>Prosthechea</i>	30
Cuadro 7. Distribución de semillas maduras (cápsula 1), en medio de cultivo MS 50/100 con 0, 10, 20 y 30% v/v de agua de coco, en frascos y cajas de Petri. * 1mg de semillas/1mL de agua destilada estéril.....	37
Cuadro 8. Tratamientos utilizados en la inducción morfogénica de explantes de hoja, tallo y raíz de <i>Prosthechea cochleata</i>	40
Cuadro 9. Características morfológicas de las semillas maduras de <i>Prosthechea cochleata</i>	43
Cuadro 10. Porcentajes de germinación en fotoperíodo y oscuridad después de siete semanas de sembradas las semillas maduras.....	46
Cuadro 11. Estadíos de la germinación y desarrollo de las semillas de orquídeas, comparadas en tiempo con el desarrollo observado en las semillas de <i>Prosthechea cochleata</i> en los medios MS 50/100 y KC.....	52
Cuadro 12. Medidas promedio de plántulas con siete meses de desarrollo en diferentes medios de cultivo.....	54
Cuadro 13. Porcentajes de germinación de semillas maduras (lote 2, sembradas 19 semanas después de que la cápsula presentó dehiscencia) cultivadas en medio MS 50/100 con diferentes concentraciones (v/v) de agua de coco, a las siete semanas de siembra.....	55
Cuadro 14. Número de brotes regenerados a partir de tallos en los diferentes tratamientos al cabo de 16 semanas de cultivo.....	65
Cuadro 15. Número de brotes con raíz, a las 16 semanas de cultivo.....	68

GRÁFICAS

Gráfica 1. Plantas propagadas <i>in vitro</i> en Alemania en el año 2000 (modificado de Preil, 2003).....	17
Gráfica 2. Porcentaje de oxidación a través del tiempo en explantes de hoja, tallo y raíz de <i>Prosthechea cochleata</i> . Líneas verticales: desviación estándar.....	60
Gráfica 3. Porcentaje de oxidación en explantes de hoja, tallo y raíz, con respecto al tratamiento de RCV, a las 16 semanas de siembra. Líneas verticales: desviación estándar..	62

ABREVIATURAS

CTV: Cultivo de Tejidos Vegetales

RCV: Reguladores de Crecimiento Vegetal

MS: Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962)

KC: Medio de cultivo Knudson C (1946)

TTZ: Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

ROS: Especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés reactive oxygen species

PLB's: Cuerpos parecidos a protocormos, por sus siglas en inglés protocorm like bodies

RAM: Meristemo apical radicular, por sus siglas en inglés root apical meristem

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres

ANA: Ácido α -naftalenacético

Kin: Kinetina (6-Furfurilaminopurina)

AC: Agua de coco (endospermo líquido de coco)

ee: Error estándar

1. RESUMEN.

Prosthechea cochleata (L.) W.E.Higgins 1997 (Orchidaceae), tiene una distribución Neotropical, la cual es a menudo descrita en la literatura como una especie común, sin embargo actualmente se encuentra extremadamente escasa en muchas regiones donde anteriormente se encontraba en mayor densidad. Está incluida en el Apéndice II de la CITES y citada en peligro en el Florida's Regulated Plant Index. La pérdida de individuos de esta especie se debe principalmente al saqueo para venta ilegal como planta de ornato, la destrucción del hábitat por cambio de uso de suelo, al ataque por plagas fitófagas, la baja tasa de germinación de sus semillas, así como los efectos del cambio climático. A esto se adiciona que los sistemas de propagación tradicionales no son suficientes para asegurar su conservación y la demanda del mercado. El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) se ha propuesto como una alternativa efectiva para la propagación de muchas especies incluyendo las orquídeas, muchas de las cuales han sido propagadas *in vitro* a través del cultivo de explantes somáticos o cuando ha sido posible por la germinación de sus semillas por el aporte de la variabilidad genética a sus poblaciones. En el presente estudio se exploró la germinación de semillas, así como el cultivo de tallos de plántulas germinadas *in vitro*. Semillas maduras de *P. cochleata* fueron germinadas asépticamente en los medios

de cultivo MS 50/100 y KC, con o sin Agua de Coco (AC) (0, 10, 20 y 30% v/v), cultivadas bajo fotoperiodo 16 h luz, 8 h oscuridad, así como en oscuridad. La germinación ocurrió solamente bajo fotoperiodo, y con mayor porcentaje (12%) en medio MS 50/100 sin AC. Un segundo lote de semillas fue germinado y las plántulas de siete meses de edad con una altura promedio de 2.4 ± 0.35 cm fueron disectadas para obtener de tres tipos de explantes (Hoja, Tallo y Raíz) que fueron cultivados en medio MS 50/100 con ANA/Kin en las siguientes concentraciones y combinaciones 0/0, 0/0.5, 0/1, 0.1/0, 0.5/0, 0.5/0.5, 1/0 y 1/0.5 mg/L. Adicionalmente en los explantes de Hoja y Raíz se probaron las concentraciones 0.1/0.5, 0.1/1, 0.5/1 y 1/1. Al cabo de 16 semanas los tallos en 0.5/0 mg/L, generaron el mayor número de brotes por explante, vía directa, 2.55 ± 0.62 , obteniendo un total de 313 brotes a partir de 135 de los explantes de tallo iniciales, el resto de los explantes de tallo (25) no tuvieron respuesta alguna. En la aclimatización en invernadero se obtuvo una supervivencia de 86% a las 4 semanas en invernadero.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Biodiversidad

La biodiversidad se entiende como el grado de variación entre los organismos vivos y los complejos ecológicos en los que ocurren (Figura 1), es decir comprende la diversidad dentro de cada especie, entre especies y entre los ecosistemas que habitan (CONABIO 2000).



Figura 1. Rangos que abarca el concepto de biodiversidad. Modificado de CONABIO, (2000).

Toda esta biodiversidad se encuentra distribuida en el mundo, pero no de manera proporcional, ya que algunas regiones presentan mayor biodiversidad que otras y dada la división del territorio en países, podemos hablar de la existencia de países megadiversos. En el mundo son 17 los países megadiversos que albergan del 65 al 70% de la diversidad

global, por mencionar algunos, México, Brasil, Indonesia, Colombia, China. El conjunto de los 17 países megadiversos representan un 10% de todos los países y por la combinación de sus especies se obtiene la máxima diversidad biológica, tanto en número de especies, diversidad genética y de ecosistemas (Llorente & Ocegueda, 2008).

2.2 México país megadiverso

México ocupa el cuarto lugar entre la lista de países megadiversos y contiene del 10-12% de especies del mundo hasta ahora descritas (Espinosa *et al.*, 2008). La gran diversidad del país se puede explicar debido a su compleja historia evolutiva, accidentada topografía compuesta de múltiples sistemas montañosos (Sierras Madre y Faja Volcánica Transmexicana), ubicación latitudinal en la región tropical y zona de contacto entre la región neotropical y neártica, así como su contacto tanto al este y oeste con mares, todo esto contribuyendo a la obtención de un patrón muy diverso de condiciones ambientales que han permitido el desarrollo de un gran número de especies, 180,000 a 216,000 aproximadamente, finalmente otro aspecto que ha contribuido a la riqueza de especies es la domesticación de plantas y animales (Espinosa *et al.*, 2008).

En cuanto a la diversidad vegetal, México ocupa el quinto lugar en plantas vasculares, superado por Colombia, China, Indonesia y Brasil, con 23,424 especies de plantas vasculares (Cuadro 1). El 93% de éstas (21,841) se encuentran clasificadas dentro de la división Magnoliophyta de las cuales aproximadamente el 50% son endémicas del país y se encuentran distribuidas en 53 órdenes, 247 familias y 2,685 géneros (Villaseñor, 2004, Villaseñor & Ortiz, 2014).

A las angiospermas se les ha dividido en dos clases: monocotiledóneas (Liliopsida) y dicotiledóneas (Magnoliopsida). Las monocotiledóneas (Liliopsida) son una clase de plantas que se incluye dentro de la división Magnoliophyta, en México, esta clase incluye un total de 39 familias, dentro de las cuales se distribuyen 546 géneros y 4,530 especies, esto es aproximadamente un 20% del total de las especies de toda la división (Villaseñor & Ortiz, 2014). La familia Orchidaceae se encuentra dentro de las 39 familias de las monocotiledóneas y constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial (Dressler, 2005).

Cuadro 1. Biodiversidad de México con respecto a otros países megadiversos (Llorente & Ocegueda, 2008).

Continente	País	Superficie (km ²)	Plantas vasculares	Mamíferos	Aves	Reptiles	Anfibios
América	México	1 972 544	23 424	535	1 107	804	361
	Perú	1 285 210	17 144	441	1 781	298	420
	Brasil	8 511 965	56 215	578	1 712	630	779
	Colombia	1 141 748	48 000	456	1 815	520	634
	Ecuador	283 561	21 000	271	1 559	374	462
	Venezuela	912 050	21 073	353	1 392	293	315
África	Congo	2 344 000	6 000	166	597	268	216
	Madagascar	587 045	9 505	165	262	300	234
Asia	Indonesia	1 916 600	29 375	667	1 604	511	300
	China	9 561 000	32 200	502	1 221	387	334
Oceanía	Australia	7 686 810	15 638	376	851	880	224

2.3 Familia Orchidaceae

Las orquídeas tienen una distribución muy amplia pero la mayoría de sus ejemplares se concentra en los trópicos. En México han sido registradas alrededor de 1,260 especies y 170 géneros de orquídeas, donde se estima que alrededor del 40% de las orquídeas mexicanas son endémicas (Salazar, 2009).

Dependiendo del lugar en el que crecen las orquídeas se pueden describir orquídeas epífitas, terrestres, litófitas o rupícolas; las orquídeas epífitas son plantas que crecen sobre las ramas y troncos de los árboles como lo son *Stanhopea tigrina*, *Barkeria uniflora*, las cuales obtienen los nutrientes y agua del aire, agua de lluvia y desechos de la corteza de los árboles; las terrestres crecen a nivel del suelo o de someras acumulaciones de humus, por ejemplo *Dichromanthus aurantiacus* y *Bletia urbana*; y las litófitas o rupícolas crecen sobre rocas, las cuales le dan soporte para su desarrollo, como *Dendrobium lingüiforme*, *Cypripedium irapeanum*, por mencionar algunas..

Existen orquídeas cuyo crecimiento es monopodial, es decir crecen hacia arriba a partir de un tallo único a veces ramificado, o simpodial, que crecen lateralmente y producen brotes foliosos a lo largo del rizoma; en el primer caso algunos géneros que presentan este tipo de crecimiento son: *Vanda*, *Phalaenopsis*, *Aerides*, *Aerangis*, entre otros, mientras que entre las orquídeas de crecimiento simpodial se encuentran *Prosthechea*, *Laelia*, *Encyclia*, por mencionar algunos ejemplos. Aquellas orquídeas de crecimiento simpodial presentan estructuras muy características denominadas pseudobulbos, éstos son tallos engrosados

que se van desarrollando a partir del rizoma y son órganos que permiten el transporte y almacenaje de agua y minerales (Téllez & Flores, 2007).

Una de las estructuras de las orquídeas que sin lugar a duda es de las más atractivas a la vista del hombre así como para sus polinizadores son las flores, que presentan simetría bilateral, su perianto está formado por tres sépalos y tres pétalos, a uno de estos últimos se le conoce como labelo (pétalo inferior) el cual generalmente suele ser diferente en tamaño, forma y color comparado con los otros dos pétalos (laterales). En su mayoría son plantas con flores hermafroditas, es decir la misma flor presenta ambos géneros, pero también existen casos de orquídeas unisexuadas, en las que la planta lleva a la vez flores masculinas y femeninas, como es el caso de los géneros *Catasetum*, *Mormodes* y *Cycnoches*. Una característica peculiar de su sistema reproductor es la fusión del estilo del pistilo y los filamentos de los estambres en una estructura denominada columna o ginostema, en el extremo de la columna se encuentra la antera (a veces más de una) que lleva los polinios (masas cerosas que agrupan los granos de polen); debajo de la antera se encuentra la cavidad estigmática, separada de la porción masculina por un tejido denominado rostelo (Bellone, 2006).

La polinización ocurre cuando los polinios se introducen en la cavidad estigmática ya sea por algún polinizador natural o por polinización artificial, una vez que se da la fecundación, el ovario crece en grosor y longitud hasta formar una cápsula (fruto) en la cual se desarrollan las semillas (Bellone, 2006). Las cápsulas están constituidas por seis válvulas, cada una de estas formada por tres capas principales de tejido: exocarpio, mesocarpio y endocarpio. El exocarpio consta una sola capa de células; el mesocarpio o parte media de la pared del fruto, tiene múltiples capas celulares (parénquima) y el endocarpio, capa más interna, consiste en unas pocas capas celulares (Dirks-Mulder, *et al.*, 2019).

2.4 Semillas, germinación y desarrollo embrionario

Las semillas de las orquídeas son muy numerosas, dependiendo de la especie, mil a cuatro millones por fruto, son de tamaño peculiarmente pequeño, 0.18 mm a 3.85 mm de largo por 0.09 mm a 0.27 mm de ancho y con un peso de 0.3 µg a 14 µg. Las proporciones tan pequeñas de las semillas se atribuyen a la ausencia de endospermo, cotiledón, (aunque en algunos géneros como *Arundina*, *Bletilla* y *Dendrochilum*, se presenta un cotiledón rudimentario), radícula y que el embrión consiste en pocas células, en las cuales se almacenan algunos lípidos y proteínas (Baskin & Baskin, 2014; Téllez & Flores, 2007).

El endospermo es un tejido nutritivo $3n$ que tiene origen en la fusión de una célula con dos núcleos polares con una célula espermática, posteriormente el núcleo triploide se divide formando una supercélula multinucleada que se vuelve multicelular tras la citocinesis. Este tejido formado es el endospermo y es un almacén de nutrientes (lípidos, proteínas y carbohidratos) que serán utilizados durante la germinación (Campbell & Reece, 2007). El endospermo es un tejido que se encuentra ausente en las semillas de las orquídeas por lo cual es condición necesaria para su germinación, la obtención de nutrientes (principalmente carbohidratos) por una fuente externa, en condiciones naturales este abastecimiento se da a través de una asociación micorrízica, es decir la asociación con algún hongo.

Durante la germinación el embrión se hincha hasta romper la cubierta de la semilla, sus células se dividen y producen una estructura globular llamada protocormo, algunas células epidérmicas dan lugar a la generación de rizoides, después de algunos días (dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento) el protocormo adquiere polarización, en el lado apical se da el crecimiento de un primordio foliar, mientras que en el lado basal se desarrolla el primordio radicular (Baskin & Baskin, 2014).

Los embriones de algunas orquídeas no producen un protocormo a menos que sean asistidos por la adición de azúcares exógenos o la asociación micorrízica con un hongo específico; sin embargo, algunos otros detienen su crecimiento en la fase de protocormo (o el crecimiento es muy lento) hasta que una fuente de carbono sea suministrada. El hongo coloniza al embrión a través de las células muertas del suspensor o del protocormo a través de los rizoides. Si la asociación micorrízica se desarrolla entre el protocormo y el hongo, las células colonizadas serán aquellas de las dos capas epidérmicas basales del protocormo, la capa más externa será la que contenga las hifas activas, mientras que la capa interna contendrá las hifas que serán digeridas por la orquídea para la adquisición de los nutrientes. Cuando las hifas son digeridas vía enzimática por la orquídea, se absorben vitaminas, aminoácidos, hormonas, proteínas, ácidos nucleicos y minerales dentro de las células de la orquídea, pero principalmente serán la principal fuente de azúcares. Aparte de estas moléculas, las hifas contienen enzimas capaces de descomponer el almidón en las células de la orquídea; dentro de la mezcla de compuestos que liberan las hifas se encuentran también compuestos como la trehalosa y el manitol, siendo el primero un estimulante para la germinación y el segundo un promotor de crecimiento para la plántula (Baskin & Baskin, 2014).

Se ha mencionado que el componente más importante que el hongo le transfiere a las células de la orquídea son los carbohidratos y que es un componente importante para la germinación y desarrollo de las plántulas. Su importancia radica en que, en la presencia de sacarosa, las reservas lipídicas que contienen los embriones pueden ser hidrolizados, los cuerpos lipídicos resultantes se transforman en almidón, macromolécula compuesta por varias unidades de glucosa, esta última, importante en la constitución de diferentes tejidos vegetales. Sin la presencia de sacarosa o algún otro azúcar, la hidrólisis lipídica no puede llevarse a cabo y por lo tanto las reservas de los embriones de las orquídeas no pueden ser metabolizadas. El género de hongos más común que promueve la germinación y desarrollo de los protocormos es el anamorfo *Rhizoctonia*, otros géneros de basidiomicetos implicados en las asociaciones simbióticas con orquídeas específicas son *Armillaria*, *Ceratobasidium*, *Corticium*, *Fomes* entre otros (Baskin & Baskin, 2014).

La baja tasa de germinación de las semillas de las orquídeas en condiciones naturales (1-5%, 2-3% dependiendo el autor) se relaciona con su obligatoria asociación micorrízica (Lee *et al.*, 2010; Mayo *et al.*, 2010), de ahí que su reclutamiento sea muy bajo en condiciones naturales. Aunado a las características morfológicas tan atractivas de las orquídeas han hecho de esta familia un grupo de plantas de gran importancia económica por su venta como plantas de ornato con gran amenaza de pérdida, siendo principalmente comercializadas en la Ciudad y Estado de México algunas especies de los géneros *Laelia*, *Epidendrum*, *Maxillaria*, *Trichocentrum* y *Prosthechea* (Munguía *et al.*, 2010), lo que ha provocado un exceso de extracción de las mismas de su hábitat natural poniéndolas en peligro de extinción.

2.5 Género *Prosthechea* (Knowles & Westc) y especie de estudio

El género *Prosthechea* es un taxón esencialmente centroamericano que se constituye de 100 a 118 especies (Higgins, 2003; The Plant List, 2013), en México existen cerca de 46 (Téllez, 2011). Las orquídeas pertenecientes a este género son plantas epífitas, ocasionalmente terrestres, rara vez formando un rizoma evidente, los pseudobulbos están constituidos por un entrenudo, agregados o separados; pueden tener hasta cuatro hojas, en el ápice del pseudobulbo, presentan inflorescencias apicales, racemosas o paniculadas, bráctea espatácea evidente; ovario triquetro; flores pocas a numerosas, ocasionalmente vistosas, resupinadas o no resupinadas, a veces cóncavas en posición natural; sépalos y pétalos similares entre sí; labelo unido a la columna en su tercio basal, entero o trilobado;

columna recta, con tres dientes subiguales; cuatro polinios obovoides, subiguales; cápsula triquetra (García *et al.*, 2003).

Entre las 46 especies reconocidas para México se encuentra *Prosthechea cochleata*, la cual tiene una distribución en la región Neotropical: México, Guatemala, Sur de Florida, Belice, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Colombia, Venezuela, Costa Rica, Panamá, Puerto Rico, Jamaica y Cuba. En México la podemos encontrar en los estados de Chiapas, Hidalgo, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Tabasco, Querétaro, Campeche y Veracruz (García *et al.*, 2003).

Su clasificación taxonómica es la siguiente (García *et al.*, 2003):

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laeliinae

Género: *Prosthechea*

Especie: *Prosthechea cochleata* (L.) W.E.Higgins 1997

Sinónimos: *Encyclia cochleata*, *Anacheilium cochleatum*, *Epidendrum cochleatum*

Acorde a lo descrito por García *et al.*, 2003, son plantas herbáceas epífitas o litófitas erectas de aproximadamente de 17 a 40 cm de altura; con pseudobulbos ligeramente separados por un corto rizoma, de forma ovoide a elipsoide, a veces algo pedicelados, cubiertos en su tercio basal por brácteas papiráceas de 1 a 7 cm de largo, grisáceas, obtusas; presenta de 1 a 3 hojas oblongo-lanceoladas a linear-lanceoladas de 15-28 × 1.5-3.5 cm, agudas, subcoriáceas; inflorescencia erecta de hasta 30 cm de largo, en racimo, raramente paniculada, pedúnculo de 10-16 cm de largo, base con 1 o 2 espatas papiráceas; flores de 3 a 6 sucesivas, no resupinadas, llegando a estar todas abiertas a la vez, a veces con cápsulas presentes; sépalos y pétalos similares angostamente lanceolados, acuminados, colgando y con una ligera torsión, los sépalos laterales oblicuos 25-35 × 3-6 mm; labelo

profundo, orbiculado, cóncavo, amarillo-verdoso y la mitad apical de color púrpura en la cara externa, 1.2 a 2.3 × 1.5-3 mm, la base blanquecina marcado con venas púrpuras conspicuas, ápice abruptamente mucronado; callo oblongo-cuadrado; columna corta, 8-9 mm de largo, subtrígona que va de color verde a verde amarillento con algunas manchas de color púrpura cerca de la base, el ápice de la columna con 3 dientes carnosos, el medio cónico redondeado y los laterales ligeramente más largos, triangulares y obtusos; presenta 1 antera, la cual tiene 4 polinios, cápsulas 2-4 × 0.8-1.5 cm. Crece en el bosque de encino, de pino-encino, en el tropical subcaducifolio y caducifolio, sobre peñas en las laderas de los cerros, o bien dentro de las cañadas húmedas. La floración se da de octubre a marzo y la fructificación de noviembre a mayo (Figura 2).

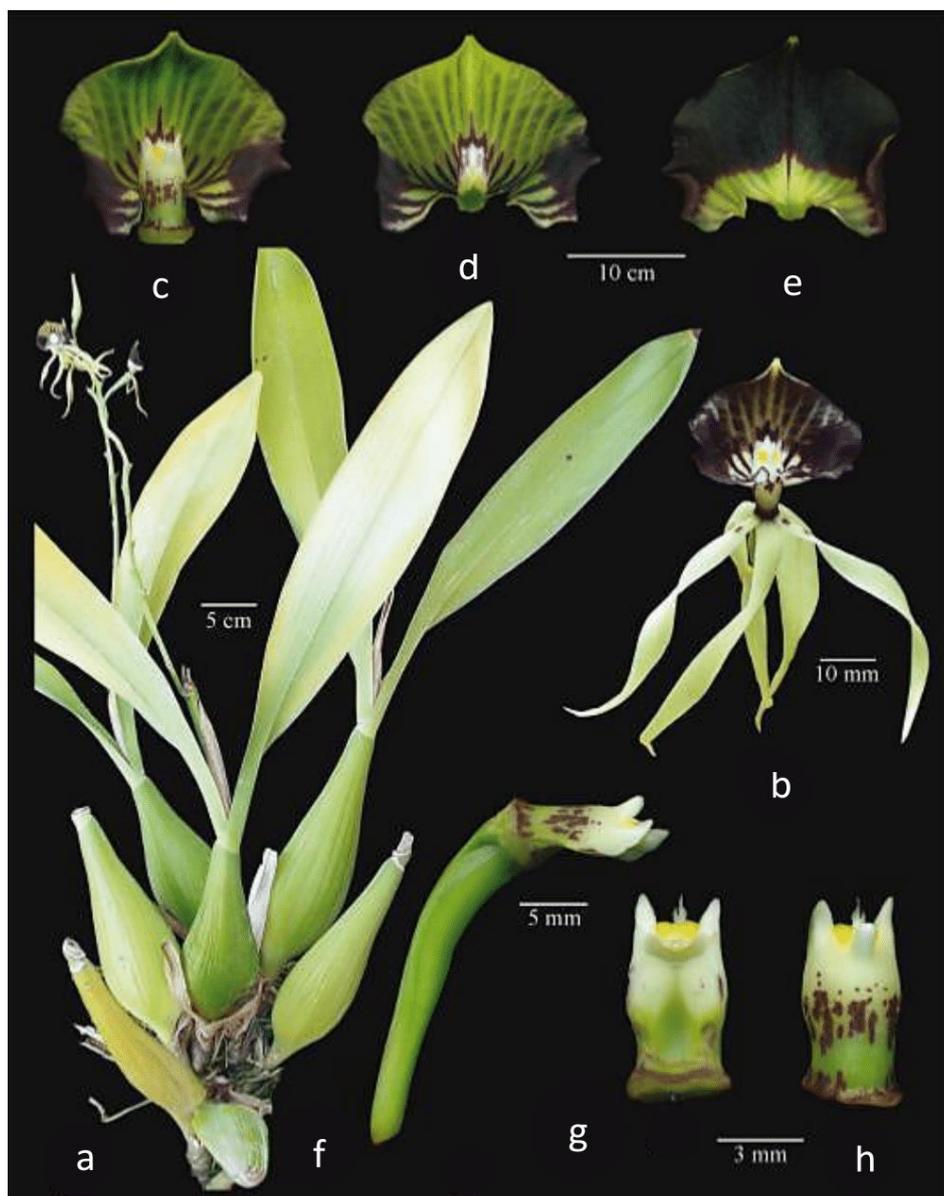


Figura 2. *Prosthechea cochleata*. a) Planta completa. b) Vista frontal de la flor. c) Labelo y columna, vista frontal. d) Labelo, vista frontal. e) Labelo, vista posterior. f) Con ovario-pedúnculo, vista lateral. g) Columna, vista frontal. h) Columna, vista posterior (tomado de Mó *et al.*, 2014).

Los géneros *Encyclia* y *Prosthechea* se dice que son polinizados por abejas y avispa, pues sus flores emiten esencias que resultan atractivas para este tipo de polinizadores. En *P. cochleata*, su flor puede o no emitir alguna esencia (Del Mazo & Damon, 2006, reportan la ausencia de compuestos aromáticos en individuos de la especie en el sureste de México, por el contrario Ray, *et al.*, 2018, detectan 8 compuestos aromáticos en individuos de la especie en Florida) y a diferencia de otras especies del mismo género, no ha sido vista o reportada esta clase de polinizador, sugiriendo sea diurno, pues la fragancia en las flores decae por las tardes. En la literatura se describe que esta especie, junto con otras del género, poseen cristales glucósidos flavonoides que hacen a las flores más visibles para los insectos polinizadores en áreas oscuras pues emiten fluorescencia bajo luz ultravioleta. Aunque se desconozca el polinizador, se sabe que *P. cochleata* var *triandra*, tiene en la columna una modificación estructural de dos anteras adicionales (teniendo un total de 3) que permiten a los tubos de polen eludir el rostelo lo que resulta en la autopolinización (Del Mazo & Damon, 2006; Higgins, 2003).

2.6 Importancia de la especie y problemática que enfrenta.

Aparte del posible rol ecológico planta-polinizador, esta especie fue en la medicina tradicional, y en la cultura prehispánica, a través de la decocción de los pseudobulbos, utilizada como expectorante y antiasmático (Beltrán & Martínez, 1996). De la Fuente & Staines, (1998) mencionaron el uso de esta orquídea para la preparación de un pegamento en polvo, así como la preparación de aditivos para pinturas La flor de *P. cochleata* además es la flor nacional de Belice, es decir también tiene importancia cultural para ese país (Embajada de Belice, 2013).

La especie también tiene importancia como planta ornamental no solo por la apariencia de sus flores, sino también a que llegan a mantener la floración hasta por cuatro meses. Lamentablemente, las plantas comercializadas son aquellas, producto del comercio ilegal, y a pesar de que existen tratados y leyes que regulan el comercio de especies vegetales, éstas no se cumplen y no existe una alternativa comercial para su compra legal.

El comercio ilegal de la vida silvestre se encuentra entre las tres principales actividades relacionadas con la extinción de las especies junto con la pérdida de hábitat y los efectos de las especies invasoras y se calcula que los ingresos anuales llegan hasta los 10 mil millones de dólares a nivel global (CCA, 2005). México tiene una gran participación tanto

como proveedor del tráfico ilegal como consumidor. En el periodo que va del 2001 al 2005 la PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente) realizó el decomiso-aseguramiento de aproximadamente 500 mil especímenes, en los que se incluyen especies animales y vegetales, extraídos ilegalmente. La información sobre la extracción ilegal de flora, como un grupo, es sumamente escasa y los datos que existen están dispersos y se enfocan fundamentalmente en algunas plantas de importancia ornamental. Sin embargo se conoce que existen tres grupos principales que a lo largo de la historia han sido muy vulnerables a la extracción ilegal los cuales son: las cícadas (Zamiaceae), las orquídeas (Orchidaceae) y los cactus (Cactaceae). Para la familia Orchidaceae se tiene una estimación realizada para el periodo de 1993-1996 que sugiere que el número de plantas comercializadas ilegalmente fue de 9 a 12 millones, mientras que por comercio legal fue de 0.15 millones de plantas (Naranjo & Dirzo, 2009).

Tal es el caso de dos de los mercados de flores más grandes de la Ciudad de México y Estado de México (el de Jamaica y el de Tenancingo respectivamente), en los que se registró en el año 2007 el comercio ilegal de 22 especies silvestres de orquídeas, entre las cuales se encontraba *P. cochleata* (Munguía *et al.*, 2010). Así mismo otro estudio realizado en un mercado de Xalapa, Veracruz, arrojó una cifra de 167 especies de orquídeas comercializadas de manera ilegal con un total de 7,100 individuos registrados a lo largo de dos años. Entre estas orquídeas, se contaron 119 plantas de *P. cochleata* (un 16% con respecto al total) que eran vendidas de los 5 a los 40 pesos por planta (Flores & Valencia, 2007). Si bien el 16 % podría parecer un bajo porcentaje hay que tener en cuenta que el estudio está enfocado en la venta de un solo mercado del país y que si dividiéramos el total de individuos registrados entre el número de especies a las que pertenecen se tendría en promedio 42 individuos por especie, por lo tanto los individuos registrados para *P. cochleata* son casi el triple del promedio por especie, por lo cual se puede considerar como una cifra significativa.

Esto documenta que a pesar de que México forma parte de tratados internacionales y tiene leyes nacionales que tienen como finalidad la protección y regulación legal de la biodiversidad, el comercio ilegal de plantas silvestres sigue siendo frecuente y es reconocido como una de las amenazas más importantes para la biodiversidad, lo que indica que estas medidas de protección han sido insuficientes y se necesita con urgencia una mejor comprensión de la magnitud de las consecuencias que el comercio ilegal trae consigo (Flores & Valencia, 2007).

Además del saqueo ilegal que ejerce una fuerte presión sobre la especie, ésta presenta otro problema que repercute en su supervivencia y es el ataque por plagas. Un estudio realizado en Florida, Estados Unidos, mostró que *P. cochleata*, en su medio natural, resultó ser una de las especies más vulnerables a la infección por *Diapsis boisduvalii* (hemíptero, escama acorazada), con un porcentaje de infección de 5.8% (Ray *et al.*, 2012). Otro estudio realizado más recientemente, también en Florida, mostró un porcentaje de infección de 13.5 % por *D. boisduvalii*, además del 15.2 % de infección causado por *Pseudococcus microcirculus* (hemíptero, conocido como cochinilla de orquídeas) (Gutting *et al.*, 2015). Ambas son consideradas como graves plagas fitófagas de orquídeas, pues absorben los nutrientes de los tejidos reduciendo así el vigor de las plantas, llegando a causar la muerte de las mismas. Las cochinillas, en particular, también secretan cantidades de una sustancia dulce que sirven como fuente de alimento para las hormigas; además se presenta fumagina, un hongo que dificulta la fotosíntesis mediante el recubrimiento de superficies de las hojas (Gutting *et al.*, 2015).

Estas plagas son un factor que suma en la vulnerabilidad de las orquídeas en peligro de extinción que ya se encuentran en riesgo por varias causas como lo son: la dificultad reproductiva, el aprovechamiento no sustentable, el comercio ilegal, la degradación de ecosistemas y por lo tanto pérdida de su hábitat natural, sea por tala legal o ilegal o cambio de uso de suelo que siempre implica tala y deforestación.

A tal punto que *P. cochleata*, a menudo descrita como una especie común en la literatura, actualmente se encuentra extremadamente escasa en muchas regiones donde anteriormente se encontraba en mayor densidad, tal es el caso de la región del Soconusco, Chiapas, en la cual se encuentra restringida a fragmentos de bosque tropical y plantaciones de café por arriba de los 800 msnm (Del Mazo & Damon, 2006).

De igual manera se encuentra reportado para el sur de Florida en Estados Unidos, que *Prosthechea cochleata*, var *triandra* fue alguna vez una especie común, es decir abundante en esta región, sin embargo ya no lo es más debido, entre otros factores, a su colecta ilegal (Hammer, 1984)

2.7 Protección de especies silvestres

La Norma Oficial Mexicana NOM-059 (SEMARNAT, 2010), enlista un total de 986 especies de plantas en alguna categoría de riesgo, (protección especial, amenazada, en peligro de extinción y extinta en el medio silvestre). En esta Norma hay un total de 187 especies de orquídeas entre las cuales se encuentran seis del género *Prosthechea*, de las cuales cinco en protección especial y una amenazada.

Si bien la especie en estudio no se encuentra en esta norma, un mayor conocimiento de la propagación de la misma podría revelar información acerca de estrategias eficientes de propagación para ésta y para otras especies, no solo del mismo género, incluidas en la norma.

A pesar de que *Prosthechea cochleata* no se encuentra en la NOM-059 (SEMARNAT, 2010), debido a su falta de actualización y evidencia demográfica, si se encuentra en el Apéndice II de CITES, donde está incluida toda la familia Orchidaceae, aquí se enlistan las especies que no necesariamente se encuentran en peligro de extinción, pero su comercio debe controlarse a fin de evitar una utilización incompatible con su supervivencia.

En la lista roja de flora venezolana la especie está catalogada en Lr/Nt (igual a bajo riesgo o casi amenazada) y en el sitio Nature Serve Conservation status se encuentra en los rangos G4 (aparentemente segura) a nivel global, pero a nivel estatal se encuentra en la categoría S2 (en peligro) (Krupnick *et al.*, 2013; NatureServe, 2020) y en peligro en el índice de plantas reguladas de Florida (Florida's Regulated Plant Index).

Para asegurar su conservación una estrategia que puede ser empleada es el desarrollo de protocolos eficientes de propagación y que éstos a su vez permitan su uso sustentable. Un mayor conocimiento sobre el Cultivo de Tejidos Vegetales podría contribuir al aprovechamiento de una manera más racional de las especies que se requieren por su potencial ornamental, así como para la conservación de las especies que se encuentran bajo el riesgo de desaparecer (Menéndez *et al.*, 2011).

2.8 El uso del Cultivo de Tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), es la ciencia de crecer células vegetales, tejidos u órganos aislados de la planta madre, en medios artificiales (George *et al.*, 2008). Es una parte de la biotecnología en la cual una porción de una planta (explante, desde una célula hasta un órgano) se cultiva, bajo condiciones asépticas, en un medio que le confiera los

factores químicos y físicos apropiados para que el explante exprese su potencial intrínseco o inducido que le permita regenerar tejidos, órganos o una planta completa, esta capacidad de regeneración es llamada totipotencia (Roca, 1993; Baran & Ghosh, 2005).

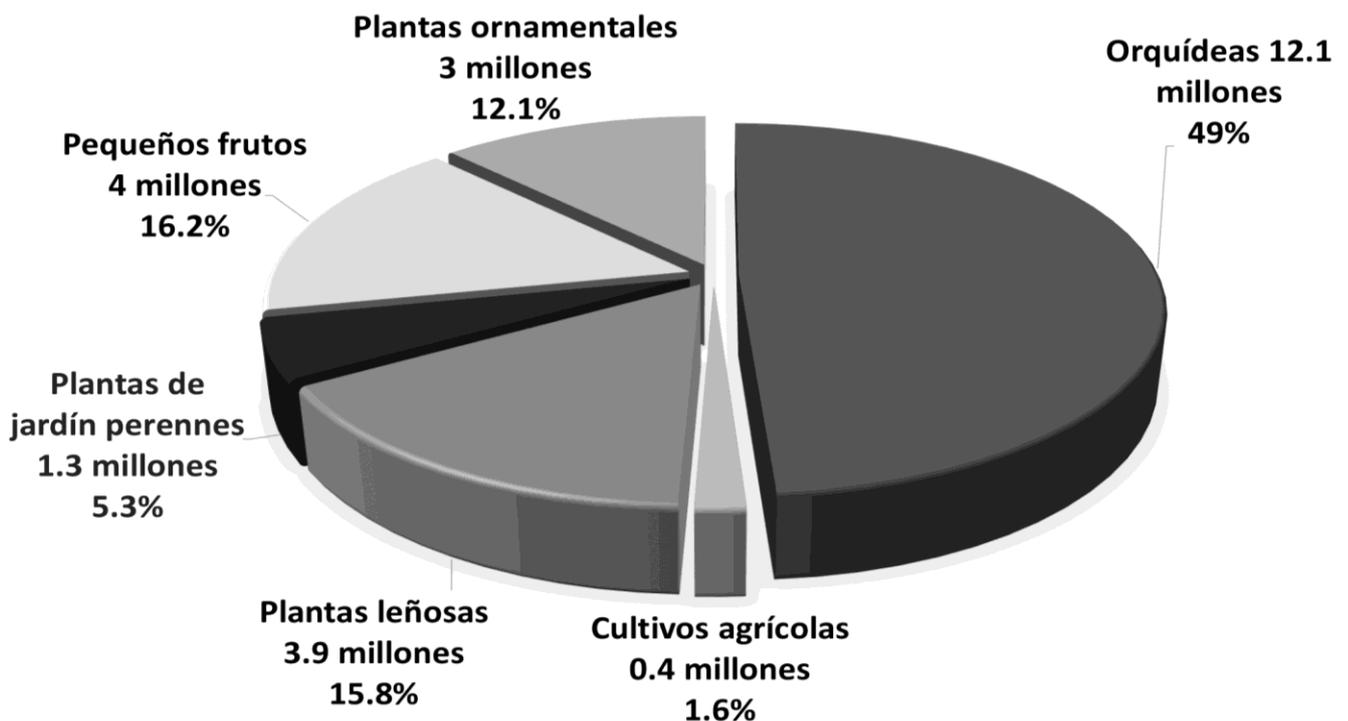
Millones de plantas son propagadas a través del cultivo de tejidos vegetales (Cuadro 2), se estima que en el año 2003, 922 millones de plantas fueron producidas por este medio en todo el mundo. Principalmente se propagan plantas con valor ornamental, seguido de árboles frutales, pequeños frutos y vegetales, plantas leñosas, otras variantes de uso agrícola (Purohit, 2013). En Alemania en el año 2000, la producción de plantas *in vitro*, supero los 24 millones de plantas, distribuidas en las categorías antes mencionadas (Gráfica 1).

Cuadro 2. Principales plantas propagadas *in vitro*, en India, Estados Unidos, Alemania y México.

Pais	Número de compañías	Número de plantas propagadas por este medio (en millones de plantas)	Cultivos	Número de plantas por cultivo (en millones de plantas)	Uso	Referencia	
India	200 (2016)	350 Capacidad productiva de 500	Banana	-	Comestibles	Departamento de biotecnología India, 2016	
			Papaya	-			
			Papa	-			
			Caña de azúcar	-			
			Piña	-			
			Manzana	-			
			Fresa	-			
			Vainilla	-			
			Cardamomo	-			
			Dátiles	-			
			<i>Gerbera</i>	-			Ornamentales
			<i>Anthurium</i>	-			
			<i>Lillium</i>	-			
			Orquídeas	-			
Bambo	-						
Estados Unidos	95-100 (1993)	75 Capacidad productiva de 150	<i>Syngonium</i>	15	Ornamentales	Zimmerman & Barnhill, 1993	
			<i>Gerbera</i>	4			
			<i>Spathiphyllum</i>	6			
			Helechos	5			
			<i>Saintpaulia</i>	1.5			
			<i>Dieffenbachia</i>	3			
			<i>Philodendron</i>	2			
			<i>Ficus</i>	1			
			<i>Lilium</i>	2			
			<i>Rhododendron</i>	10.5			
			<i>Rosa</i>	0.2			
			Orquídeas	-			

			Zarzas (frambuesa, zarzamora)	1.17 (1985)	Comestibles	
Alemania	27-30 (2006)	48 (2004)	<i>Phalaenopsis</i> <i>Rhododendron</i> <i>Gentiana</i> Bambo <i>Dionaea</i> <i>Anthurium</i> <i>Fragaria</i>	31 1 1.9 0.15 0.175 0.9 3.9 (2004)	Ornamentales	Winkelmann <i>et al.</i> , 2006
México Laboratorio Agromod	-	12	<i>Agave tequilana</i> Banana <i>Coffea</i> <i>Anthurium</i>	- - - -	Comestibles y elaboración de fibras Ornamentales	Navarro, 2007

Los datos numéricos representan una aproximación. (-) Sin datos.



Gráfica 1. Plantas propagadas *in vitro* en Alemania en el año 2000 (modificado de Preil, 2003).

El CTV ofrece la ventaja de multiplicar plantas a mayores escalas y en un menor espacio y tiempo que los cultivos tradicionales, permiten la producción de plantas con sanidad controlada, el cultivo independientemente de las condiciones ambientales, el obtener especies no domesticadas o difíciles de generar en campo, la conservación de germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción, el mejoramiento genético y la obtención de plantas transformadas genéticamente, la producción de metabolitos secundarios provenientes de plantas de crecimiento lento o de difícil obtención por extracción o síntesis en laboratorio (Llorente, 2000).

No obstante los múltiples beneficios de la propagación por esta vía, se presentan también algunas desventajas como lo son la presencia de cambios en la anatomía y fisiología de las plantas regeneradas comparadas con aquellas propagadas de manera tradicional. De acuerdo con George *et al.*, (2008) estas modificaciones son:

- Raíces; epidermis uniseriada, escaso desarrollo del sistema radicular con pocos, cortos o ausentes pelos radiculares, corteza amplia irregular que presenta células individuales hipertrofiadas, numerosos espacios intercelulares, haces vasculares estrechos, primarios, de desarrollo inmaduro, actividad limitada del cámbium secundario.
- Tallos; de diámetro pequeño, limitado desarrollo de la corteza, poco colénquima, pocas fibras de esclerénquima, haces vasculares pobremente desarrollados, baja actividad del cámbium, con un gran número de granos de almidón en haces vasculares en etapas tempranas, desarrollo limitado de la médula, las paredes celulares delgadas.
- Hojas; pequeñas, frágiles e hiperhidratadas, paredes celulares delgadas de forma irregular en la epidermis, cutícula delgada y discontinua, células guarda irregulares con pared celular delgada, estomas alargados que se mantienen continuamente abiertos, mesófilo esponjoso irregular, tejido de empalizada reducido, parénquima esponjoso altamente vacuolado con grandes espacios intercelulares, haces vasculares inmaduros y de desarrollo limitado, baja cantidad de clorofila, cloroplastos anormales no funcionales, limitada formación de grana, estroma abundante.

Estas anormalidades fisiológicas y anatómicas paulatinamente irán desapareciendo tras el proceso de aclimatización de las plantas.

De acuerdo a Read & Preece (2014), el CTV consta de 5 etapas:

- Etapa 0 Plantas madre: Las características generales del material vegetal inicial influyen en el éxito del proceso de propagación. Incluye la selección de la planta madre o stock inicial y su acondicionamiento a algunos factores físicos como la luz y temperatura, es posible que se requiera la aplicación de algunas sustancias como fertilizantes, plaguicidas, bactericidas, fungicidas entre otras y también pueden

aplicarse algunos tratamientos precultivo como lo son reguladores de crecimiento vegetal (RCV).

- Etapa I Establecimiento: en esta etapa se selecciona el explante a establecer, refiriéndose al establecimiento eficiente de este en el medio de cultivo. Incluye la selección del medio de cultivo a utilizar, su preparación y esterilización, así como desinfección del explante con el empleo de agentes químicos, que permitan la muerte o reducción de organismos como bacterias, hongos y algunos arácnidos o insectos pequeños que puedan estar en el explante.

Entre las sustancias más comúnmente empleadas se encuentran el hipoclorito de calcio o sodio, etanol, peróxido de hidrógeno, detergentes y jabones. El hipoclorito de sodio es una sal (altamente oxidativa) que en contacto con el agua se disocia en ácido hipocloroso e hidróxido de sodio siendo la siguiente la reacción química: $\text{NaClO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HClO} + \text{NaOH}$. Las propiedades antimicrobianas son debidas primariamente a: 1) la habilidad del hipoclorito de sodio de oxidar e hidrolizar las proteínas celulares, 2) la liberación de cloro, para formar ácido hipocloroso, y 3) a largo plazo, su habilidad osmótica de extraer líquidos fuera de las células (Sánchez *et al.*, 2009). El hipoclorito de sodio presenta actividad antimicrobiana con acción sobre sitios enzimáticos esenciales bacterianos promoviendo su inactivación irreversible (originada por iones hidroxilo y acción de cloraminación), esta inactivación enzimática puede observarse en la reacción de cloro con los grupos amino (NH_2 -) formando cloraminas, donde se sustituye el hidrógeno por el cloro, las cuales interfieren con el metabolismo celular y por otra parte la oxidación irreversible de grupos sulfhidrilos (SH) de enzimas bacterianas (Estrela *et al.*, 2002).

- Etapa II Multiplicación: Consiste en la inducción del explante con la finalidad de obtener brotes o embriones, mediante la adición de reguladores de crecimiento vegetal, sustancias orgánicas o algún compuesto o serie de compuestos de la formulación básica del medio de cultivo. Esta multiplicación puede suceder a través de tres vías, organogénesis directa o indirecta, embriogénesis directa o indirecta y activación de yemas preformadas.
- Etapa III Elongación y Enraizamiento: Si la vía de regeneración fue organogénesis, la meta será lograr la elongación y enraizamiento de los brotes generados en la etapa anterior para la obtención de plantas completas que puedan crecer posteriormente de manera *ex vitro*. Si la regeneración se dió por medio de embriogénesis somática en esta etapa se presentará la germinación de dichos embriones. Principalmente se emplean medios con auxinas y carbón activado puesto que se sabe que estos compuestos favorecen la rizogénesis, así como la

modificación de factores físicos como la luz (la incubación en periodos de oscuridad incrementa el éxito del enraizamiento). En algunas especies (herbáceas principalmente) el enraizamiento ocurre durante la Etapa II por lo cual no es necesario el subcultivo de las plántulas a medios de enraizamiento.

- Etapa IV Aclimatización: Es el paso de las plantas propagadas de manera *in vitro* a un ambiente *ex vitro*, en este paso es donde se puede llegar a tener la pérdida más grande de las plantas regeneradas, esto se debe a que como se estableció anteriormente, las plantas regeneradas *in vitro* tienden a presentar anomalías tanto fisiológicas como anatómicas que complican su adaptación al ambiente natural, es por eso que esta etapa debe realizarse de manera gradual de tal manera que las plantas puedan producir nuevas hojas y raíces que funcionen de manera normal. Los principales aspectos a tomar en cuenta en la aclimatización de las vitroplantas son:

- a) Humedad, las hojas que se forman *in vitro* no desarrollan el mismo mecanismo para regular la pérdida de agua que una planta que ha crecido en un lugar con una baja humedad ambiental dado que la humedad relativa dentro de los contenedores donde se propagan estas plantas puede llegar a estar cercana al 100%. Es por eso que la reducción de la humedad debe ser gradual y puede lograrse utilizando germinadores con tapa, macetas cubiertas por vasos transparentes o bolsas, siendo la meta reducir la transpiración. Las primeras hojas y raíces producidas de manera *ex vitro* tendrán una apariencia similar a las anteriores, sin embargo conforme más hojas y raíces nuevas se desarrollen, éstas serán similares morfológica y fisiológicamente a las de una planta crecida en invernadero o campo, adaptadas a una mayor intensidad de luz (en el caso de las hojas) y menor humedad relativa.
- b) Sustrato, en este caso el sustrato a elegir dependerá de la especie de planta a aclimatizar, sin embargo algunas de las características generales que debe tener son: buena capacidad de retención del agua adecuada para la especie, ser un sustrato poroso que permita el intercambio del aire, ser fácilmente humectable, proporcionar un buen anclaje de las raíces, tener el pH adecuado para la especie, estar libre de agentes patógenos y sustancias tóxicas

Uno de los problemas comúnmente presentados en los cultivos *in vitro* es la oxidación de los tejidos vegetales. Éste suele ser uno de los principales problemas, puesto que puede llevar a la muerte la totalidad del tejido vegetal. Ésta oxidación está dada por la generación

de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos (Azofeifa, 2009).

Existen múltiples estrategias para combatir los procesos de oxidación que conlleva al oscurecimiento y muerte de los explantes vegetales, entre los cuales se encuentran la disminución de las circunstancias que provocan o estimulan el estrés oxidativo en el explante, subcultivos frecuentes, cultivo en medio líquido, cultivo en baja luminosidad u oscuridad, la adición de antioxidantes al medio de cultivo, uso de adsorbentes como el carbón activado (detallado más adelante), entre otros (Azofeifa, 2009).

La descomposición de los ROS formados o la prevención de su formación por unión metálica o inhibición enzimática, son los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes, evitando de esta forma las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski 2008). Los antioxidantes incluyen agentes reductores, los cuales pueden remover oxígenos de moléculas e incluso de compuestos que actúan con mecanismos alternativos, previniendo el oscurecimiento de tejidos, ya que evitan la oxidación de fenoles y ayudan a una rápida remoción de las quinonas formadas (Azofeifa, 2009).

Entre los antioxidantes más utilizados se encuentran el ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido málico. Díaz *et al.* (2006) hicieron uso del ácido cítrico como antioxidante en una concentración de 50, 70 y 90 mg/L, siendo la de 50 mg/L la que más favoreció el crecimiento de las plantas de *Laelia lundii*.

El ácido ascórbico, interactúa enzimática y no enzimáticamente con los radicales de oxígeno y sus derivados (ROS), y es capaz de terminar con las reacciones en cadena de dichos radicales por desproporción a productos no tóxicos, además debido a que es medianamente electronegativo, éste puede aceptar electrones de un gran número de sustratos. El ácido ascórbico puede estar relacionado con la protección de las membranas celulares contra el daño oxidativo, particularmente como el resultado a la exposición de gases contaminantes (Davery *et al.*, 2002).

2.9 Medios de cultivo

Cuando se pretende propagar una planta por medio del cultivo *in vitro*, se deben considerar las necesidades físicas (luz, temperatura, pH, ambiente gaseoso) y químicas (elementos del sustrato) que la planta en un medio natural requiere, ya que se pretenden simular esas

condiciones *in vitro* (Boeri, 2015). De allí que la elección del medio de cultivo sea un aspecto importante a considerar, pues éste debe contener los compuestos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta.

Los medios de cultivo se componen básicamente de tres elementos: inorgánicos (sales minerales), orgánicos (vitaminas y aminoácidos) y una fuente de carbono. La composición de sales minerales está definida de manera específica para cada medio, en la que se incluyen macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) y microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Mo, Al, I y Fe), los primeros son requeridos en grandes cantidades para el desarrollo y crecimiento de la planta, mientras que los segundos se asimilan en cantidades traza. Dentro de los componentes orgánicos, sólo dos vitaminas son consideradas esenciales para el cultivo de células vegetales, tiamina (vitamina B1) y myoinositol, sin embargo otras vitaminas pueden ser agregadas al medio y esto va a depender de qué medio de cultivo se emplee y que explante o especie se propague. El aminoácido más frecuentemente usado es la glicina, en general los aminoácidos proveen de una fuente de nitrógeno de forma reducida. Las plantas regeneradas presentan *in vitro* pueden presentar una condición mixotrófica, lo que significa que obtienen energía a través del medio de cultivo y del proceso fotosintético, por lo cual se debe emplear en el medio una fuente de carbono que actuará como fuente energética además de incrementar el potencial osmótico del medio, entre las fuentes de carbono más empleadas se encuentran la sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, entre otras (Sarkar, 2009; Llorente, 2000).

Entre los medios más utilizados se encuentra el medio MS (Murashige & Skoog, 1962), este medio consiste de sales minerales, sacarosa como fuente de carbono y vitaminas (tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e inositol), es extensamente usado pues su empleo ha resultado eficiente para el cultivo de callos, cultivo de células en suspensión en medios líquidos y estudios morfogénéticos. Una característica sobresaliente de este medio es su alto contenido en nitrato, potasio y amonio comparado con otros medios (Cuadro 3).

Cuadro 3. Formulación de diferentes medios de cultivo (Parthibhan *et al.*, 2012; Bektas *et al.*, 2013; Mayo *et al.*, 2010; Murashige & Skoog, 1962).

Compuestos (mg/L)	Murashige y Skoog MS	Knudson C KC	Vacint & Went VW	Lindermann LM	Dalla Rosa & Laneri
(NH ₄)NO ₃	1650				
KNO ₃	1900		525		
KH ₂ PO ₄	170	250	250	135	250
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	250	122.1	58.62	250
CaCl ₂ 2H ₂ O	440				1000
(NH ₄) ₂ SO ₄		500	500	1000	500
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O		1000		347.2	
MnSO ₄ H ₂ O	16.89	7.5	5.68	0.05	7.5
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6			0.565	
H ₃ BO ₃	6.2			1.014	
KI	0.83			0.099	
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25				
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025			0.019	
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025				
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.85	25			27.85
Na ₂ EDTA	37.3			1050	37.25
Tiamina HCl	0.1				
Ac. Nicotínico	0.5				
Piridoxina	0.5				
Inositol	100				
Glicina	2				
Sacarosa	30000	20000			
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃ Tartrato férrico			28		
Ca ₃ (PO ₄) ₂			200		
NiCl ₂				0.03	
C ₆ H ₅ FeNO ₇ Citrato férrico				4.4	

El medio de cultivo se selecciona con base en la fisiología de la especie, de si el cultivo es sólo para crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos y de la ruta morfogénica que se desea seguir (embriogénesis u organogénesis, directa o indirecta). Modificaciones específicas a los medios pueden ser utilizadas para dirigir el desarrollo y morfogénesis de las plantas, explantes o células vegetales en cultivo, tal es el caso de la adición de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) (Smith, 2013).

2.10 Hormonas vegetales/RCV

Los RCV son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*, entre los más comunes utilizados en el CTV podemos encontrar a las auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico (Sarkar, 2009) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Principales características de algunas hormonas vegetales y RCV (Jankiewicz, 2003; George *et al.*, 2008).

Grupo	Ejemplos		Efectos o funciones que regulan	Principales sitios de síntesis
Auxinas	Hormonas vegetales	Ácido indol acético (IAA)	<ul style="list-style-type: none"> -Regulan el crecimiento, división y elongación celular. -Regulan la dominancia apical, inhibiendo las yemas axilares. - Intervienen en fenómenos como el fototropismo y gravitropismo. -Promueven la formación de raíces laterales y adventicias. -Participan en el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de tejidos vasculares. - En algunas plantas estimulan el crecimiento partenocárpico de los frutos. -Retardan la abscisión de las hojas y frutos. -En concentraciones altas provoca el aumento de la producción de etileno. 	Partes jóvenes de la planta: ápices, frutos tiernos y hojas en desarrollo.
		Ácido indol butírico (IBA)		
		Ácido fenil acético (PAA)		
	RCV	Ácido naftalen acético (NAA)		
		Ácido 4-amino-3,4,6-tricloropicolínico (Picloram)		
		2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)		
Citocininas	Hormonas vegetales	Zeatina Z	<ul style="list-style-type: none"> -Incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia hojas, semillas, flores y frutos. -Retardo en la senescencia de las hojas. -Formación de brotes y activación de yemas axilares. -Induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas. -Estimulan la biosíntesis de ácidos nucleicos y diferentes proteínas como proteasas y ribonucleasas. -Estimulan la germinación de semillas con fototropismo positivo y acortan el periodo de latencia de las yemas. 	Ápices radiculares, tejidos meristemáticos como el cámbium, yemas en desarrollo, frutos jóvenes o semillas en germinación.
		Isopentiladenina 2iP		
		Tans-zeatina		
	RCV	Benciladenina (BA)		
		6-Furfurilaminopurina (Kinetina)		

		Thidiazuron (TDZ)	<ul style="list-style-type: none"> -En algunas especies de plantas participan en la inducción de la floración y abscisión de frutos. -Estimulan la expansión foliar. -Promueve la conversión de etioplastos a cloroplastos. 	
Giberelinas		GA ₁	<ul style="list-style-type: none"> -Regulación de la elongación celular (como consecuencia del incremento de la plasticidad de las paredes celulares), y desarrollo de raíces. -Participan en el proceso de salida del periodo de latencia y germinación de las semillas. Aunque en algunos casos también pueden inducir o prolongar el periodo de latencia. - Participan en la inducción floral, y en la diferenciación de órganos sexuales florales. -Crecimiento rápido del tubo polínico. -Pueden tener influencia sobre la expresión de algunos genes, sobre todo los responsables de la síntesis de α-amilasa, proteasa, fosfatasa y β-glucanasa. -En sinergia con las auxinas, tienen influencia en la estimulación de la actividad del cambium vascular, así como en la formación del xilema. 	Ápices de raíces, hojas jóvenes, semillas en desarrollo (endospermo, escutelo, cotiledones y eje del embrión) , nudos de tallos, estambres en desarrollo.
		GA ₃		
		GA ₄		
		GA ₇		
Ácido abscísico		ABA	<ul style="list-style-type: none"> -Participa en el cierre de estomas, formación de proteínas de almacenamiento de las semillas. -Modera los efectos de auxinas y citocininas. -Controla la absorción de iones y agua por las raíces, en la abscisión de las hojas y senescencia. -Controla la expresión de genes específicos para el desarrollo y maduración embrionaria. -En CTV, ABA puede funcionar como inhibidor de crecimiento de callo y en algunos otros casos como promotor. -Puede promover la morfogénesis y crecimiento. 	Raíces, hojas maduras y semillas.

2.11 Complejos orgánicos

En el CTV la morfogénesis y el crecimiento pueden ser mejorados con el empleo de algunos complementos orgánicos cuya composición no está completamente definida, pues provienen de extractos vegetales o frutales principalmente. Algunos de los complementos orgánicos más ampliamente utilizados son: extracto de levadura, pulpa de plátano, jugo de tomate y piña, agua de coco, extractos de semillas, hojas, raíces y rizomas (George *et al.*, 2008; Salazar & Cancino, 2012). El líquido presente en el saco embrionario de algunos frutos, puede tener un efecto como promotor de crecimiento en algunos tejidos vegetales

cultivados en medios de cultivo simples, aunque la inhibición del crecimiento también ha sido reportado (George *et al.*, 2008).

El agua de coco (haciendo referencia al endospermo líquido de los frutos de *Cocos nucifera*) adicionada al medio de cultivo, es reconocida por inducir la división y crecimiento celular al igual que la morfogénesis (George *et al.*, 2008), estas propiedades están conferidas por la composición química del agua de coco, la cual no está completamente definida puesto que factores como la madurez, variedad y genotipo del fruto hacen variar su composición, sin embargo algunas sustancias que han sido identificadas de acuerdo a Yong *et al.*, (2009) son:

- Azúcares: Sacarosa, glucosa, fructosa.
- Alcoholes de azúcar: Manitol, sorbitol, myo-inositol.
- Iones inorgánicos: Ca, Fe, Mg, K, P, Zn, Na, Cu, Mn, Cl, S, Se, Al, B.
- Vitaminas: Ácido ascórbico, B1, B2, B3, B5, B6, ácido fólico, ácido nicotínico.
- Aminoácidos: Alanina, β -Alanina, arginina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, cisteína, glicina, ácido glutámico, isoleucina, histidina, leucina, lisina, glutamina, homoserina, metionina, prolina, tirosina, triptófano, treonina, valina, hidroxiprolina, y-Ácido aminobutírico, ácido pipercolico.
- Ácidos orgánicos: Ácido málico, cítrico, shikímico.
- Auxinas: AIA
- Citocininas: N⁶-isopenteniladenina, dihidrozeatina, *trans*-zeatina, kinetina.
- Giberelinas: G1, G3.
- Ácido abscísico y salicílico.

Dependiendo el medio de cultivo, RCV utilizados, condiciones de incubación y explante vegetal utilizado, entre otras cosas, será la respuesta morfogénica que se obtenga. Existen tres vías de regeneración: Organogénesis, embriogénesis somática y activación de yemas preformadas (Villareal, 2015) (Figura 3).

2.12 Vías de regeneración *in vitro*

La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que suceden de manera similar para los tres tipos de morfogénesis mencionados; fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización. En la primera fase las células no responden al estímulo organogénico pero adquieren esa competencia durante una fase de desdiferenciación. En la segunda fase las células son receptoras al estímulo morfogénico y

hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de RCV agregados al medio de cultivo y el explante. En la fase de realización, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado (Radice, 2010).

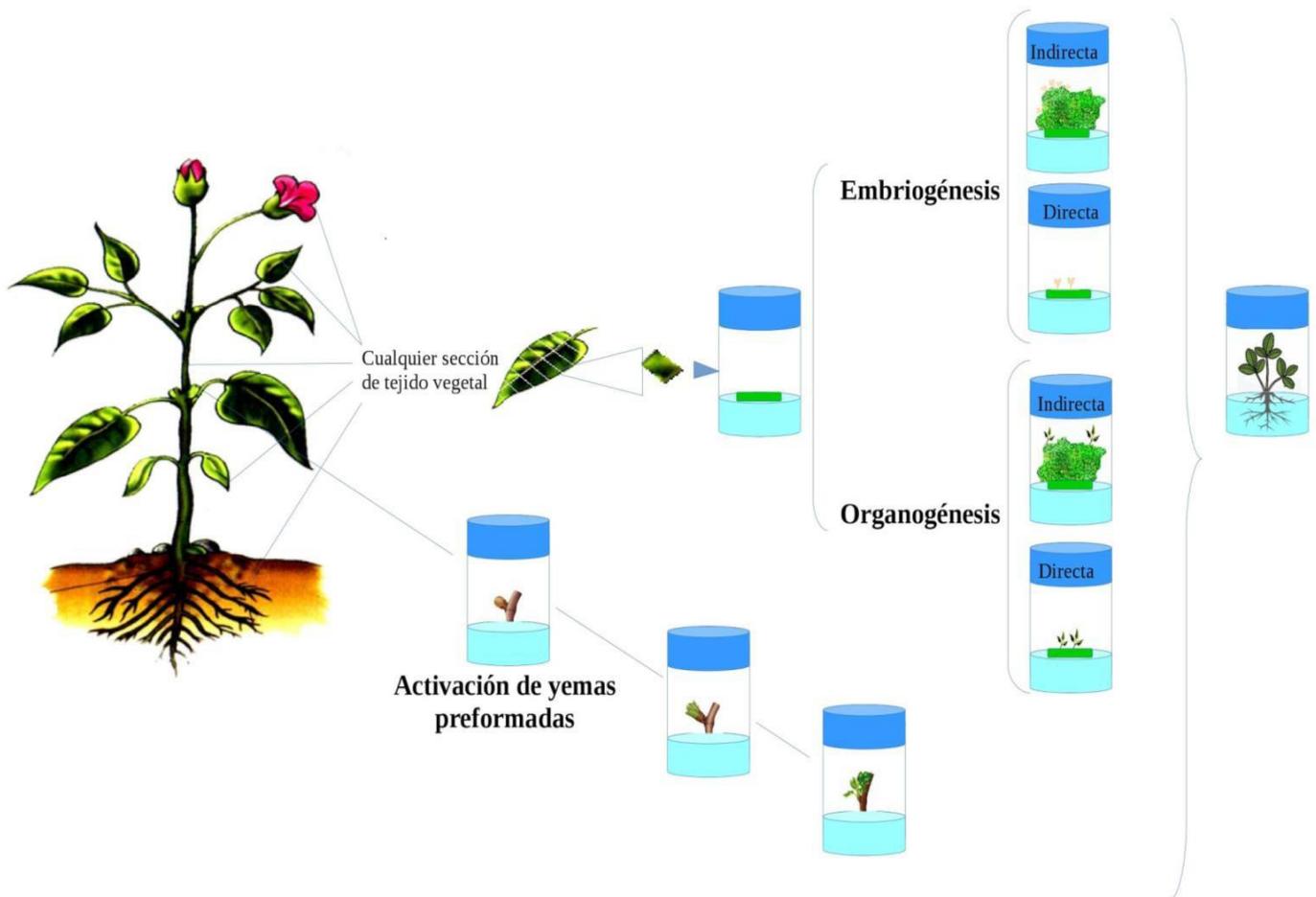


Figura 3. Vías de regeneración en el Cultivo de Tejidos Vegetales.

- Embriogénesis somática: Es una importante vía de regeneración del CTV, pues permite la propagación masiva de plantas mediante la regeneración de embriones somáticos (estructuras bipolares, independientes del tejido de origen), es un proceso por el cual células somáticas de plantas se inducen para formar embriones somáticos sin pasar por la fusión de gametos. Es frecuentemente inducida por auxinas y algunas veces en combinación con citocininas. La regeneración de plantas a través de esta vía incluye cinco etapas: 1) Iniciación de los cultivos embriogénicos, cultivando un explante primario en medio con RCV, principalmente auxinas, 2) Proliferación de los cultivos embriogénicos, 3) Pre-maduración de embriones somáticos en ausencia de RCV, 4) Maduración de embriones somáticos y germinación en cultivos

suplementados con ABA o en medios con bajo potencial osmótico y 5) Regeneración de plantas en medios sin RCV. La embriogénesis somática puede ser de manera directa o indirecta, directa si es que los embriones se forman directamente de células epidermales o subepidermales de explantes predeterminadas embriogénicamente, como lo son hipocótilos o cotiledones e indirecta si a partir del explante se desarrollan masas de células en continua división celular, denominadas callos, (aglomeración de células indeterminadas y desorganizadas), estos callos se conforman de masas proembriogénicas (PEMs), a partir de las cuales se desarrollarán los embriones somáticos (George *et al.*, 2008).

- Organogénesis: Se refiere a la generación de brotes (caulogénesis) o raíces (rizogénesis) a partir de un tejido inducido sin la presencia de meristemas. Usualmente para inducir la formación de brotes, se utiliza una mayor concentración de citocininas comparada con la de auxinas (Sarkar, 2009)
- Activación de yemas preformadas: Consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de este primordio en brotes vegetativos (Llorente, 2000). Entre los métodos desarrollados para la micropropagación de plantas, la proliferación axilar de yemas es la más utilizada y también es considerado el más adecuado para garantizar la estabilidad genética de las plantas regeneradas obtenidas. Dado que esta tecnología no implica la desdiferenciación celular, sino más bien el desarrollo y crecimiento de nuevos brotes a partir de meristemas preexistentes (Ngezahayo & Liu. 2014)

2.13 Cultivo de tejidos en orquídeas

Diferentes medios nutritivos se han empleado para la germinación y propagación de orquídeas, sin embargo el primer medio que se ocupó para la germinación de semillas (género *Cattleya*), sin la necesidad de la asociación con hongos, fue un medio simple con azúcar propuesto por Knudson (1922), este medio fue modificado posteriormente (1946) por el mismo autor, en el cual fueron adicionados diversos nutrientes para la obtención de mejores resultados de germinación (Mayo *et al.*, 2010).

En la literatura se reporta que para la germinación de semillas de orquídeas se han utilizado diferentes medios de uso generalizado (Cuadro 3) a parte del medio Knudson C, entre los más usados están los medios: MS (Murashige y Skoog), Hunter, Dalla Rosa y Laneri, VW

(Vacin y Went) y Lindermann (Mayo *et al.*, 2010). De igual manera se han utilizado tanto semillas maduras como inmaduras, diferentes tipos de explantes y combinaciones de RCV así como componentes adicionales al medio de cultivo como parte en la experimentación para lograr la propagación de las orquídeas. Para algunas especies americanas, se han reportado porcentajes de germinación en medio KC del 95.3% en *Habenaria macroceratitis* (Stewart & Kane, 2006), 91.9% en *Cattleya aurantica* y 92.4% en *Encyclia chacaoensis* al cabo de 16 semanas (Damon *et al.*, 2004) y en medio MS, 84.4% en *Prosthechea vespa* y 80.1% en *Sobralia klotzschiana* al cabo de 26 semanas (Salazar & Cancino, 2012) por citar algunos ejemplos. Menos han sido los trabajos de propagación *in vitro* con orquídeas del género *Prosthechea*, en el Cuadro 5 se resumen algunos de éstos realizados tanto con semillas como con de explantes de los géneros *Encyclia* (colocado en esta tabla por ser un género filogenéticamente muy cercano al género *Prosthechea*) y *Prosthechea*, los cuales fueron propagados mediante la germinación de sus semillas, a través de organogénesis directa y formación de PLB's.

Cuadro 5. Cultivo de tejidos vegetales realizado con algunas especies de orquídeas de los géneros *Encyclia* y *Prosthechea*.

Espece	Explante o material de cultivo	Medio	Complejos naturales o adsorbente	Reguladores de Crecimiento Vegetal	Respuesta	Referencia
<i>Encyclia adenocaula</i>	-Hoja -Protocormos -Pseudobulbos	MS*		ANA/BA ANA/GA ₃ ANA/BA/GA ₃	Callo PLB Brotos	Ávila & Salgado, 2006
<i>Encyclia citrina</i>	-Hoja -Protocormos -Pseudobulbos	MS*		ANA/BA ANA/GA ₃ ANA/BA/GA ₃	Callo PLB Brotos	Ávila & Salgado, 2006
<i>Prosthechea vespa</i>	Semillas	MS	-Agua de coco 20% -Jugo de Piña 20%		Germinación con un promedio de 84.4%	Salazar & Cancino, 2012
<i>Encyclia chacaoensis</i>	Semillas	-Hutner -KC* modificado -KC* -Dalla Rosa y Laneri	-Agua de coco -Carbón activado		Germinación de un 70-95%	Damon <i>et al.</i> , 2004
<i>Prosthechea cochleata</i>	Semillas	-MS* -K*	-Carbón activado		Diferentes tiempos de germinación con un rango de 8-13 semanas	Sánchez <i>et al.</i> , 2001
<i>Prosthechea cochleata</i>	Semillas	-KC* -Ng* -Px*	-Carbon activado		Germinación máxima de 9±4%	Nadarajan <i>et al.</i> , 2011

			-Banana powder			
<i>Prosthechea cochleata</i>	Semillas	-KC* -MS* 50% -VW* -M*	-Agua de coco 10% -Carbón activado		Diferentes tiempos de germinación con un rango de 7-12 semanas	Rodríguez <i>et al.</i> , 2005

* MS (Murashige & Skoog), KC (Knudson C), VW (Vacint & Went), Ng (Norstog), K (Knudson), Px (Phytamax), M (Morel).

A partir de explantes de hoja, protocormos y pseudobulbos de *Encyclia adenocaula* y *Encyclia citrina*, expuestos a combinaciones de ANA/BA, se obtuvo la formación de callos, que una vez colocados en otra combinación de ANA/BA/GA₃ dieron como respuesta la regeneración de PLB's alcanzando > 50 protocormos por explante en 21 días (Ávila & Salgado, 2006). Explantes de tallo, hoja y raíz de *Encyclia adenocaula*, expuestos a ANA/Kin, regeneraron brotes y PLB's (estos últimos obtenidos sólo a partir del explante de tallo) obteniendo la mayor cantidad de brotes a partir de los explantes de tallo (419 en total), al cabo de 120 días de ocurrida la siembra (López, 2009). Por otro lado con explantes de ápices y tallo de *Prosthechea chacaoensis* se obtuvo la regeneración a través de brotes y PLB's (Alvarado, 2011). Los mejores tratamientos en los cuales se obtuvo una mejor respuesta regenerativa en los estudios anteriores se puede observar en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Mejores tratamientos y respuestas obtenidas en trabajos realizados por propagación por cultivo de tejidos vegetales con explantes de algunas especies de *Encyclia* y *Prosthechea*.

Especie	Explante	Medio	Reguladores de crecimiento vegetal (RCV) mg/L	Respuesta	Referencia
<i>Encyclia adenocaula</i>	Hoja	MS	ANA/BA 0.5/2.0 ANA/BA/GA ₃ 0.1/0.1/0.1	Callo PLB's	Ávila & Salgado, 2006
	Protocormos	MS	ANA/BA 0.5/2.0 BA/GA ₃ 1.0/1.0 ANA/BA/GA ₃ 0.1/0.1/0.1	Callo PLB's	
	Pseudobulbos	MS	ANA/BA 0.5/2.0 BA/GA ₃ 1.0/1.0 ANA/BA/GA ₃ 0.1/0.1/0.1	Callo PLB's	
Hoja	MS	ANA/BA 1.0/1.0 ANA/GA ₃ 0.25/0.1	Callo		

<i>Encyclia citrina</i>	Protocormos	MS	ANA/BA 1.0/1.0 ANA/BA 0.25/0.25 ANA/GA3 0.25/0.1	Callo PLB's	
	Pseudobulbos	MS	ANA/BA 1.0/1.0 ANA/BA 0.25/0.25 ANA/GA3 0.25/0.1	Callo PLB's	
<i>Proshechea chacaoensis</i>	Ápices	MS 50%	ANA/BA 0.5/0.5 ANA/BA 1.0/0.5	Brotos y PLB's	Alvarado, 2011
	Hojas	MS 50% + AC	ANA/BA 0.5/0.5 ANA/BA 0.5/1.5	Brotos Respuesta mala	
<i>Encyclia adenocaula</i>	Hoja	MS 50%	Kin 0.5 Kin/ANA 1.0/0.1	Brotos	López 2009
	Tallo	MS 50%	Kin/ANA 0.5/1.0 Kin/ANA 3.0/1.0	Brotos PLB's	
	Raíz	MS 50%	Kin 0.5 Kin/ANA 1.0/0.5	Brotos	

3. JUSTIFICACIÓN.

A pesar de que se describe a *P. cochleata*, como una especie común en la literatura, actualmente se encuentra extremadamente escasa en muchas regiones donde anteriormente se encontraba en mayor densidad, restringiéndose a fragmentos de bosque tropical y plantaciones de café por arriba de los 800 msnm (Del Mazo & Damon, 2006).

Esta orquídea se encuentra en el Apéndice II de CITES y en peligro en el Índice de Plantas Reguladas de Florida (Florida's Regulated Plant Index), la pérdida de individuos de esta especie, debido al saqueo de esta para venta como planta de ornato, a la pérdida de hábitat por cambio de uso de suelo, al ataque por plagas fitófagas y la baja tasa de germinación de sus semillas, hacen que la reproducción por cultivos tradicionales no sean viables para asegurar su conservación y la demanda del mercado, pues son métodos que conllevarían largos periodos de tiempo. Es por eso que se requiere de estrategias más eficientes de propagación para asegurar su conservación y que estas permitan a la vez su uso sustentable como lo es el cultivo de tejidos vegetales. Las investigaciones mencionadas anteriormente muestran que esta orquídea es susceptible a propagarse de manera exitosa a través de vías de regeneración y germinación asimbiótica y a pesar de los múltiples papeles que *P. cochleata* desempeña (ornamental, medicinal, cultural y ecológico), los trabajos publicados al momento no han explorado.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

→ Establecer condiciones *in vitro* para la germinación asimbiótica y regeneración de *P. cochleata*.

4.2 Objetivos particulares

→ Evaluar características morfológicas de las semillas de *P. cochleata* tales como largo y ancho así como su viabilidad.

→ Establecer asépticamente semillas maduras e inmaduras de *P. cochleata*.

→ Comparar el tiempo y porcentaje de germinación de semillas maduras en los medios de cultivo KC y MS 50/100, en fotoperiodo y oscuridad.

→ Comparar el tiempo y porcentaje de germinación de semillas maduras en los medios de cultivo MS 50/100 y KC suplementados con distintas concentraciones de agua de coco.

→ Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento ANA/Kin en explantes de tallo, hoja y raíz.

→ Establecer las condiciones para la aclimatización en invernadero de las plántulas regeneradas *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Fuente de material biológico

Se obtuvo una planta adulta con flores de *P. cochleata*, procedente de un vivero del estado de Hidalgo, identificada como tal por la M. en C. Aida Téllez Velasco, Curadora de la Colección de Orquídeas, Jardín Botánico, IB-UNAM. Se polinizaron dos flores de la planta a inicios del mes de agosto del año 2014. Las semillas se obtuvieron mediante polinización artificial de manera geitonogámica. Después de seis meses de maduración (enero 2015) se cosechó una cápsula dehiscente (semillas maduras) (cápsula 1). Las semillas se almacenaron por cuatro semanas en sobres de papel, dentro de una caja de vidrio a una temperatura de 5-6 °C.

Posteriormente en mayo del año 2015 se obtuvo una segunda cápsula indehiscente (semillas inmaduras) (cápsula 2), la cual tenía aproximadamente cinco meses de maduración, ésta fue donada directamente al Laboratorio de CTV del Jardín Botánico y no

se cuenta con más datos de su procedencia. La cápsula se almacenó por dos días en un sobre de papel, dentro de un frasco de vidrio a una temperatura de 5-6 °C.

5.2 Viabilidad, conteo y caracterización de las semillas maduras

La viabilidad de las semillas maduras fue evaluada por medio de la prueba de tetrazolio (TTZ). Se sumergieron 0.2 mg de semillas de *P. cochleata*, de la cápsula 1, en 500 µL de solución de TTZ al 1% p/v (pH 7), éstas fueron colocadas durante 48 h en oscuridad (Bektas *et al.* 2013) a 25±2°C. Con una micropipeta (20-50 µL) se tomaron 20 µL de la solución de TTZ con semillas, previamente homogeneizada y se colocaron en un portaobjetos, para examinarse en un microscopio estereoscópico donde se realizó el conteo de semillas viables. Se realizaron cuatro repeticiones más de este último procedimiento. El embrión de las semillas viables se tiñó de rojo, debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células. Se consideraron viables aquellas semillas en las cuales el embrión se tiñó homogéneamente de rojo.

Otro lote de semillas se observó con ayuda de un microscopio estereoscópico donde se midió el ancho y largo de las mismas, a través del software AXiovision® de Carl Zeiss®, con la finalidad de obtener un promedio de sus dimensiones, además de que se observaron otras características como forma y color de la testa y del embrión.

5.3 Desinfección y establecimiento *in vitro* de las semillas maduras e inmaduras.

Se realizaron tres experimentos para el establecimiento aséptico de las semillas. Dos de éstos se llevaron a cabo para las semillas maduras y uno para las semillas inmaduras.

Desinfección, germinación de semillas maduras y desarrollo de protocormos en medio MS 50/100 y KC.

-Desinfección

La desinfección y siembra aséptica de las semillas de la capsula uno se realizó aproximadamente un mes después de la dehiscencia. En una balanza analítica se pesaron 0.8 mg de semillas las cuales fueron colocadas en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL, este procedimiento se realizó seis veces de tal manera que se establecieron seis tubos con 0.8 mg de semillas cada uno. Para la desinfección de las semillas se utilizó el método propuesto por Nadarajan *et al.* (2011), en cuanto a soluciones y tiempo se refiere, este método fue aplicado a la misma especie del presente estudio. Bajo condiciones asépticas en una

campana de flujo laminar se le adicionó a cada tubo 1mL de solución desinfectante (solución de hipoclorito de sodio 10% v/v) se mantuvieron en agitación por 20 min, posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y, por último, se dejaron en 1 mL de agua destilada estéril, para proceder a su siembra (Figura 4).

Para la siembra, de cada tubo se tomaron cuatro alícuotas de 250 μ L, cada una se esparció con ayuda de una micropipeta en una caja Petri con medio de cultivo. En total se sembraron 12 cajas Petri con medio MS con 50/100, sacarosa 3% y 12 cajas Petri con medio KC adicionado con vitaminas del medio MS pH 5.5 y sacarosa 2%.

EL medio inoculado con las semillas desinfectadas se incubaron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cuatro cajas con medio MS 50/100 y cuatro con medio KC se colocaron en oscuridad, con una exposición a la luz de 30 minutos aproximadamente una vez a la semana (para la revisión de los cultivos). El resto de las cajas (ocho con medio MS 50/100 y ocho con medio KC) se mantuvieron en fotoperiodo 16h luz, 8h oscuridad.

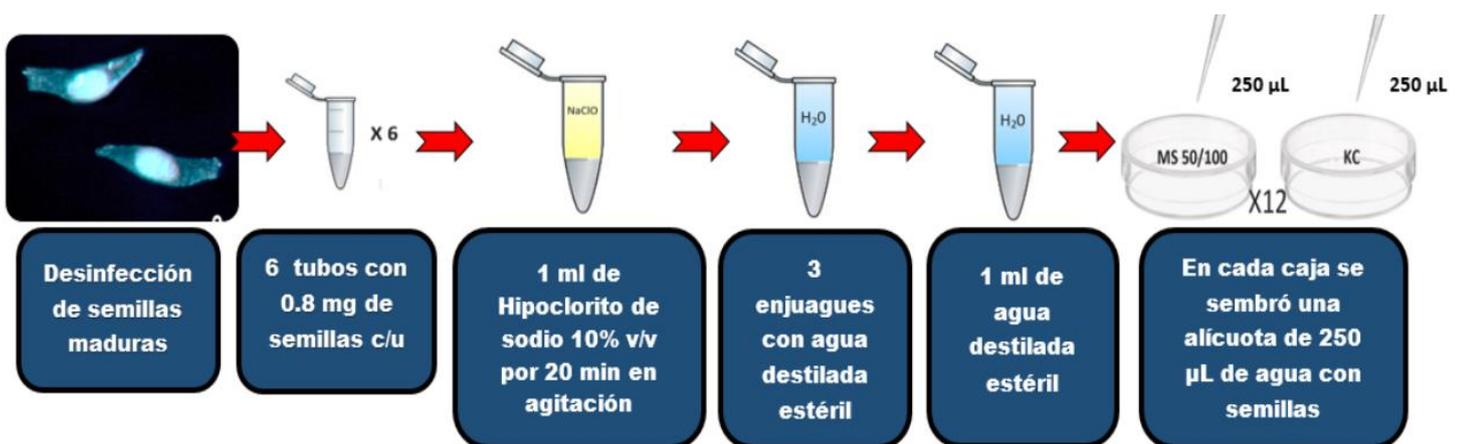


Figura 4. Método de desinfección para semillas maduras.

-Germinación y desarrollo de los protocormos

Para la primera prueba de germinación de las semillas maduras se probaron dos tipos de medios de cultivo. Medio semisólido MS 50/100 con 30 g/L de sacarosa, pH 5.7 mediante el uso de soluciones de NaOH y HCl al 1, 0.5 y 0.1 N, el gelificante utilizado fue Gellan gum 3.8 g/L. Medio KC adicionado con las vitaminas del medio MS, 20g/L de sacarosa, pH 5.5 y como gelificante Gellan gum 3.8 g/L.

El medio de cultivo se esterilizó mediante calor húmedo en autoclave vertical a una temperatura de 121°C , presión de 1.5 kg/cm^2 por 17 minutos. Posteriormente a la

esterilización se colocaron de 20 a 25 mL de medio de cultivo en cajas Petri (10 cm de diámetro) en condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar.

Al cabo de siete semanas de sembradas las semillas en el medio de cultivo se estimó el porcentaje de germinación tanto para las semillas en medio MS 50/100 y KC en fotoperiodo 16 h luz, 8 h oscuridad y oscuridad.

Para el primer subcultivo de las plántulas obtenidas en medio MS se preparó medio MS 50/100 con o sin endospermo de coco en una proporción de 10, 20 y 30% v/v, la sacarosa, pH y gelificante fueron los mismos empleados para el medio de germinación. Se colocaron 20 mL de medio en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad.

El segundo subcultivo se realizó en medio MS 50/100 con RCV ANA/BAP 0.2/1 mg/L, MS 50/100 con 2 antioxidantes, ácido ascórbico y ácido cítrico 100 mg/L y MS 50/100 con RCV en conjunto con los antioxidantes mencionados.

Para el subcultivo de las plántulas obtenidas en medio KC, se preparó medio KC con o sin endospermo de coco en una proporción de 0, 10, 20 y 30% v/v, la sacarosa, pH y gelificante fueron los mismos empleados para el medio de germinación. Se colocaron 20 mL de medio en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad.

El segundo subcultivo se realizó en medio KC con RCV ANA/BAP 0.2/1 mg/L, KC con antioxidantes (ácido ascórbico y cítrico 100 mg/L) y KC con RCV en conjunto con los antioxidantes mencionados (Figura 5).

Tanto los medios adicionados con endospermo de coco así como con RCV y antióxicantes se utilizaron como una alternativa para ver si el desarrollo de las plántulas se veía beneficiado, así como frenar los procesos de oxidación que se presentaban en los cultivos.

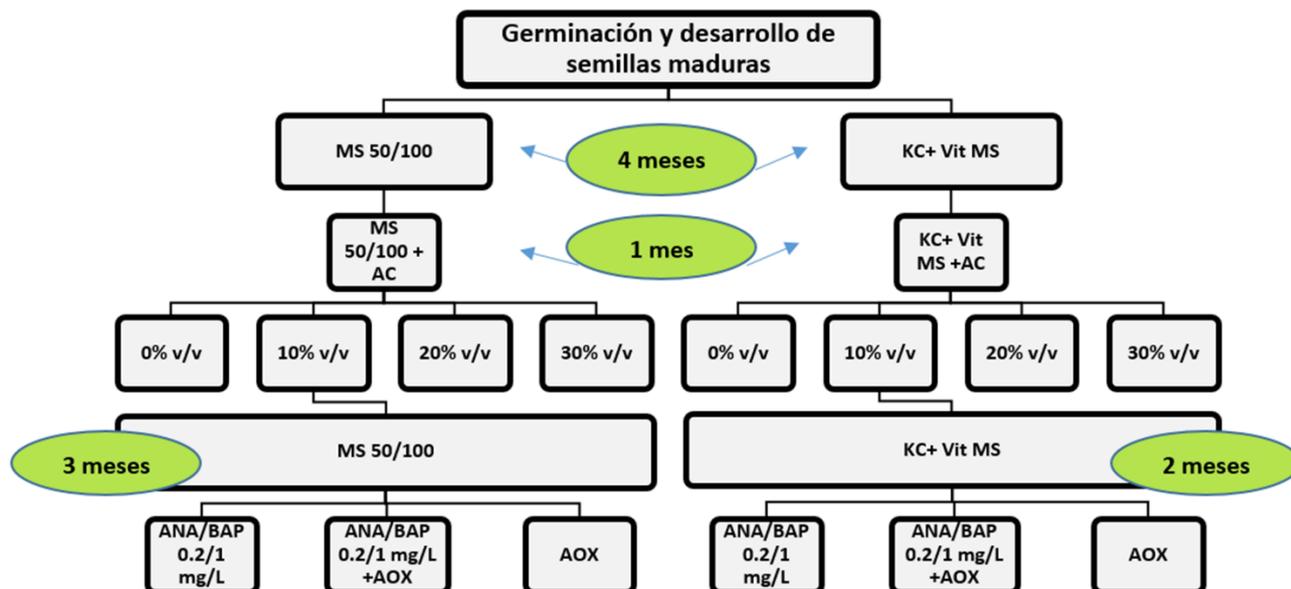


Figura 5. Medios de cultivo y tiempo en el que permanecieron las semillas maduras durante su germinación y desarrollo. AC:agua de coco, AOX:antioxidantes

Desinfección y germinación de semillas maduras en medio MS 50/100 adicionado con 0, 10, 20 y 30 % de agua de coco v/v

Se realizó una segunda siembra 15 semanas después de realizar la primera (antes de la siembra se llevó a cabo una prueba TTZ para ver si el porcentaje de viabilidad había cambiado después de transcurridas 15 semanas), el proceso de desinfección utilizado fue el mismo que para las semillas de la primera siembra. Para la desinfección se pesó 1 mg de semillas en cada uno de ocho tubos Eppendorf® (1.5 mL). Después de la desinfección se le colocó a cada tubo 1 mL de agua destilada estéril, se agitó el tubo y se tomaron cuatro alícuotas de 250 µL y cada una de estas se sembró en una caja o frasco de acuerdo al Cuadro 7.

En medio empleado fue MS 50/100 con o sin endospermo de coco en una proporción de 0, 10, 20 y 30% v/v (Figura 6). El porcentaje de germinación se calculó al finalizar siete semanas de siembra en los medios de cultivo.

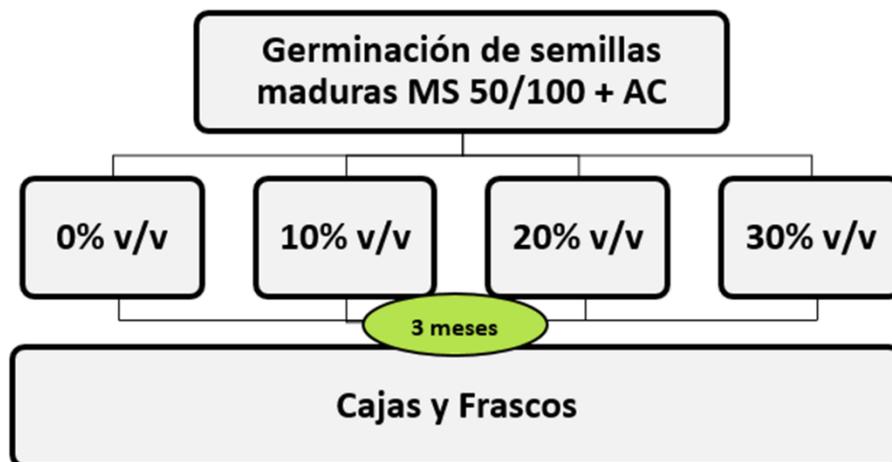


Figura 6. Medios de cultivo utilizados en la germinación de semillas maduras.

Cuadro 7. Distribución de semillas maduras (cápsula 1) en medio de cultivo MS 50/100 con 0, 10, 20 y 30% v/v de agua de coco, en frascos y cajas Petri. * 1mg de semillas/1mL de agua destilada estéril.

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
1mg/1mL*							
4 alícuotas 250 µL							
4 Cajas	4 Frascos						
MS 50/100 sin AC		MS 50/100 10% AC		MS 50/100 20% AC		MS 50/100 30% AC	

Desinfección y germinación de semillas inmaduras.

-Desinfección

La segunda cápsula obtenida era una cápsula inmadura la cual aún estaba cerrada (indehiscente), para la siembra de las semillas el proceso de desinfección se realizó a la cápsula completa. El protocolo que se siguió fue el propuesto en Parthibhan *et al.*, 2012 para la especie *Dendrobium aqueum*.

Se lavó la cápsula con agua corriente y dos gotas de detergente, posteriormente en la campana de flujo laminar se tomó la cápsula con unas pinzas por la parte restante del pedúnculo y se sumergió en etanol 70% v/v por unos segundos (2-3) y se flameó la cápsula con ayuda de un mechero de Bunsen, el flameado (previamente sumergiendo la cápsula de nuevo en alcohol) se realizó una segunda vez, la cápsula se colocó en una caja Petri esterilizada y con ayuda de un bisturí se procedió a abrir la cápsula, con una espátula se tomaron las semillas, las cuales fueron colocadas en cajas Petri con medio de cultivo MS 50/100.

Se realizaron subcultivos aproximadamente cada dos meses (Figura 7) a medio fresco MS 50/100 utilizando como envase, frascos de 100 mL de capacidad.

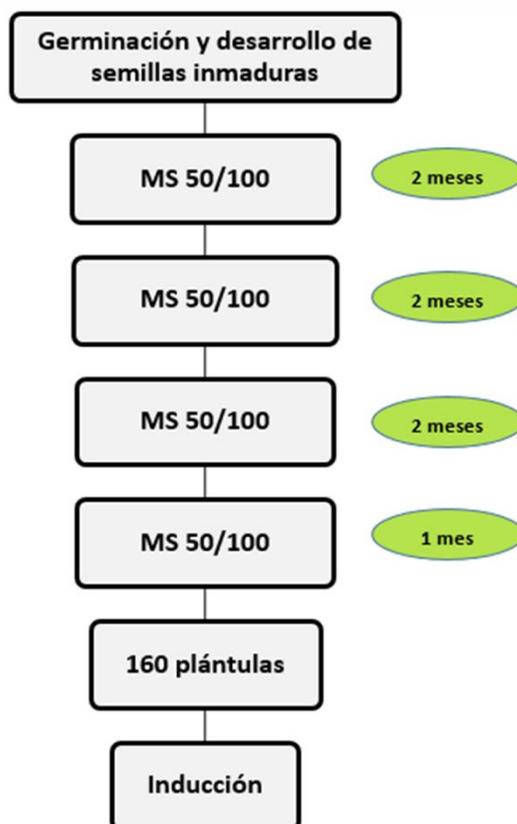


Figura 7. Medios de cultivo y tiempos empleados en la germinación de semillas inmaduras.

5.4 Inducción de explantes de hoja, tallo y raíz en medio MS 50/100 adicionado con RCV ANA/Kin.

Cuando las plántulas procedentes de las semillas inmaduras contaban con 7 meses de edad, se seleccionaron 160 con un rango de altura de 1.9 a 2.95 cm (promedio de 2.4 cm) y se procedió a realizar cortes de tallo, hoja y raíz; teniendo los explantes una medida de 0.3-0.5 cm de longitud para el tallo y 1.0 cm de longitud para los explantes de hoja y raíz (Figura 8). Los cortes se realizaron bajo inmersión en una solución con los antioxidantes ácido cítrico y ácido ascórbico, 100 mg / L, para evitar la oxidación de los explantes.

El medio de inducción empleado fue MS 50/100, adicionado con los RCV Kin (0, 0.5 y 1 mg/L) y ANA (0, 0.1, 0.5 y 1 mg/L) que se utilizaron solos o en combinaciones (Cuadro 8), al medio se le agregaron también los antioxidantes ácido ascórbico y ácido cítrico 100 mg/L.

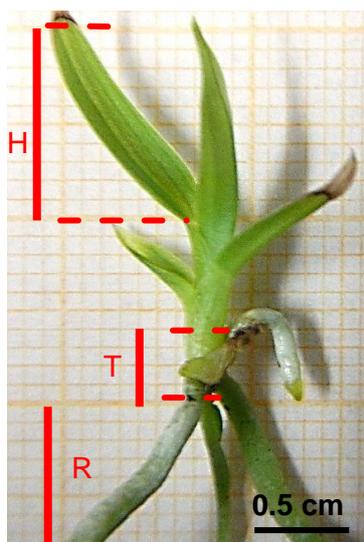


Figura 8. Plántula de *Prosthechea cochleata* a los siete meses de cultivo, propagada a partir de la germinación asimbiótica. Se muestra con una línea punteada los cortes que se realizaron para la obtención de explantes. R: raíz, H: hoja, T: tallo.

Se llevaron a cabo 10 repeticiones por tratamiento y se colocaron dos explantes por frasco. Los explantes de hoja y raíz se sembraron en 12 tratamientos y los explantes de tallo solo en 8 de ellos (Cuadro 8). Teniendo un total de 240 explantes de hoja y 240 de raíz (20 explantes en 10 frascos por cada tratamiento) y 160 explantes de tallo (20 explantes en 10 frascos por cada tratamiento).

Cuadro 8. Tratamientos utilizados en la inducción morfogénica de explantes de hoja, tallo y raíz de *Prosthechea cochleata*.

Kin mg/L ANA mg/L	0	0.5	1
0	0/0 *	0/0.5 *	0/1 *
0.1	0.1/0 *	0.1/0.5	0.1/1
0.5	0.5/0*	0.5/0.5 *	0.5/1
1	1/0 *	1/0.5 *	1/1

* En explantes de tallo se utilizaron sólo estos tratamientos

Las observaciones se llevaron a cabo cada 15 días por los siguientes dos meses. Los parámetros a medir fueron el porcentaje de oxidación y la respuesta morfogénica.

Después de dos meses en inducción, se realizó un subcultivo de los explantes con regenerantes a medio basal MS 50/100 adicionado con ácido ascórbico y cítrico 100 mg/L, donde permanecieron dos meses más. Finalmente los brotes y plántulas obtenidos se subcultivaron en medio MS 50/100 adicionado con 0.5 g/L de carbón activado, con la finalidad de promover la generación de raíces y/o el desarrollo de las mismas, así como para evitar o frenar la oxidación de brotes y plántulas.

5.5 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias significativas en la respuesta obtenida en los diferentes explantes de *P. cochleata* a los distintos tratamientos al cabo de 16 semanas, los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se aplicó el test de comparaciones múltiples HSD de Tukey con un intervalo de confianza del 95% para determinar las diferencias de medias estadísticamente significativas dentro de los tratamientos. El análisis se realizó con ayuda del paquete estadístico Statistica 8.0.

5.6 Aclimatización

Se seleccionaron 10 plántulas por cada tratamiento que produjo regenerantes, con un rango de 3-5 cm de altura, con al menos dos raíces bien desarrolladas y tres hojas (Figura 9); las plántulas se extrajeron de los frascos de cultivo y se les realizó un enjuague a las raíces con agua corriente para quitar los restos de medio de cultivo que pudieran tener y de esta manera se evitara una posible contaminación; se colocaron en un recipiente con una solución antiséptica de yodo 0.1% v/v por 15 minutos, posteriormente, las plantas se colocaron en germinadoras con cavidades de 5 cm de diámetro, con una mezcla de sustrato de tepojal:corteza:agrolita:peat moss 2:1:1:1 v/v (Figura 9b), previamente esterilizada por 30 min a 1.5 kg/cm² y 121° C en autoclave. Las plántulas se mantuvieron por dos semanas en el área de aclimatización del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM, a una temperatura y fotoperiodo de otoño de la Ciudad de México, posteriormente se transfirieron las plantas a un invernadero dentro del mismo Jardín Botánico.

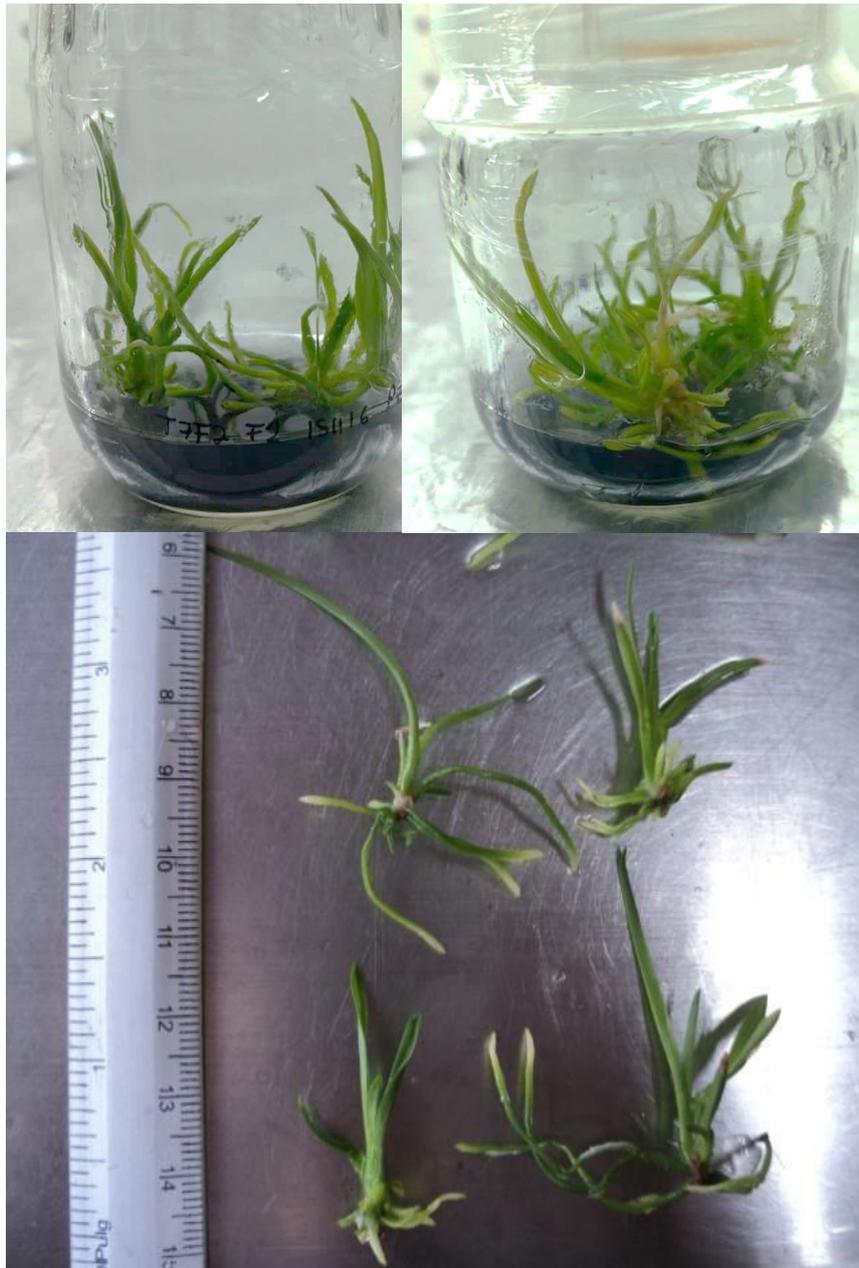


Figura 9. Plantas de 3-5 cm de altura utilizadas para aclimatización.

Los riegos aplicados a las plántulas fueron de una a dos veces por semana de tal manera que el sustrato siempre se mantuviera húmedo. A lo largo de ocho semanas se evaluó la supervivencia de las plantas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Viabilidad, conteo y caracterización de las semillas maduras

Las características morfológicas de las semillas maduras de *P. cochleata* se presentan en el Cuadro 9; el largo, ancho y peso son medidas promedio:

Cuadro 9. Características morfológicas de las semillas maduras de *Prosthechea cochleata*.

Largo	0.4 ± 0.019 mm	
Ancho	0.11 ± 0.0031 mm	
Peso	$0.21 \pm 1.2 \times 10^{-5}$ μ g	
Color del embrión	Blanco	
Suspensor	Ausente	
Testa	Blanca translúcida	

Tanto el largo como ancho se encuentran dentro de los rangos establecidos de manera general para las semillas de las orquídeas descrito en Baskin & Baskin, 2014 y Téllez & Flores, 2007, los cuales son 0.18 mm a 3.85 mm de largo por 0.09 mm a 0.27 mm de ancho; sin embargo el peso se encuentra por debajo del rango descrito (0.3 μ g a 14 μ g) con casi 0.1 μ g de diferencia del peso más bajo, esto puede deberse a que el peso promedio se calculó a partir de una muestra que contenía semillas tanto completas como incompletas (no presentaban embrión) siendo un 81.6% de último este tipo. Finalmente el peso de la muestra se dividió entre el total de las semillas, disminuyendo así el peso promedio para cada una de las semillas que sí contenían embrión.

Nikishina *et al.* (2001) obtuvieron algunas de las medidas de las semillas de *P. cochleata* reportando 0.315 ± 0.009 mm de largo y 0.160 ± 0.007 mm de largo del embrión, si bien el largo total de la semilla no coincide con el obtenido en este estudio, esta se encuentra muy cercana.

Con respecto a las pruebas de TTZ realizadas a las semillas maduras (al mes de abierta la cápsula) se obtuvo una viabilidad de 13.5% con respecto al total de las semillas y 73.5% si sólo se toman en cuenta las semillas que presentaban embrión, se contaron como semillas viables aquellas cuyo embrión se tiñó de rojo (Figura 10). El bajo porcentaje de viabilidad obtenido puede deberse a que probablemente el proceso de polinización artificial no se llevó de la manera adecuada y a la naturaleza del tipo de polinización (geitonogámica), ya

que de acuerdo con algunos estudios en especies de orquídeas como *Bletia purpurea* y *Encyclia ciliare*, el porcentaje de viabilidad era menor cuando las semillas provenían de polinización geitonogámica y autogámica, comparadas con la viabilidad de aquellas que provenían de polinización cruzada (alogamia), (Ossenbach *et al.*, 2007). Sin embargo la autopolinización en especies del género *Prosthechea* ha sido descrita, incluso *P. cochleata* var. *triandra* presenta en la columna una modificación estructural de dos anteras adicionales que permiten a los tubos de polen eludir el rostelo lo que resulta en la autopolinización (Del Mazo & Damon, 2006; Higgins, 2003).

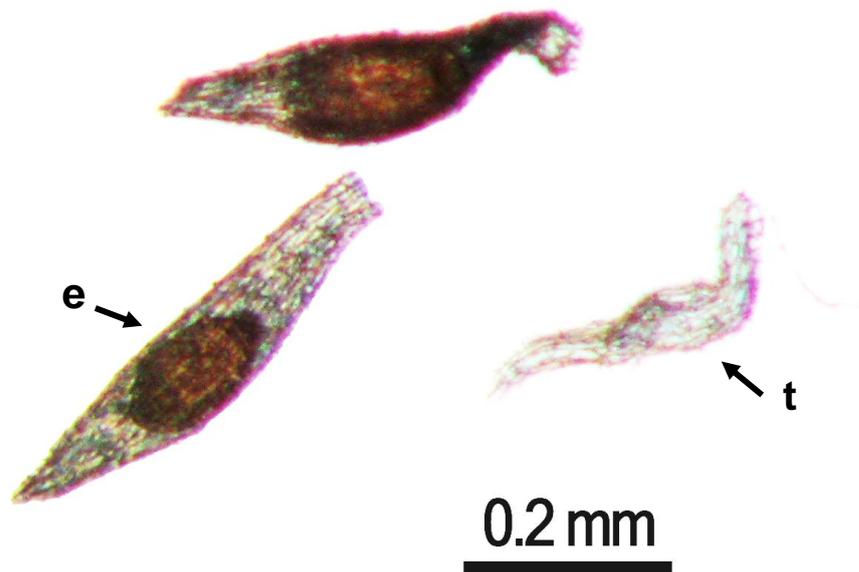


Figura 10. Semillas maduras de *Prosthechea cochleata*, e: embrión teñido con TTZ, t: testa, semilla sin embrión.

Varios autores han utilizado la prueba de TTZ como una prueba que determina de manera confiable la viabilidad de las semillas, sin embargo el porcentaje de viabilidad puede ser diferente al de germinación puesto que factores como la dormancia de las semillas, la incorrecta selección del medio de cultivo, el método de desinfección y condiciones de incubación pueden imposibilitar la germinación, aunque la semilla sea viable. En algunas investigaciones dónde se realizaron mediciones de viabilidad y germinación *in vitro* de algunas semillas de orquídeas con condiciones de incubación similares a las del presente estudio, Parthibhan *et al.* (2012) reportan una viabilidad de 92.6% y germinación de 93.41% en semillas de *Dendrobium aquetum*, en medio MS al 50% y un 84.4% en MS así mismo Salazar & Cancino (2012), reportan para *P. vespa* y *Sobralia klotzscheana* viabilidad de

87.2 y 80.6% y germinación promedio de 84.4 y 80.1% respectivamente en medio MS suplementado o no con agua de coco o piña, oscilando la viabilidad un 0.5% (*S. klotzscheana*) y 2.8% (*P. vespa*), por encima de la germinación real de las semillas; a diferencia de éstos, en el estudio realizado por Bektas *et al.* (2013), reportan porcentajes de germinación diferentes con respecto a la viabilidad en semillas de *Orchis coriophora* obteniendo un porcentaje de viabilidad de $54 \pm 2.1\%$ y diferentes porcentajes de germinación dependiendo del medio de cultivo (KC, OM, LM) en un rango de $27.4 \pm 2.1\%$ a $12.4 \pm 0.4\%$.

6.2 Desinfección y establecimiento *in vitro* de las semillas maduras e inmaduras

El método de desinfección realizado a las semillas maduras permitió el establecimiento aséptico del 100% de las semillas sembradas, por lo cual resultó ser un método efectivo en cuanto al establecimiento aséptico. Esto debido a las propiedades altamente oxidativas y por consecuencia las propiedades antimicrobianas del hipoclorito de sodio mencionadas con anterioridad.

A pesar de que se obtuvo el 100% de asepsia, se presentó una baja tasa de germinación de las semillas, la cual puede estar relacionada con la proporción de cloro comercial que se empleó y el tiempo de exposición al mismo, causando así la pérdida de la viabilidad o potencial para germinar. Álvarez *et al.* (2006), encontraron que el tiempo y la concentración del desinfectante afecta el porcentaje de germinación de las semillas de *Encyclia pygmaea* con respecto al porcentaje de su viabilidad, disminuyendo en un 39% con respecto a la viabilidad de la semillas cuando éstas se desinfectaron con una solución que contenía 0.4% vol/vol de cloro activo durante 15 min, mientras que para la misma concentración durante 30 min resultó en ausencia de germinación; y para una dosis de 0.8% la germinación disminuyó significativamente tanto para los tiempos de exposición cortos o largos de la solución desinfectante; a pesar de que no mencionan el porcentaje de contaminación, sí hacen referencia a la presencia de ésta, resaltando el punto de que utilizando la solución con la concentración de 0.4% de cloro activo por un periodo de 5 minutos, se logró evitar la contaminación en la mayoría de los casos. En este punto es apropiado mencionar que en el presente trabajo se empleó una solución desinfectante al 10% v/v de hipoclorito de sodio, lo cual equivale a una concentración de 0.55% de cloro activo, que en un tiempo de exposición de las semillas de 20 minutos, se logró un porcentaje de asepsia del 100%. Por otro lado, Billard *et al.* (2014) encontraron que utilizando soluciones desinfectantes con un 0.5% de hipoclorito de sodio no se ve afectada la germinación *in vitro* con respecto a la viabilidad de las semillas de algunas especies de *Oncidium*, encontrando que

concentraciones mayores disminuyen la germinación, mencionan también que tanto con las concentraciones de 0.5, 1 y 2% de hipoclorito de sodio, sus cultivos no presentaron contaminación.

Con respecto al método utilizado para la desinfección de la cápsula indehiscente, se puede decir que de igual manera resultó efectivo puesto que se logró el establecimiento aséptico al 100 % de las semillas. Y de los dos protocolos utilizados, resultó el más fácil y rápido de ejecutar. En este caso, dado que ninguna solución desinfectante entra en contacto directo con las semillas (debido a la protección que ofrecen las tres capas que constituyen el pericarpio de la cápsula) sería de esperarse que por desinfección, aquellas semillas viables no perdieran esta cualidad. Parthibhan *et al.* (2012), (Estudio del cual se obtuvo el método de desinfección aquí empleado para la cápsula inmadura) mencionan que el porcentaje de viabilidad, utilizando la prueba de TTZ, en las semillas de *Dendrobium aqueum* fue de 92.6% y el porcentaje de germinación de 91.04%, 90.23% y 84.4%, dependiendo del medio de cultivo empleado, pudiéndose apreciar que entre los porcentajes de viabilidad y germinación no hay mucha diferencia.

6.3. Germinación y desarrollo de las semillas maduras en medio MS 50/100 y KC

Efecto del medio de cultivo en la germinación.

Al cabo de siete semanas de sembradas las semillas se estimó el porcentaje de germinación (Cuadro 10) para las semillas en medio MS 50/100 y KC en fotoperiodo y en oscuridad. Se consideró como germinada todas aquellas semillas cuyo embrión emergió de la testa pudiéndose observar el inicio de la polarización para la formación de los protocormos.

Cuadro 10. Porcentajes de germinación en fotoperíodo y oscuridad después de siete semanas de sembradas las semillas maduras

	MS 50/100	KC
Fotoperiodo 16h luz, 8h oscuridad	8.6 ± 2%	3.8 ± 1.2%
Oscuridad	0%	0%

En el bajo porcentaje de germinación en los medios expuestos a fotoperiodo, se puede deber a varios factores involucrados: la naturaleza del método de desinfección, la pérdida de material biológico en el momento de la siembra, la maduración de las semillas y el medio de cultivo utilizado. Sin embargo Nadarajan *et al.* (2010) reportaron porcentajes muy cercanos a los obtenidos en este estudio, teniendo $9 \pm 4\%$ como máximo de germinación en medio Ng y 4% en medio KC, esto podría deberse a la mayor concentración de aminoácidos en el medio Ng comparado con el medio KC. Esto sugiere que el reemplazo de amonio y sales de nitrato, como fuente de nitrógeno, por aminoácidos, promueve la germinación. Esto se puede explicar por la ausencia de la enzima nitrato reductasa en algunas semillas, la cual realiza la conversión de nitrógeno de una forma inorgánica a una orgánica (Nadarajan *et al.*, 2010). Siendo la misma razón por la cual en el medio MS hubo un mayor porcentaje de germinación comparado con la que hubo en el medio KC, pues en el medio MS se tiene, como fuente de nitrógeno el aminoácido glicina, además de las sales nitrato de amonio ($(\text{NH}_4)\text{NO}_3$) y nitrato de potasio (KNO_3), mientras que el medio KC la fuente de nitrógeno es sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requiriendo este último, así como el nitrato de potasio y amonio, la presencia de la enzima nitrato reductasa para poder llevar a cabo su metabolismo de la forma inorgánica a forma orgánica, mientras que el aminoácido presente en el medio MS se encuentran más disponible para su asimilación.

Por otro lado se debe tener en cuenta que la germinación de las semillas de orquídea en condiciones naturales se da por medio de la asociación con cierto tipo de hongos, como se mencionó anteriormente, que brindan al embrión principalmente una fuente de carbono, radicando su importancia en que, en la presencia de sacarosa, las reservas lipídicas que contienen los embriones pueden ser hidrolizados, los cuerpos lipídicos resultantes se transforman en almidón, macromolécula compuesta por varias unidades de glucosa, esta última importante en la constitución de diferentes tejidos vegetales. Sin la presencia de sacarosa o algún otro azúcar, la hidrólisis lipídica no puede llevarse a cabo y por lo tanto las reservas de los embriones de las orquídeas no pueden ser metabolizados; en el cultivo *in vitro*, la germinación asimbiótica es posible pues al medio de cultivo se le adiciona una fuente de carbono, en el caso de los medios MS y KC es sacarosa, sin embargo Zettler *et al.* (2007) mencionan que incubando semillas de *Epidendrum nocturnum* en medios con micorrizas de *Epulorhiza repens* obtuvieron porcentajes de germinación de 62.9 ± 11.5 a $6.4 \pm 9.4 \%$, los cuales estuvieron muy por encima (aún el porcentaje más bajo) del porcentaje obtenido en los cultivos control con ausencia de micorriza (0.1% de germinación). Mencionan también que previamente dos especies *Cyrtopodium punctatum*

y *Prosthechea cochleata* (la especie de estudio de este trabajo) fueron propagadas de manera similar que *E. nocturnum* (S. Stewart, L. Richardson, datos no publicados) sugiriendo que la propagación simbiótica resulta más efectiva que el cultivo asimbiótico.

Efecto de la luz/oscuridad en la germinación de *P. cochleata*

Las semillas de *P. cochleata* que se mantuvieron en condiciones de oscuridad no germinaron ni presentaron cambios en tamaño o color del embrión (Cuadro 10), esto se debe a que la luz fue un factor fundamental para la germinación de dichas semillas y esto se ve relacionado con su hábito epífito. Contrario a la germinación de semillas de orquídeas de hábito terrestre, cuya germinación es mayor cuando se incuban en oscuridad total, comparado con la incubación en fotoperiodo; tal es el caso de *Calopogon tuberosus* que presentó un 45% de germinación, en medio KC, cuando las semillas fueron incubadas por ocho semanas en oscuridad y aproximadamente un 41 % de germinación en fotoperiodo (16h luz y 8h oscuridad), concluyendo que, si bien la germinación fue mayor en condiciones de oscuridad, el desarrollo de las plantas fue mejor cuando las semillas fueron incubadas y germinadas en fotoperiodo (Kauth, 2005).

Las especies que se encuentran en áreas abiertas están expuestas a niveles de luz más altos que las que se encuentran en el suelo del bosque y, por lo tanto, germinan en presencia de luz (Kauth, 2005). Se tiene la noción de que las orquídeas epífitas requieren luz y las especies terrestres requieren oscuridad para la germinación y es ampliamente aceptada, sin embargo, las respuestas de germinación en fotoperiodos suelen ser específicas de la especie, independientemente del hábito de crecimiento (Kauth et al., 2006). Depende de la especie, las semillas pueden germinar solo en la presencia de luz, oscuridad o ambas. En el caso de las semillas de *P. cochleata* al haber germinado solamente en condiciones de fotoperiodo se puede decir que presentaron una condición fotoblástica positiva. La luz promueve la síntesis de giberelinas (GA_1 a través de la inducción de la enzima AG3 b-hidroxilasa medida por la acción del fitocromo, la luz roja induce la expresión de la enzima, mientras que la roja lejana inhibe el proceso. Las giberelinas han sido relacionadas directamente con promover y controlar la germinación de las semillas (Araya et al., 2000). Las lámparas fluorescentes de luz blanca fría, emiten una porción de luz roja y muy poca luz rojo-lejano, a diferencia de las lámparas incandescentes que emiten una gran cantidad de luz rojo-lejano y calor, la absorción de luz roja convierte la forma inactiva de fitocromo (Pr), la cual inhibe la germinación, a su forma activa (Pfr), la cual promueve la germinación (Baskin & Baskin, 2014).

Efecto del medio de los medios de cultivo MS 50/100 y KC, en el desarrollo de las plántulas

En el medio de cultivo MS 50/100 el embrión comenzó a hincharse desde la primera semana de siembra y adquirió un tono verde a las dos semanas (Figura 11b), indicando que se estaba llevando a cabo la síntesis de clorofila (pigmento que le da el color verde a las plantas debido a que no puede absorber la longitud de onda de la luz de este color y por lo tanto la refleja) y por lo tanto el inicio en la actividad fotosintética, mientras que en medio KC el embrión empezó a hincharse también en la primera semana pero fue hasta la cuarta semana (Figura 11k) que se observó la tonalidad verde; la aparición de rizoides ocurrió a las seis y ocho semanas en medio MS 50/100 y KC respectivamente (Figura 11d y 12g); el primer primordio foliar en medio MS 50/100 se observó a las siete semanas y a las ocho ya contaba también con hojas verdaderas, mientras que en el medio KC fue hasta las ocho semanas que observó la polarización del protocormo (Figura 12a y 12g); a las 12 semanas de desarrollo en medio MS 50/100 comenzaron a surgir las raíces verdaderas (Figura 12c). Con respecto a las semillas incubadas en oscuridad, tanto en medio MS 50/100 como KC, no se logró observar cambio alguno en tamaño ni en coloración del embrión a lo largo de las 12 semanas de evaluación, es decir no hubo germinación en oscuridad (Figura 11e- h, 11m-o, 12d-f y 12j-l).

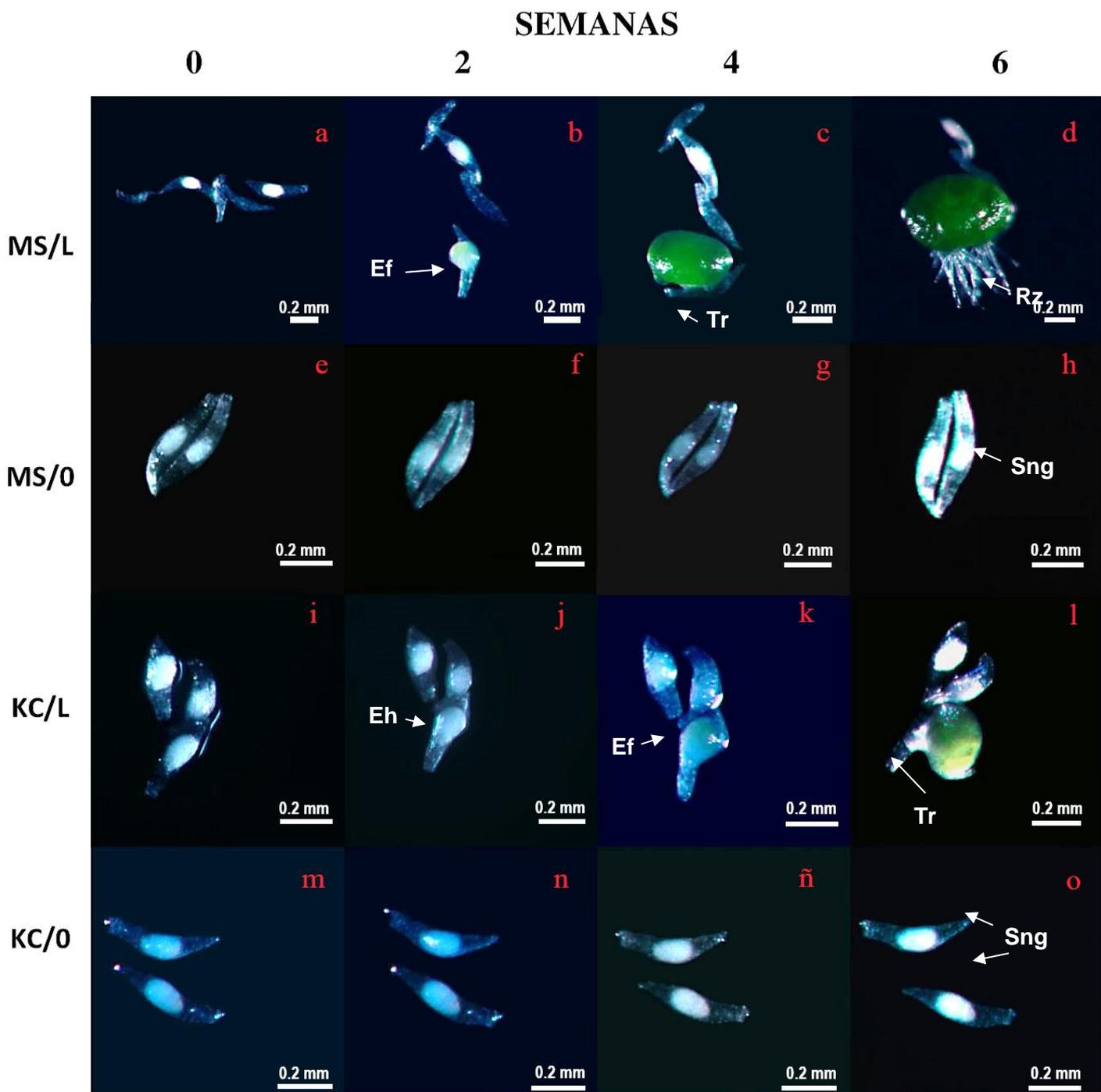


Figura 11. Fases de desarrollo en la germinación de las semillas de *Prosthechea cochleata* a lo largo de seis semanas en medio de cultivo MS 50/100 y KC expuestos a oscuridad y fotoperiodo 16 h luz, 8 h oscuridad. MS/L: Medio MS 50/100 expuesto a fotoperiodo, MS/O: Medio MS 50/100 expuesto a oscuridad, KC/L: Medio KC expuesto a fotoperiodo, KC/O: Medio KC expuesto a oscuridad. Ef: Embrión que muestra inicios de fotosíntesis, dada su coloración verde, Tr: Testa rota, Rz: Rizoides, Eh: embrión hinchado por la absorción de agua del medio, Sng: Semilla sin germinar.

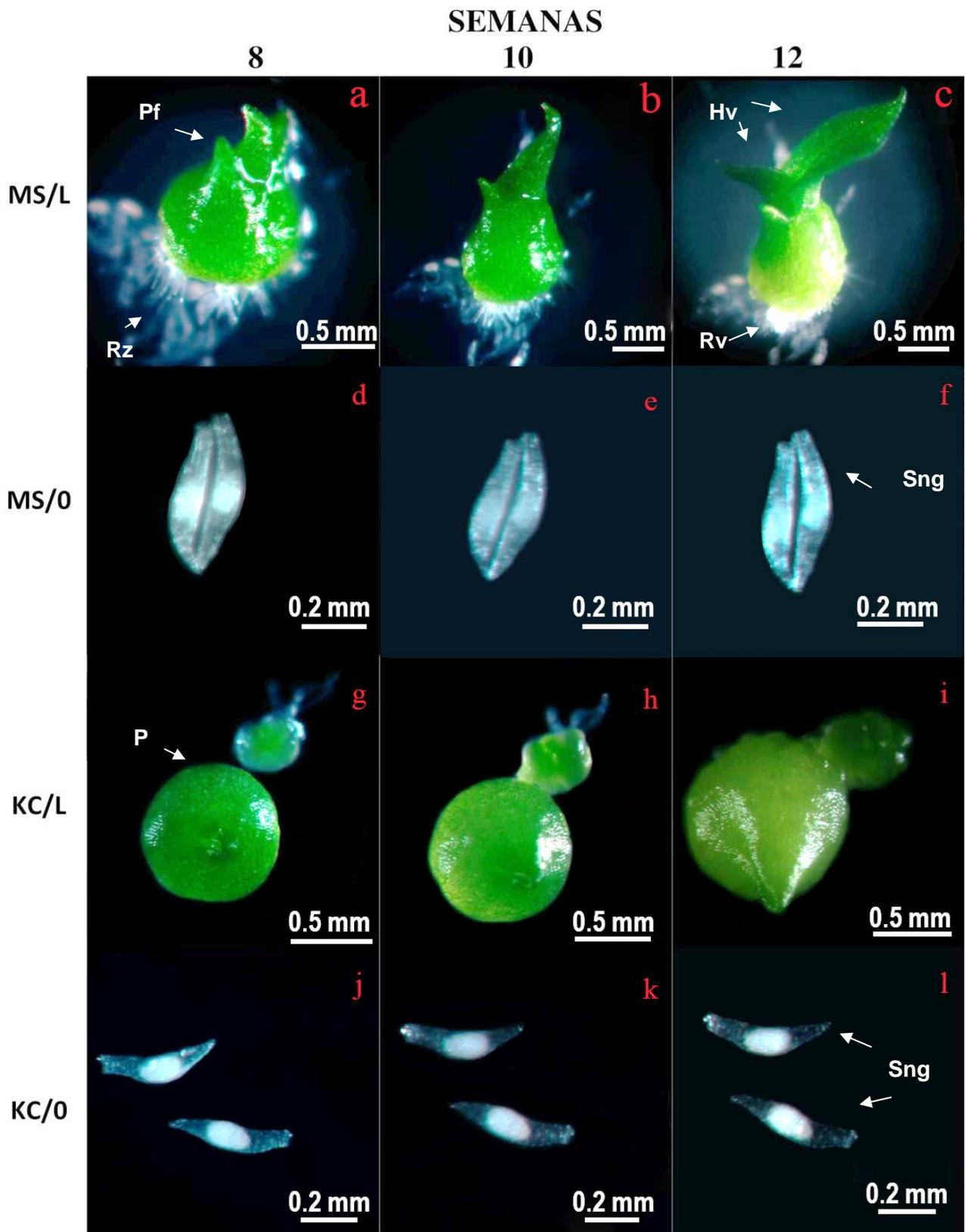


Figura 12. Fases de desarrollo en la germinación de las semillas de *Prosthechea cochleata* de la semana 8 a 12 en medio de cultivo MS 50/100 y KC expuestos a oscuridad y fotoperiodo 16 h luz, 8 h oscuridad. MS/L: Medio MS expuesto a fotoperiodo, MS/O: Medio MS expuesto a oscuridad, KC/L: Medio KC expuesto a fotoperiodo, KC/O: Medio KC expuesto a oscuridad. Rz: Rizoides, Rv: Raíz verdadera, Pf: Primordio foliar, Hv: hoja verdadera, P: Protocormo con ápice en punta, Sng: Semilla sin germinar.

Con base en el desarrollo de los embriones a plántulas, se planteó el siguiente cuadro (Cuadro 11). En el cual se muestran diversas explicaciones de las fases del desarrollo de las semillas de orquídeas, adaptadas por diferentes autores, a partir de las cuales se generó una descripción para la especie en estudio, colocando las semanas que tomó a las semillas llegar a esas distintas fases en medios MS 50/100 y KC.

Cuadro 11. Estadíos de la germinación y desarrollo de las semillas de orquídeas, comparadas en tiempo con el desarrollo observado en las semillas de *Prostachea cochleata* en los medios MS 50/100 y KC.

Fase	Descripción 1*	Descripción 2*	Descripción 3*	Descripción para <i>P. cochleata</i>	Semanas en MS 50/100	Semanas en KC
0		“No germinación”: No ocurre crecimiento del embrión	Semillas con embrión no germinado	Semillas con embrión no germinado	0	0
1	Semilla embebida, embrión hinchado y verde, aun parcialmente cubierto por testa	“Pre-germinación”: el embrión se hincha para llenar testa	Expansión del embrión, ruptura de la testa (germinación)	Embrión hinchado, tornándose verde	2	2-4
2	Embrión agrandado sin testa	“Germinación”: El embrión emerge de la testa	Aparición del protocormo y rizoides	El embrión emerge de la testa	“Germinación”	
					4	6
3	Protocormo con ápice foliar y rizoides	“Protocormo”: El embrión está completamente fuera de la testa	Emergencia y aparición de la primera hoja	Protocormo con ápice foliar y aparición de rizoides	6	8-12
4	Protocormo con hojas en desarrollo y rizoides	“Rizoide”: Se da la formación de rizoides en la superficie del protocormo	Una hoja y aparición de raíces	Protocormo con primordio foliar	8	
5	Plántulas con una o más hojas y una o menos raíces en desarrollo	“Brote”: Brote se diferencia del protocormo	Presencia de dos o más hojas, raíz presente (plántula)	Presencia de dos o más hojas y surgimiento de raíces verdaderas (plántula)	10-12	
6	Raíces evidentes y dos o más hojas					

Tomado de:

1* Kauth, 2005

2* Yamazaki & Miyoshi, 2006

3* Salazar & Cancino, 2012

A los siete meses de iniciar los cultivos, las plántulas se midieron, contabilizando varios aspectos de las mismas como la altura, número de hojas y raíces obteniéndose datos promedio, presentados en el Cuadro 12.

Se obtuvo que el desarrollo de las plántulas en medio KC fue más lento que en medio MS 50/100, en la figura 13 se observan dos plántulas de la misma edad, pero con diferente grado de desarrollo, la plántula de la fig. 13a) presenta tres hojas y raíces verdaderas mientras que la plántula de la fig. 13b) presenta dos hojas sin la presencia de raíces.

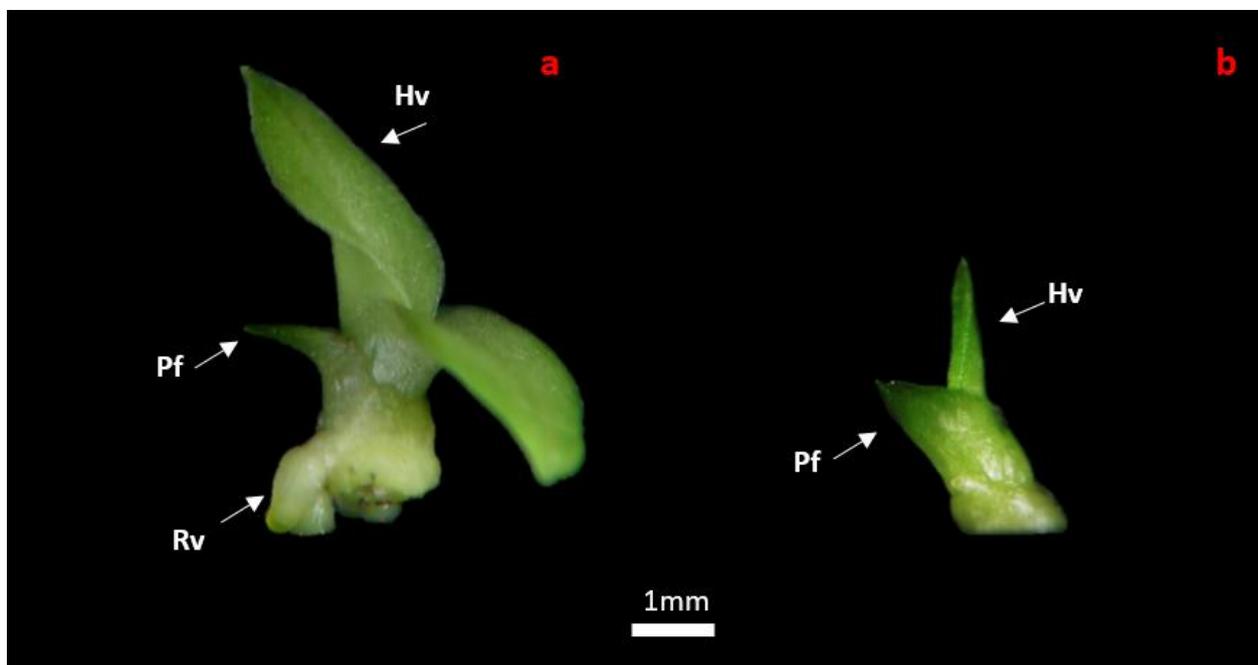


Figura 13. Plántulas de *Prosthachea cochleata* con siete meses de desarrollo, a) Plántula en medio MS 50/100, b) Plántula en medio KC. Pf: Primordio foliar, Rv: Raíz verdadera, Hv: Hoja verdadera.

Este desarrollo diferencial de las plántulas en los diferentes medios de cultivo se encuentra limitado por la composición química de éstos (Cuadro 3). Como se mencionó anteriormente en la sección de germinación, es probable que la ventaja del MS sobre el KC se encuentre en su mayor contenido de nitrógeno total, sobre todo de la forma orgánica, el medio KC contiene como una de sus fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio, en presencia del cual, Gonzáles *et al.* (2012), encontraron que las plantas de *Agave cocui*, tenían el menor crecimiento reflejado en las variables número de brotes, hojas, altura en cm y longitud de las raíces, como una posible consecuencia de la acidificación del medio por la absorción del amonio lo cual puede afectar la absorción de otros nutrientes, así como por el exceso del ion

amonio por acumulación del mismo en el tejido ante la incapacidad de ser metabolizado rápidamente. Adicional a esto es importante mencionar que la concentración de sacarosa en el medio MS (3%) es mayor que la contenida en el medio KC (2%), así como la cantidad de macro y micronutrientes, lo que también puede incrementar el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Cuadro 12. Medidas promedio de plántulas con siete meses de desarrollo en diferentes medios de cultivo.

Elementos adicionales en el medio	MS 50/100		KC	
	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces
Antioxidantes	2	3	2.8	1.3
ANA/BAP	3.6	1.3	2.4	0.08
Antioxidantes ANA/BAP	3.2	1.6	2	0.12
Elementos adicionales en el medio	MS 50/100		KC	
	Altura de las plántulas en cm			
Antioxidantes	0.63		0.33	
ANA/BAP	0.65		0.36	
Antioxidantes ANA/BAP	0.6		0.26	

En el Cuadro 12 se observa la comparación del número de hojas, raíces y altura de las plantas de *P. cochleata*, cultivadas en dos medios de cultivo diferentes (MS 50/100 y KC), adicionados con antioxidantes (Ácido ascórbico y ácido cítrico 100 mg/L), ANA/BA (0.2/1 mg/L) y una combinación de antioxidantes y ANA/BA, la adición de estos componentes fue con la finalidad de frenar y/o reducir la oxidación que presentaron las plantas que se desarrollaron directamente de semillas, sin embargo las diferencias no resultaron significativas entre los tres medios. Las causas que generan la oxidación, así como el mecanismo de acción de los antioxidantes se mencionan más adelante, de igual manera la función de los RCV.

6.4 Desinfección y germinación de semillas maduras en medio MS 50/100 adicionado con 0, 10, 20 y 30% v/v de agua de coco.

La prueba de viabilidad que se realizó en este segundo lote de semillas maduras 19 semanas después de que la cápsula presentó dehiscencia fue de 15.6 % con respecto al total de las semilla (que presentaban o no embrión) y considerando sólo las semillas que presentaban embrión fue de 76.6% de viabilidad. Este porcentaje comparado con el obtenido para las semillas maduras 4 semanas después de que la cápsula presentó dehiscencia (13.5%) resulta superior en casi un 2%, esta variación puede deberse a que el porcentaje obtenido resulta del promedio del conteo de varias muestras, dónde los valores del número de semillas teñidas difieren en poco de cada muestra tomada.

Hay que considerar que las condiciones de almacenamiento de las semillas (baja temperatura y baja humedad) resultaron favorable para evitar la pérdida de viabilidad, lo cual concuerda con lo descrito en Baskin & Baskin (2014), donde mencionan que la conservación de la viabilidad de las semillas de orquídeas de manera *ex situ*, es favorecida por las bajas temperaturas y la disminución de la humedad. De igual manera Seaton & Pritchard (1993) concluyen que para al menos las especies de orquídeas que estudiaron, las características de almacenamiento de las semillas de orquídeas se clasifican como 'ortodoxas' en el sentido de que la longevidad de las semillas mejora al reducir el contenido de humedad (de alrededor del 20% al 5%) y disminuir las temperaturas de almacenamiento (de 62° C a 0° C).

Transcurridas siete semanas de que las semillas fueron cultivadas se estimó el porcentaje de germinación, con respecto al total de semillas que presentaban embrión, en los diferentes tratamientos con agua de coco, obteniéndose los siguientes resultados (Cuadro 13):

Cuadro 13. Porcentajes de germinación de semillas maduras (lote 2, sembradas 19 semanas después de que la cápsula presentó dehiscencia) cultivadas en medio MS 50/100 con diferentes concentraciones (v/v) de agua de coco, a las siete semanas de siembra.

MS 50/100 con AC v/v	0%	10%	20%	30%
Cajas Petri	6.4±1.4 %	5±0.7 %	6.6±0.7%	4±1.6 %
Frascos	9.2±1.6 %	6.8±1.9 %	8.2±2 %	4.8±1.2 %

Se puede observar que solo en una de las combinaciones (Frasco con 0% de AC) el porcentaje de germinación fue mayor (9.2%) que el porcentaje de germinación obtenido para las semillas maduras del lote 1 que se sembraron a un mes de que la cápsula sufrió dehiscencia (8.6 %), se puede atribuir esta diferencia a que el porcentaje de viabilidad fue ligeramente mayor, sin embargo la diferencia no resulta significativa.

El tamaño del envase puede afectar el crecimiento y la morfogénesis *in vitro*. Estos efectos se deben probablemente a las diferentes concentraciones de oxígeno, dióxido de carbono, etileno y otros gases volátiles en el espacio dentro del contenedor. Algunos de los efectos negativos de la acumulación del etileno en el cultivo *in vitro* de diferentes especies reportados son: la disminución de la síntesis de clorofila y cloroplastos, inhibición del movimiento polar de las auxinas, del enraizamiento, del crecimiento celular en los meristemos de las plántulas y la embriogénesis, así como de pasos tempranos del desarrollo de los embriones (George *et al.*, 2008).

En este caso, los porcentajes de germinación en las cajas Petri fueron siempre menor comparados con los obtenidos en los frascos de cultivo. Muñoz *et al.* (2009), reportaron un mayor número de brotes y menor número de explantes oxidados en 2 especies de *Rhodophiala*, cuando éstos fueron colocados en contenedores de 350 mL, comparado con aquellos que fueron colocados en contenedores de 45 mL; McClelland & Smith (1990), encontraron una mejor proliferación de brotes en cultivos de varias plantas leñosas, así como una mayor capacidad de enraizamiento, en recipientes de 200 mL o 350 mL que en tubos de 60 mL. Finalmente Tariqul *et al.* 2005, encontraron un mejor desarrollo y crecimiento de menta *Mentha piperita* en contenedores Magenta™ vessel GA-7, comparado con el desarrollo de matraces Erlenmeyer y tubos de cultivo, pues se obtuvo un mayor número de hojas, y esto se atribuye a que la cantidad de atmósfera y la ventilación fueron comparativamente mayores que en los otros tipos de contenedores.

Con respecto a la adición de agua de coco, se pudo observar que se obtuvo un mayor porcentaje de germinación en el medio de cultivo sin la adición de agua de coco (9.2 %) seguido del obtenido en el medio de cultivo adicionado con 20% de agua de coco (8.2%) y disminuyó en casi un 50 % (4.8%) en el medio con 30% de agua de coco (Cuadro 13). En la literatura se reporta un mayor porcentaje de germinación de semillas de *Brassavola nodosa* en medio KC comparado con medio KC con 15% v/v de agua de coco siendo 78 y 64% los porcentajes de germinación respectivamente (Damon *et al.*, 2004). Sin embargo la

mayoría de la literatura reporta un mejor desarrollo, germinación y crecimiento cuando el medio de cultivo es suplementado con diferentes componentes orgánicos, por ejemplo Salazar & Cancino (2012), reportan para la germinación y desarrollo de plántulas de *Prosthechea vespa* y *Sobralia klotzcheana* un mejor resultado cuando se le adicionó al medio MS, jugo de piña (20% v/v), seguido por el medio MS + agua de coco (20% v/v), comparado con la germinación y desarrollo dados en el medio MS sin la adición de ningún suplemento orgánico. Kitsaki *et al.* (2004), reportaron que el medio de cultivo suplementado con agua de coco (5 y 10% v/v), resultó más eficaz para la germinación y formación de protocormos, a diferencia del medio de cultivo suplementado con jugo de piña (10% v/v), que resultó mejor para el desarrollo de *Ophrys* sp. Abbas *et al.* (2011) encontraron que el mejor medio para la germinación de *Grammatophyllum scriptum* fue el medio KC suplementado con 30% de agua de coco y el mejor medio para el desarrollo de las plántulas fue MS 50% suplementado con 40% de agua de coco. De igual manera Nongrum *et al.* (2007) informaron que la adición del agua de coco al medio de cultivo tuvo un efecto benéfico en la germinación y formación de plántulas de *Coelogyne* sp.

Estas investigaciones que muestran un mejor resultado en la germinación y desarrollo de plántulas de orquídeas cuando se adiciona algún suplemento orgánico, puede ser explicado por las propiedades que estos suplementos aportan, como lo son vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos, auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y salicílico (Yong *et al.*, 2009). El agua de coco agregada al medio de cultivo, ha sido reconocida por inducir la división y crecimiento celular al igual que la morfogénesis (George *et al.*, 2008). No obstante los resultados en el presente estudio, muestran una respuesta no favorable en la germinación de las semillas maduras, mostrando incluso una drástica disminución del porcentaje de germinación (de 9.2% a 4.8%) cuando se adicionó un 30 % v/v de agua de coco al medio comparado con el obtenido en medio sin la adición del suplemento orgánico, pues a pesar de que el agua de coco puede tener un efecto como promotor de crecimiento en algunos tejidos vegetales, la inhibición del crecimiento también ha sido reportado (George *et al.*, 2008). Esta inhibición puede darse debido a que los embriones (semillas puestas a germinar) como se mencionó en el apartado de hormonas vegetales, ya poseen altos niveles de estas (citocininas, giberelinas, auxinas, ácido abscísico) pues son estructuras que se encuentran en crecimiento y división constante, ahora bien, la adición del agua de coco aporta al medio de cultivo RCV en proporciones desconocidas y según la literatura (Mathur, 1993), la exposición a grandes cantidades de RCV pueden inhibir el crecimiento, desarrollo y morfogénesis de los tejidos vegetales.

6.5 Viabilidad y germinación de las semillas inmaduras

En esta etapa fue imposible obtener el porcentaje de germinación dado que al ser una cápsula inmadura, las semillas se encontraban aún aglomeradas en masas, lo cual dificultó la dispersión de las semillas de manera homogénea imposibilitando su conteo. Conforme se fueron desarrollando los protocormos, se realizaron subcultivos para tratar de individualizarlos y darles más espacio para su desarrollo.

El porcentaje de viabilidad obtenido con la prueba de TTZ para las semillas de la cápsula inmadura fue mayor (19.3%) comparado con el obtenido en las semillas del fruto maduro (13.5% y 15.6 %), en la figura 14 se muestran una comparación de las semillas inmaduras y maduras teñidas con TTZ.

A pesar de que, como anteriormente se mencionó, no se pudo obtener el porcentaje de germinación, sí se obtuvo una mayor cantidad de plántulas (no contabilizadas) a partir de la germinación de estas semillas, y esto era de esperarse por tres razones : el método de desinfección que se siguió fue menos agresivo comparado con el que se siguió para la desinfección de semillas maduras, el porcentaje de viabilidad fue mayor, pero sobre todo porque se ha demostrado que las semillas inmaduras de muchas especies de orquídeas germinan más rápidamente y en mayor cantidad que las semillas maduras.

Yamazaki & Miyoshi (2006) encontraron que aquellas semillas de *Cephalanthera falcata* colectadas a los 70 días después de polinizada la flor, presentaron mayores porcentajes de germinación comparados con los encontrados en aquellas semillas colectadas a los 80 días y aún mayor comparado con la germinación de las semillas colectadas a los 100-120 días. Algunos de los factores que pueden contribuir a esta respuesta son: las semillas maduras pueden contener químicos inhibidores como ABA o la ausencia de hormonas promotoras de la germinación, tener una testa impermeable atribuido a la lignificación y cutinización del integumento, mientras que las semillas inmaduras son más permeables al agua (Yamazaki & Miyoshi, 2006; Kauth *et al.*, 2008). Lee *et al.* (2006) encontraron que sustancias cuticulares alrededor del integumento interno y el embrión, crean una barrera hidrofóbica para el agua y la absorción de nutrientes en las semillas de *Paphiopedilum delenatii*. En las semillas con una edad de 150 días, las sustancias cuticulares comenzaron a formar una capa completa alrededor del embrión propiamente dicho, en aquellas semillas con 210 días, las sustancias cuticulares ya envolvían completamente al embrión, en aquellas con 105

días, la capa externa de la testa comenzó a encogerse y comprimir al embrión y en plena madurez la testa se deshidrató completamente y formó una barrera hermética alrededor del embrión (Lee *et al.*, 2006).

La naturaleza impermeable de la testa indica la presencia de latencia física y esto puede ser una ventaja para aquellas semillas que son liberadas en condiciones desfavorables para su germinación, pues les da la oportunidad de sobrevivir por más tiempo en la espera de que las condiciones sean más favorables (Kauth *et al.*, 2008). Para muchas especies de orquídeas se sabe que aún cuando las cápsulas presentan dehiscencia, las semillas son liberadas con un estado poco desarrollado de sus embriones, por lo cual el pensar en que el cultivo de semillas inmaduras pueda ser favorable resulta contradictorio, sin embargo no en todas las especies sucede de esta manera. En el caso de orquídeas diandras como lo son *Paphiopedillum*, *Cypripedium* y en cierta variedad de *P. cochleata* se ha observado que a diferencia de otras especies, estas si presentan un estado desarrollado del saco embrionario antes de la polinización, cuando en otros casos la megasporogénesis depende entre muchas otras cosas de la estimulación de las auxinas del polen para iniciar (Wirth & Withner, 1959).

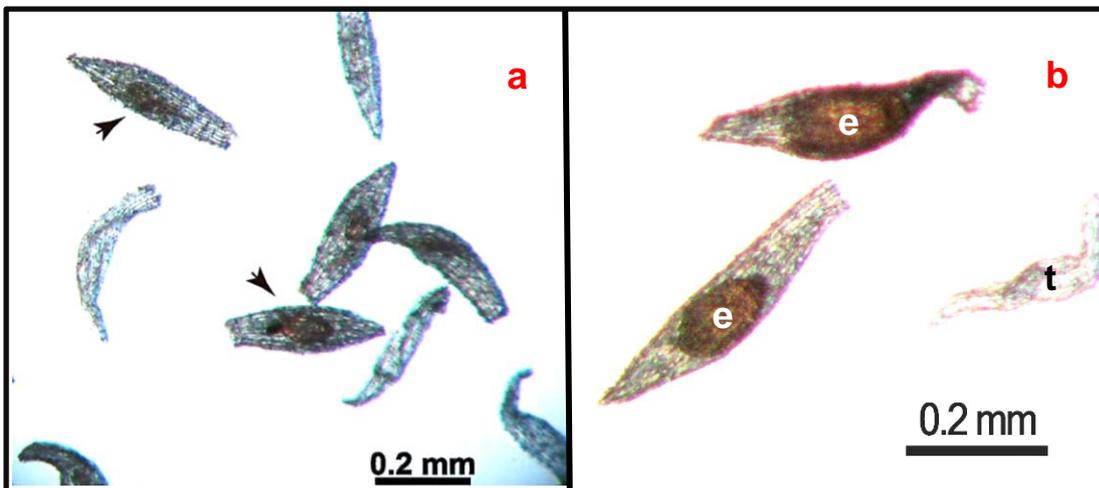
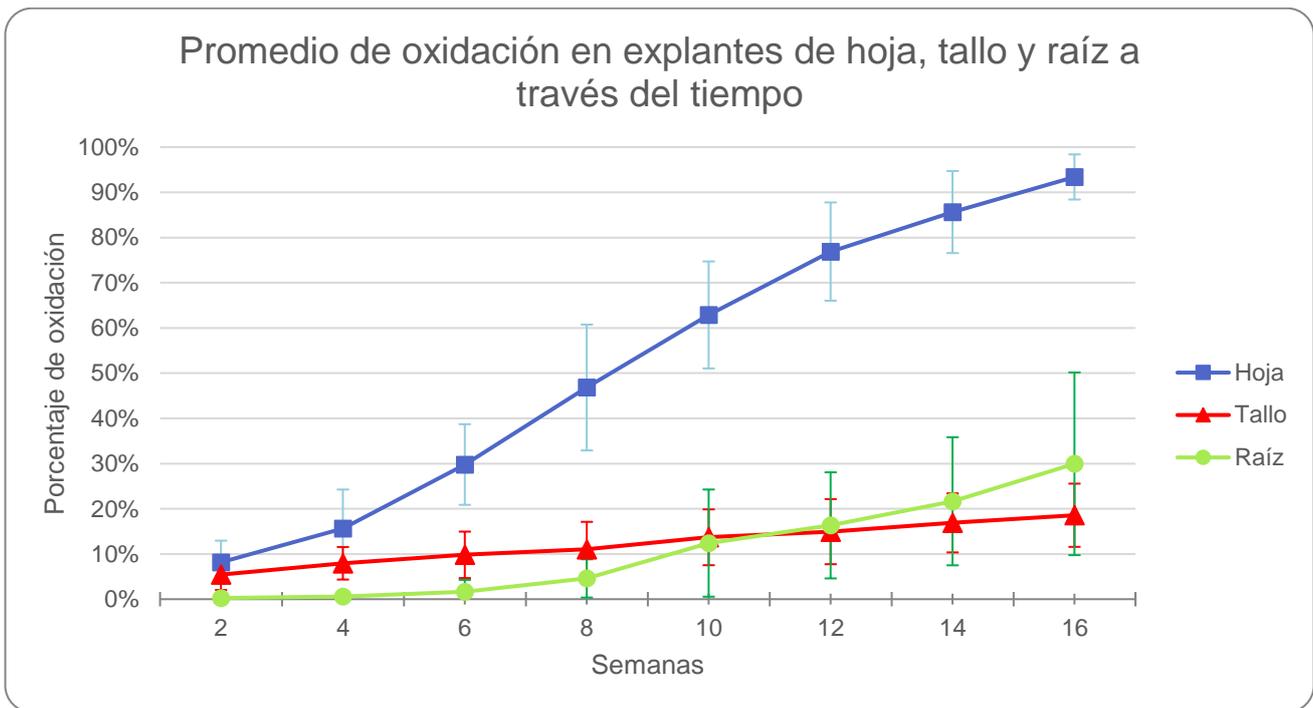


Figura 14. a) Semillas inmaduras de *Prosthechea cochleata* teñidas con TTZ. Se logra ver el poco desarrollo de los embriones comparados con los embriones de las semillas maduras para la misma especie (b). Puntas de flecha: embriones inmaduros, e:embriones maduros, t:testa.

6.6 Inducción de explantes de hoja, tallo y raíz en medio MS 50/100 adicionado con RCV ANA/Kin.

Oxidación de los explantes

Durante los cuatro meses siguientes de realizados los cortes de los explantes se midió el porcentaje de oxidación midiendo la extensión en mm del color pardo o blanquecino que presentaban los explantes, estas mediciones se realizaron cada dos semanas, obteniendo los resultados mostrados en la Gráfica 2. Se obtuvo a las dos semanas un 0.26% de oxidación en los explantes de raíz y menos del 10% de oxidación en tallos y hojas, para la semana cuatro los explantes de raíz seguían siendo los explantes con menor porcentaje de oxidación comparado con los otros dos y los explantes de hoja presentaba el doble de oxidación que los de tallo, ya para la semana seis los explantes de hoja presentaban tres veces más oxidación que los de tallo y 18 veces más que los de raíz, fue hasta la semana 12 que la oxidación en raíces rebasó la oxidación presentada en tallos 21.6 y 16.8% respectivamente. De tal manera que a las 16 semanas el porcentaje de oxidación para tallos, hojas y raíces fue de 18.5, 93.4 y 29.9% respectivamente.



Gráfica 2. Porcentaje de oxidación a través del tiempo en explantes de hoja, tallo y raíz de *Prosthechea cochleata*. Las líneas verticales muestran la desviación estándar.

La oxidación presentada en los explantes de hoja, tallo y raíz se puede atribuir a diversos factores como lo son: las perturbaciones mecánicas, lesiones, heridas debido a disección, a la alta ósmosis debido al alto contenido en sacarosa de los medios, a la nutrición mineral anormal (alta concentración de nitrógeno), a los tratamientos de RCV y la posible acumulación de diferentes gases dentro del recipiente, especialmente el etileno (Gaspar *et al.*, 2002), así como tener en cuenta que el cultivo *in vitro* es un sistema artificial y las

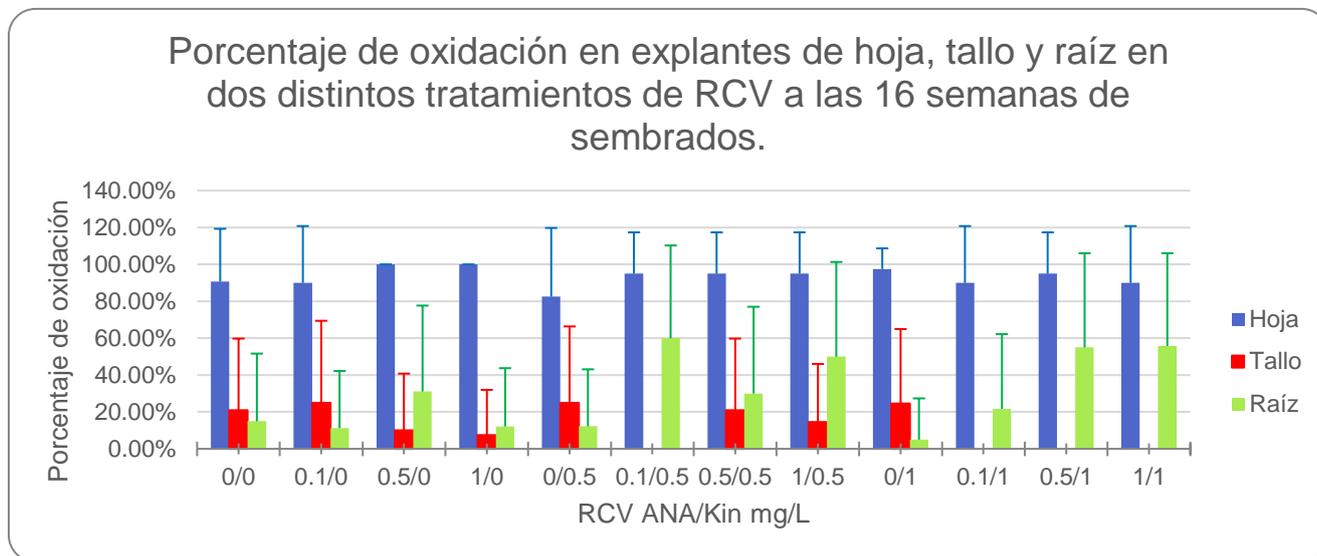
diferencias que puede presentar con un sistema natural (ventilación, sustrato, disponibilidad de agua), además de los factores ya mencionados, pueden propiciar la oxidación.

A pesar de que algunas investigaciones reportan el uso de explantes de hojas para la regeneración de las orquídeas, como es el caso de *Aerides maculosum* donde utilizando medio MS + 2 mg/L BAP obtuvieron a partir de explantes de hoja, la formación de PLB's (Murthy & Pyati, 2001), en este estudio se obtuvo la pérdida total de los explantes de hoja debido a la oxidación de los mismos, la tendencia a la oxidación en este tipo de explante también fue reportado por López (2009), quien observó que los explantes de hoja de *Encyclia adenocaula*, presentaban oxidación de manera más notable comparada con la presentada en los explantes de raíz. Alvarado (2011) menciona que el 100% de los explantes de hoja al mes de cultivo, murieron por oxidación y necrosis. Chen & Chang (2006), cultivaron secciones de hojas de *Phalaenopsis*, en medio MS al 50%, con la adición de ANA a concentraciones de 0, 0.1 y 1.0 mg/L obteniendo la oxidación del tejido sin respuesta alguna.

Este proceso se puede explicar por las siguientes razones: 1) Al realizar los cortes para la obtención de los explantes, se tiene una respuesta al daño causado, comenzando con un aumento local (en la zona de corte) de jasmonato, auxinas y compuestos fenólicos, estos últimos son sustrato de la enzima polifenol oxidasa (PPO) teniendo como producto de la reacción oxidativa a las quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Azofeifa, 2009; da Costa *et al.*, 2013); 2) Los cloroplastos y tejidos foliares, ricos en pigmentos y O₂ en evolución bajo luz, son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) y son los sitios primarios de los daños inducidos por el estrés en las plantas bajo luz, la energía luminosa excesiva provoca una sobre-reducción de la cadena de transporte de electrones, dando lugar tanto a una mayor producción del radical superóxido (O₂⁻) de oxígeno singlete (¹O₂); provocando estas dos especies la peroxidación lipídica, causando daños en la membrana celular, o daños a proteínas por la oxidación de residuos de ciertos aminoácidos (Mano, 2002).

En cultivo *in vitro* otro de los factores que pueden influir en la oxidación de los explantes es la composición del medio de cultivo, en la gráfica 3 se puede observar una mayor tendencia a la oxidación en los explantes de raíz en los tratamientos con una mayor concentración de RCV (1/0.5, 0.5/1, 1/1 mg/L ANA/Kin) donde se alcanzó un rango de oxidación del 50 al

60%, a diferencia de aquellos tratamientos con menores concentraciones de RCV (0/0, 0.1/0, 0/0.5, 0/1 mg/L ANA/Kin) cuyo porcentaje de oxidación se encuentra por debajo del 15%.



Gráfica 3. Porcentaje de oxidación en explantes de hoja, tallo y raíz, con respecto al tratamiento de RCV, a las 16 semanas de siembra. Las líneas verticales muestran la desviación estándar

Los RCV se han asociado con la oxidación en diferentes trabajos, Kuo *et al.* (2005) obtuvieron la regeneración a través de embriones somáticos en hojas de *Phalaenopsis* sp. en diferentes concentraciones y combinaciones de RCV (BA, Kinetina, TDZ y TDZ / 2,4-D) sin embargo cuando los explantes fueron cultivados en medio suplementado con cualquiera de las concentraciones de 2,4-D utilizadas en el estudio (0.1, 0.5 y 1 mg/L) los explantes foliares se necrosaron y no se obtuvieron embriones. Por otro lado Alvarado, (2011), encontró un mayor porcentaje de oxidación en los explantes de ápices de tallo de *Prosthechea chacaoensis*, cuando éstos fueron cultivados en medio con 1, 1.5 y 2 mg/L de ANA, así como con 1.5/1 y 2/1 mg/L de ANA/BA, comparados con aquellos explantes cultivados en medio con concentraciones menores de dichos reguladores. Mathur (1993) logró la formación de callos de *Nardostachys jatamansi* en un medio MS adicionado con 1.6 μ M de ANA, los callos obtenidos a concentraciones más elevados de ANA mostraron altos niveles de oxidación y muerte de tejidos. En *Phyllostachis nigra*, el uso de BAP a 1 – 30 μ M, causó un fuerte oscurecimiento de tejidos (Ogita, 2005).

Regeneración de brotes

De los tres tipos de explantes utilizados, sólo los tallos mostraron una respuesta morfogénica, los explantes de hoja se perdieron por oxidación y los explantes de raíz sólo mostraron elongación (Figura 15), indistintamente del tratamiento en el que se encontraran, presentando esta condición 31 de los 360 explantes de raíz cultivados, es decir un 8.6%. Esta última respuesta tiene que ver con la naturaleza anatómica del explante. Las raíces están conformadas en su extremo apical por una estructura denominada meristemo apical radical (RAM), la cual se encuentra cubierta por capas de células que comprenden la caliptra o cofia, cuando las células en el RAM se dividen, se desplazan apicalmente para contribuir a la caliptra de la raíz o basalmente para contribuir al cuerpo de la raíz (Gallagher, 2013). La zona de alargamiento está confinada al meristemo apical donde tiene lugar la división celular, y la región inmediatamente detrás de ésta, donde se produce el alargamiento predominantemente longitudinal de las células. La división celular no da lugar a la extensión, sino que proporciona la materia prima para la expansión celular posterior y, por lo tanto, no impulsa el crecimiento. En la zona de alargamiento, fuera del meristemo, el aumento de la célula en longitud va acompañado por un gran aumento en el tamaño de la vacuola y el aumento en el área de las paredes laterales de la célula. La elongación de la raíz ocurre, entonces como la suma de la expansión individual cada una de las células a lo largo de un gran número de éstas (Gregory, 2006). Entonces muy probablemente la elongación obtenida en los explantes de raíz, sean el resultado de este proceso natural de división celular en el RAM y la posterior elongación de estas células en el cuerpo de la raíz.



Figura 15. Se muestra en la parte superior un explante de raíz elongado a las 14 semanas de siembra, en la parte inferior se muestra un explante de raíz con el mismo tiempo de siembra, el cual no mostró cambio alguno en tamaño.

Con respecto a los explantes de tallo, de acuerdo a las observaciones, se muestra una gran tendencia a que la vía de regeneración fue por la activación de yemas preformadas, pues la regeneración de los brotes siempre se daba en las mismas zonas (donde se encuentran las yemas axilares) y el crecimiento se presentaba en las mismas direcciones, siguiendo el mismo patrón en la mayoría de los explantes (Figura 16). Esta respuesta comenzó a presentarse a las dos semanas de cultivados los explantes, en los tratamientos control, 0/0.5 y 0.5/0.5 ANA/Kin mg/L, presentándose un brote en uno de los 20 explantes en cada tratamiento.



Figura 16. Brotes regenerados de *Prosthechea cochleata* a partir de explantes de tallo en distintos tiempos. a) 4 semanas en medio MS, b) 10 semanas en medio MS 1/0.5 mg/L ANA/Kin, c) 6 semana procedentes de medio MS 0.5/0.5 mg/L ANA/ Kin, d) 20 semanas procedentes de medio MS 0.5/0.5 mg/L ANA/ Kin . Las flechas rojas indican los brotes.

Después de 16 semanas de cultivo de los explantes de tallo en medio con RCV y medio basal, se obtuvo el número total de brotes regenerados (Cuadro 14), así como el promedio de brotes por explante. Obteniéndose el mayor número brotes en el tratamiento

0.5/0 mg/L ANA/Kin (2.5 brotes por explante), el menor número de brotes (1.1 brotes por explante) en el tratamiento adicionado con 0.1/0 mg/L ANA/Kin y en el grupo control 1.8 brotes por explante. Y aunque el mayor número de brotes se generó en el tratamiento 0.5/0 mg/L de ANA/ Kin, los datos obtenidos en las pruebas estadísticas no arrojaron ninguna diferencia significativa con respecto a los tratamientos utilizados, pues se obtuvo para el total de los tratamientos un valor de P de 0.423, es decir muy por arriba del valor para P que nos indica que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales ($P < 0.05$).

Cuadro 14. Número de brotes regenerados a partir de tallos en los diferentes tratamientos al cabo de 16 semanas de cultivo.

Tratamiento ANA/Kin Mg/L	Número de brotes/tratamiento	PC	PC ox	Tallo ox sin respuesta	Promedio de brotes/ explante	ee
0/0	37	8	8	4	1,85	0,44
0.1/0	23	12	4	4	1,15	0,34
0.5/0	51	12	6	2	2,55	0,62
1/0	32	11	3	6	1,6	0,44
0/0.5	40	16	2	2	2	0,44
0.5/0.5	45	14	3	3	2,25	0,54
1/0.5	44	15	3	2	2,2	0,47
0/1	41	9	9	2	2,05	0,39

PC=Planta completa generada a partir del explante de tallo. ox=Oxidado al 100%. ee= Error estándar.

Al término de 16 semanas después de iniciados los cultivos, se obtuvo un total de 313 brotes a partir de 135 de los explantes de tallo iniciales, 25 explantes de tallo no presentaron respuesta. Además de los 313 brotes regenerados, los 135 explantes de tallo continuaron su desarrollo, para formar de nuevo una planta completa, sin embargo 38 de éstas murieron por oxidación.

El bajo número de brotes regenerados a las 16 semanas de cultivo en la presente investigación (313 a partir de 160 explantes de tallo), comparados con el número de regenerantes obtenidos en otros estudios como en la propagación de *B. scandens*

(Villafuerte, 2013) donde se obtuvo, a las 16 semanas de cultivo, a partir de un total de 180 explantes de tallo (10 mm) un total de 431 PLB's en medio MS 50% y MS y de otros 180 explantes de tallo (5 mm) un total de 896 PLB's bajo tratamientos con concentraciones y tipo de RCV similares, puede estar relacionado con diversos factores que van desde las diferencias genéticas por ser distintas especies, la cantidad de hormonas vegetales endógenas presentes en los individuos y por lo tanto la diferencia en el balance final de hormonas endógenas y RCV adicionados al medio, la probable existencia de una dominancia apical más fuerte en comparación con *B. scandens*, y que aún en presencia de citocininas, algunas yemas laterales no pudieran ser activadas. Las auxinas producidas por el ápice, transportada hacia su base, reprime el transporte de AIA desde los botones o brotes laterales jóvenes por medio de la autoinhibición (auxina producida por el ápice, inhibe la producción de auxina en yemas o brotes laterales) lo que provoca la inhibición de crecimiento de éstos. Las citocininas pueden oponerse a este proceso ya que estimulan fuertemente la exportación al tallo de la auxina de los botones o brotes laterales jóvenes (Jankiewicz & Acosta, 2003).

De acuerdo a la respuesta obtenida con respecto a la formación de brotes en todos los tratamientos, inclusive en el grupo control, sugiere que el contenido endógeno de citocininas en esta especie o al menos en los individuos utilizados, puede ser mayor con respecto al contenido de auxinas, y como se menciona en los antecedentes, la diferenciación de yemas vegetativas y generación de brotes es promovida por un balance auxina/citocinina, favorable hacia las citocininas (Calderon, *et al.* 2011). Las investigaciones de Calderon, *et al.* (2011) reportan que para *Aechmea veitchii*, el cultivo de yemas apicales en medio MS al 100 y 50 % de sales, suplementado con IBA 1mg/L, regeneraron un mayor número de botes adventicios comparado con aquellos explantes expuestos a distintas combinaciones de IBA/ANA/BAP y BAP/ANA, argumentando este resultado producto de la combinación de la auxina exógena con las citocininas endógenas, lo cual potenció la respuesta al desarrollo de brotes en estos explantes. Por otro lado la inducción de yemas axilares de *Dendrobium Longicornu*, obtuvo el mayor número de brotes cuando estos fueron cultivados en medio MS adicionado con BAP/ANA 1.1/2.7 mg/L sugiriendo que la apropiada combinación de auxina citocinina estimula la formación de brotes (Stadwelson, *et al.* 2012).

La respuesta obtenida difiere de otros trabajos realizados en orquídeas del mismo género, o géneros cercanos, como lo fue con *P. chacaoensis*, donde Alvarado (2011) reporta que

el mejor tratamiento en cultivos de ápice de tallo (con respecto al número de regenerantes obtenidos en conjunto PLB's y brotes) fue aquel que contenía una combinación de ANA/BA, 1.0/0.5 mg/L, sugiriendo que a mayores concentraciones de ANA se promovía la formación de PLB's y a mayor concentración de BA, la formación de brotes. En el presente trabajo sólo se obtuvo un promedio de 2.2 ± 0.47 brotes por explante en esa misma concentración de RCV, con la diferencia de que la citocinina utilizada en este caso fue Kin. López (2009), reporta para *E. adenocaula*, el mayor número de brotes generados a partir de explantes de hoja cultivados en medio MS 50% con 1.0/0.1 mg/L de Kin/ANA, para los explantes de tallo 0.5/1.0 mg/L Kin/ANA, además de la formación de PLB's a partir de los explantes de tallo con una concentración de 0.5 mg/L de ANA (concentración con la cual, en el presente estudio se obtuvo el mayor número de brotes por explante pero no indujo la formación de PLB's), es importante mencionar que a partir de explantes de raíz, López (2009) también obtuvo la formación de brotes, en un bajo número en la presencia de Kin 0.5 mg/L. y Kin/ANA 1.0/0.5 mg/L.

Se sabe que el ANA y BAP son RCV efectivos para regenerar plantas en un gran número de orquídeas (Ranjan, 2002). Sin embargo, aun utilizando las concentraciones de RCV con las cuales en trabajos previos se obtuvieron las mejores respuestas morfogénicas, en este caso se hace evidente que los requerimientos de RCV en cuanto a tipo, cantidad y combinación, varían de especie a especie, del tipo de explante, origen del mismo, incluso de la época del año en el cual son tomados.

Enraizamiento de los brotes

El enraizamiento de los brotes ocurrió a las 10 semanas de cultivo [ocho semanas en inducción (Cuadro 8) y dos en medio basal] en aquellos brotes que se generaron en los tratamientos 0.5/0, 1/0 y 0.5/0.5 mg/L ANA/Kin, obteniendo cinco, cuatro y un brotes enraizados respectivamente, el enraizamiento continuó dándose sin la adición de RCV o algún otro componente adicional al medio de cultivo, obteniéndose en la toma de datos final a las 16 semanas de cultivo (Cuadro 15), el mayor número de brotes enraizados, aquellos generados a partir de la exposición de los explantes al tratamiento 0.5/0 mg/L ANA/Kin con un total de 12 brotes enraizados. Esto nos habla de una tendencia al enraizamiento en la presencia de auxinas tanto endógenas como exógenas; lo cual tiene mucho sentido pues se sabe que dentro de las funciones de las auxinas se encuentran estimular la iniciación de las raíces en los tallos y promover la diferenciación de raíces en el cultivo de tejidos, (Davies, 2010). George *et al.* (2008) mencionan que la rizogénesis generalmente se logra

con el tratamiento de auxinas solas, lo cual coincide con que el tratamiento en el que hubo una mayor respuesta de enraizamiento fue aquél que solo tenía ANA.

Cuadro 15. Número de brotes con raíz, a las 16 semanas de cultivo.

RCV ANA/Kin mg/L en el tratamiento de origen de los brotes	Número de brotes totales	Número de brotes enraizados
0/0	37	5 (13.5%)
0.1/0	23	3 (13%)
0.5/0	51	12 (23.5%)
1/0	32	7 (21%)
0/0.5	40	4 (10%)
0.5/0.5	45	4 (8.8%)
1/0.5	44	6 (13.6%)
0/1	41	7 (17%)
Total de botes enraizados a las 16 semanas	313	48

No sólo los brotes generados a partir de los tallos presentaron enraizamiento sino también los explantes como tal (Figura 17), en este caso, las auxinas endógenas producidas en el ápice del tallo, pueden ser transportadas vía basipétala hacia la superficie cortada que en complemento o no de auxinas exógenas promueven el enraizamiento. La mayor parte de las auxinas adicionadas al medio de cultivo actúan en la zona de corte promoviendo la desdiferenciación celular, para más tarde conducir a la generación de un nuevo meristemo radicular (Pop *et al.*, 2011; da Costa, *et al.*, 2013). da Costa *et al.* (2013) concluyen que un alto contenido de auxinas inmediatamente después de realizar los cortes de la planta madre, puede resultar en un mejor enraizamiento. En el tratamiento control también se obtuvo el enraizamiento de los brotes regenerados, así como de los explantes de tallo, lo cual nos habla de un abastecimiento suficiente por parte de las auxinas endógenas y la producción adicional de éstas como respuesta al corte realizado. Alvarado (2011) obtuvo el enraizamiento de los brotes de *Prosthechea chacaoensis*, sin la necesidad de utilizar un medio especial, después de la etapa de inducción, para promover el mismo, tanto en los brotes regenerados en el tratamiento control, como en los brotes de los demás tratamientos, registrando el mayor número de raíces en los brotes regenerados en los medios MS adicionado con 1/0.5 mg/L, 0.5/0.5 mg/L, 1/2 mg/L de BA/ANA, respectivamente.

Ambas respuestas morfogénicas obtenidas, generación de brotes (caulogénesis) y generación de raíces (rizogénesis), pueden atribuirse no sólo a la acción de hormonas

vegetales endógenas y reguladores de crecimiento aplicados exógenamente, sino también, en cierta medida, como se ha mencionado en el último párrafo, al daño promovido por el corte del explante a la hora de individualizarlos, pues provoca la generación de la hormona etileno, que frecuentemente proporciona un estímulo para la formación de tejido no organizado (callo) o brotes y raíces adventicias, generalmente ocurriendo estas respuestas en la superficie cortada del explante como se puede observar en el explante de tallo en la figura 17. Además se sugiere que el corte promueve la transferencia de hormonas endógenas al lugar del daño, causando que haya un nivel más adecuado de promotores de crecimiento para la regeneración, por otro lado la herida permite la entrada de una mayor cantidad de RCV aplicados exógenamente a través de la herida (George *et al.*, 2008).

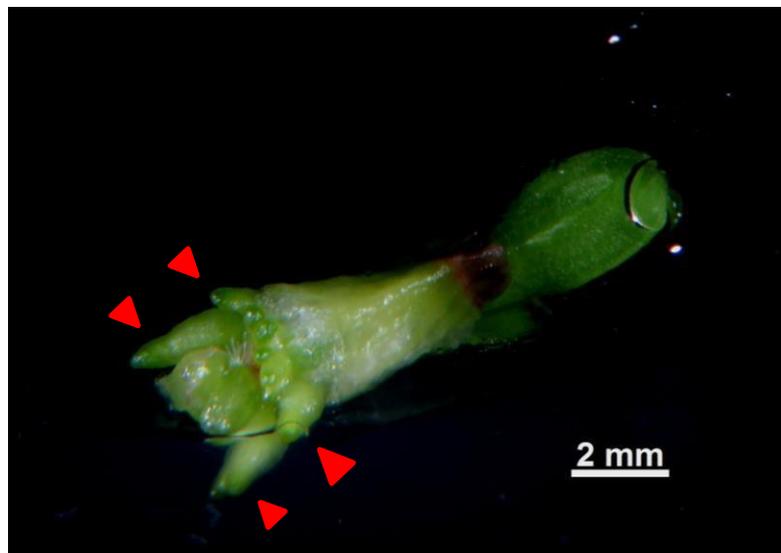


Figura 17. Explante de tallo en medio suplementado con ANA/Kin 1/0.5 mg/L, a las cuatro semanas de cultivo. Las flechas rojas apuntan a las raíces que fueron regeneradas en la superficie cortada del explante.

Finalmente las plántulas obtenidas fueron subcultivadas en medio MS 50/100 adicionado con 0.5 g/L de carbón activado, con la finalidad de promover la regeneración de raíces y el desarrollo de las mismas, así como frenar procesos de oxidación que se presentaron las plántulas, observándose el desarrollo de los nuevos brotes sin problemas de oxidación y las hojas con un color verde más oscuro. Estos efectos se atribuyen a que el carbón activado permite el aumento de la aireación del medio de cultivo, la adsorción del etileno y los productos fenólicos y carboxílicos producidos por los tejidos, los cuales puede inhibir el crecimiento y la diferenciación, y con relación a los cambios que sufre el medio de cultivo después del autoclaveado, el carbón activado adsorbe el 5- hydroxymethylfurfural, que se forma por la el rompimiento de algunas moléculas de sacarosa durante este proceso, el

cual es un compuesto inhibidor del crecimiento (Arditti, 2008). Esta adsorción es dada por la estructura del carbón, la cual consiste en una red muy fina de poros con gran área de superficie interior en la que muchas sustancias pueden adsorberse.

Algunos trabajos en orquídeas hablan de los efectos positivos del uso de carbón activado en el enraizamiento y la prevención de la oxidación. En la orquídea terrestre *Cymbidium faberi* para el enraizamiento de los brotes se empleó carbón activado junto con ANA en medio MS modificado y se observó un 90% de enraizamiento en este medio (Chen *et al.*, 2005). En *Cypripedium flavum*, el enraizamiento máximo (100%) de los brotes se observó en medio Harvais al 50% suplementado solamente con 0.6 g/L de carbón activado. Siendo 0.6 g/L la cantidad más adecuada para la inducción de raíz comparado con menores concentraciones, los autores concluyeron que el carbón creó una oscuridad parcial similar al ambiente subterráneo de los hábitats de *C. flavum*, siendo ésta probablemente la causa del aumento del enraizamiento (Yan *et al.*, 2006). Rodríguez *et al.* (2005) concluyen que el uso del carbón activado en el medio de cultivo tuvo un efecto positivo para la germinación *in vitro* de las semillas de orquídeas que sembraron, contrarrestando la fenolización.

6.7 Aclimatización

Se tomaron datos de supervivencia de las plantas en proceso de aclimatización (Figura 18) a las dos y cuatro semanas de extraídas de los frascos, obteniéndose un 97.5% y 86.25% de supervivencia respectivamente. Este porcentaje se encuentra dentro del rango de porcentajes citados en varios trabajos de aclimatización, Villafuerte (2013) obtuvo, en plantas de *Barkeria whartonia* y *Barkeria scandens* (con al menos 8cm de altura, cinco hojas y raíces), un porcentaje de supervivencia del 80% a los cuatro meses de aclimatización, utilizando el mismo tipo de sustrato que se empleó en la aclimatización de *P. cochleata* en este estudio; Alvarado (2011), obtuvo para plantas de *Prosthechea chacaoensis* de 3.5 cm de largo y con al menos un pseudobulbo, un porcentaje de supervivencia del 95% a los cuatro meses de extraídas las plantas de los frascos, utilizando como sustrato una mezcla de sphagnum + agrolita y posteriormente el uso de troncos, Ávila & Salgado (2006) reportan en especies como *Laelia autumnalis*, *Laelia albida*, *Encyclia citrina*, utilizando como sustrato una mezcla de tezontle y corteza de encino, relación 1:1, porcentajes de supervivencia por arriba del 70%.



Figura 18. Plantas en proceso de aclimatización en mezcla de sustrato tepojal:corteza:agrolita:peat moss 2:1:1:1 v/v.

Un mayor tamaño en longitud de las plantas, así como la presencia de por lo menos un pseudobulbo, pudo haber mejorado la supervivencia de las mismas, aun presentándose el incidente por el exceso de agua. Se sabe que los pseudobulbos juegan un papel muy importante en el crecimiento y supervivencia de las orquídeas pues participan como órganos de almacenamiento de agua que resulta muy útil cuando se presentan condiciones de sequía en el ambiente, la mayoría de los pseudobulbos poseen una cutícula gruesa lo cual los hace totalmente impermeables al agua (punto por el cual la presencia de éste pudo haber sido crucial para la supervivencia de las plantas cuando se presentó el exceso de agua), participa en la acumulación de nutrientes minerales como N y P, manteniéndolos como una fuente de reserva, es un órgano que participa en la fotosíntesis, aumentando así la producción de carbohidratos, funcionando también como una reserva de estos (Yew & Hew, 2000).

Nava, *et al.* (2011), observaron que en el proceso de aclimatización de *Laelia eyermaniana*, las plantas pequeñas (menores a 1.5 cm) murieron a diferencia de las grandes (mayores a 3 cm), probablemente por no presentar un pseudobulbo desarrollado y por lo tanto, no tener la posibilidad de acumular agua en cantidades suficientes como para lograr su supervivencia.

Las mezclas de sustratos pueden influir en el porcentaje de supervivencia y en el desarrollo de las plantas. Es aconsejable emplear los sustratos en los cuales las especies

normalmente se desarrollan pues su naturaleza se encuentra adaptada a crecer ahí, es por eso que para la aclimatización de *P. cochleata* se utilizaron como componentes principales el tepojal y la corteza de pino, pues en el medio crecen sobre pinos o encinos o bien sobre peñas o laderas. Con respecto al tipo de sustrato empleado para la aclimatización, dentro de lo que se pudo observar los primeros 30 días, es que la mezcla resultaba favorable para el desarrollo de las plántulas ya que presentaba un buen drenaje y aireación, propiedades conferidas principalmente por el tepojal y la agrolita, buena retención de humedad conferida por el peat moss, la corteza favoreció el desarrollo de la planta y de raíces que comenzaban a adherirse de esta. Se tuvo que tener especial cuidado con el riego y la ventilación del sustrato, pues el exceso de humedad podría haber favorecido la aparición de hongos y/o bacterias en el sustrato.

7. CONCLUSIONES

Viabilidad, conteo y caracterización de las semillas maduras

- Las características morfológicas de las semillas maduras, tales como largo y ancho, se encontraron dentro de los rangos establecidos para las semillas de las orquídeas y fueron similares a las reportadas en la literatura para *P.cochleata* siendo el peso la única característica que se encontró por debajo de los rangos reportados.
- La prueba de TTZ resultó efectiva para determinar la viabilidad de las semillas, obteniendo a las 4 y 19 semanas después de abierta la cápsula, una viabilidad de 73.5% y 76.6% respectivamente.

Desinfección, establecimiento y germinación *in vitro* de las semillas maduras e inmaduras

- El método de desinfección empleado para las semillas maduras resultó en un establecimiento aséptico del 100%, sin embargo pudo ser a su vez un factor que afectara la tasa de germinación, resultando a las 7 semanas de siembra bajos porcentajes de germinación (8.6% en MS 50/100 y 3.84% en KC).
- El método de desinfección empleado para la cápsula que contenía las semillas inmaduras (flameado de la cápsula), permitió el establecimiento aséptico del 100% de las semillas.
- El porcentaje de germinación de las semillas maduras, fue mayor en medio MS (8.6

%) que en el medio KC (3.8 %).

- La luz fue un factor indispensable en la germinación de las semillas, ya que se vio que las semillas que se encontraban en oscuridad no presentaron germinación después de 10 semanas de observación.
- El desarrollo de los embriones a plántulas se vio favorecido en el medio MS 50/100 comparado con el desarrollo obtenido en el medio KC, sucediendo la germinación a las cuatro y seis semanas, la polarización de los protocormos y aparición de los rizoides ocurrió a las seis y 8-12 semanas, el surgimiento de raíces verdaderas a las 8 y +12 semanas, la presencia de 2 o más hojas verdaderas a las 10-12 y +12 semanas, en medio MS 50/100 y KC respectivamente.

Germinación de semillas maduras en medio MS 50/100 adicionado con 0, 10, 20 y 30% v/v de agua de coco

- El mayor porcentaje de germinación de semillas maduras se observó cuando éstas fueron sembradas en frascos (9.2%), comparada con la germinación en cajas Petri (6.4%).
- La adición del agua de coco al medio de cultivo no favoreció el aumento de los porcentajes de germinación de las semillas. Presentándose un mayor porcentaje de germinación en el medio MS 50/100 sin la adición de agua de coco (9.2%) comparado con los porcentajes obtenidos en los medios adicionados con 10, 20 y 30% de agua de coco, donde se obtuvo un 6.8, 8.2 y 4.8% de germinación respectivamente a las siete semanas de iniciados los cultivos.

Inducción de explantes de hoja, tallo y raíz en medio MS 50/100 adicionado con RCV ANA/Kin.

- El 100% de los explantes de hoja, se necrosaron y murieron debido a la oxidación después de las 16 semanas de cultivo.
- El 8.6% de los explantes de raíz sólo presentaron elongación, el 29.9% murieron por oxidación y el 61.5% no presentaron cambio alguno en las 16 semanas de cultivo.
- Se presentó una mayor tendencia a la oxidación en los explantes de raíz expuestos a las mayores concentraciones de RCV. Alcanzando un rango de oxidación del 50 al 60%, en los tratamientos con 1/0.5, 0.5/1, 1/1 mg/L ANA/Kin a diferencia de aquellos tratamientos con menores concentraciones de RCV, cuyo porcentaje de oxidación se encontró por debajo del 15%.

- Los únicos explantes que presentaron una respuesta morfogénica fueron los explantes de tallo, a través de la vía de activación de yemas preformadas.
- Los tallos expuestos a 0.5/0 mg/L de ANA/Kin fueron los que presentaron en promedio el mayor número de brotes por explante a las 16 semanas de cultivo, obteniendo un promedio de 2.5 brotes por explante, el menor número de brotes, 1.1, en el tratamiento adicionado con 0.1/0 mg/L ANA/Kin y en el grupo control 1.8 brotes por explante.
- Se obtuvo la generación de brotes en los tallos cultivados en todos los tratamientos con RCV, inclusive en el grupo control, lo cual nos habla de que la respuesta morfogénica no es exclusiva a la adición de RCV, pero si estimularon una mejor respuesta.
- No fue necesaria el empleo de medios de cultivo de enraizamiento pues éste se presentó de manera espontánea a las 10 semanas de cultivo, sin la adición de algún RCV adicional que indujera dicha respuesta. Sin embargo, el mayor número de brotes con raíz se observó en aquellos regenerados a partir de tallo en el tratamiento 0.5/0 mg/L ANA/Kin con un total de 12 brotes con raíz.
- El uso de 0.5 g/L de carbón activado en el medio de cultivo redujo la oxidación de los brotes regenerados, permitiendo un mejor desarrollo de los mismos.
- La mezcla de sustrato empleada para la aclimatización (tepojal:corteza:agrolita:peat moss 2:1:1:1) resultó efectiva para las primeras etapas de aclimatización de las plantas de *P. cochleata*, obteniéndose un porcentaje de supervivencia de 86.25% al cabo de 4 semanas de estar en condiciones *ex vitro*.

8. PERSPECTIVAS

En el presente estudio se logró la regeneración de la orquídea *P. cochleata*, pero no en la cantidad suficiente para considerar los protocolos aquí seguidos como métodos eficientes para su propagación, sin embargo esta investigación (ya que se enfoca en la generación de conocimientos sobre la propagación de esta especie), puede resultar de gran importancia para el establecimiento de futuros protocolos de multiplicación. Se sugiere considerar para posteriores investigaciones:

- El uso de semillas que se encuentren cerca a la dehiscencia de la cápsula, para que la desinfección se realice a ésta y no directamente a las semillas. Y de esta manera evitar la pérdida de viabilidad de las semillas por el contacto directo con las soluciones desinfectantes.
- En el caso de iniciar con semillas maduras de una cápsula dehiscente, reducir la

concentración de hipoclorito de sodio al 5-7%, y/o reducir el tiempo de exposición al mismo, para de esta manera (reducir el posible estrés) lograr mayores porcentajes de germinación.

- Para evitar el uso de mayores concentraciones de RCV, puesto que se trata de la propagación con fines de conservación, se sugiere hacer uso de protocormos o secciones de estos como explantes iniciales, pues las concentraciones de hormonas vegetales se encuentran de manera elevada en este tipo de estructuras, comparada con estructuras ya diferenciadas como hojas o raíces, dado que al ser tejidos en desarrollo presentan altas tasas de división celular, proceso regulado por estas sustancias, además de que son estructuras embriogénicamente predeterminadas, por lo cual se podría dirigir una respuesta morfogénica diferente a la que se logró en la presente investigación (activación de yemas preformadas) como lo es la generación de PLB's.
- Se sugiere la aclimatización de plantas de mayor tamaño (mayores a 5 cm de altura) y con un mayor número de raíces y hojas (arriba de 2-3), de las aquí aclimatizadas, y preferentemente con la presencia de algún pseudobulbo para elevar el porcentaje de supervivencia. Así como monitorear el proceso de aclimatización por un periodo más largo para que los porcentajes de aclimatización obtenidos resulten más confiables y de esta manera poder definir de manera más certera si el uso del sustrato empleado resulta efectiva.

Si bien *P. cochleata*, no se encuentra catalogada como especie bajo peligro de extinción, las presiones ejercidas por el saqueo y pérdida de hábitat, van en incremento, ya se reportan pérdidas importantes en sus poblaciones como la ya mencionada en la región del Soconusco, Chiapas, donde pasó de ser una especie muy abundante a encontrarse restringida a tan solo algunos fragmentos de bosque tropical y plantaciones de café (Del Mazo & Damon, 2006). De tal manera que la búsqueda de un protocolo para su propagación no está de más, pues este tipo de investigaciones generan conocimientos y desarrollos tecnológicos como alternativas para contribuir a la conservación de las especies vegetales, que si bien no se encuentran bajo riesgo, podrían llegar a estarlo, se contribuye a la posibilidad de abastecer plantas para los mercados a nivel nacional e internacional, se abre la posibilidad de generar planes de reforestación y el mantenimiento de relaciones ecológicas de esta especie con otros organismos, el mantenimiento de servicios ecosistémicos locales y del país. Se pueden generar empleos, incrementar el turismo, conservar cultura local, la posibilidad de realizar estudios por parte de otras ciencias y

explorar su potencial con fines diversos como por ejemplo medicinales, alimenticios, e industriales.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, B., Heningtyas , F., & Amriati, B. (2011). *In vitro* seeds germination and plantlets development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae). *International Research Journal of Plant Science*, 2(5), 154-159.
- Alvarado, J. (2011). *Regeneración in vitro de Prosthechea chacaoensis (Richb. f.) W.E. Higgins* (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Álvarez, V., Gui, A., & Nunes, V. (2006). Seed disinfestations methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira*(24), 217-220.
- Araya, E., Gómez, L., Hidalgo, N., & Valverde, R. (2000). Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de Jaul (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense*, 24(1), 75-80.
- Arditii, J. (2008). *Micropropagation of Orchids* (2 ed., Vol. 1). Blackwell Publishing.
- Ávila, I., & Salgado, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *BIOLÓGICAS* (8), 138-149.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Baran, T., & Ghosh, B. (2005). *Plant Tissue Culture: Basic and Applied*. India: Universities Press.
- Baskin, C., & Baskin, J. (2014). *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination* (2 ed.). USA: Academica Press Elsevier.
- Bektas, E., Cüce, M., & Sökmen, A. (2013). *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. *Turkish Journal of Botany*(37), 336-342.
- Bellone, R. (2006). *Orquídeas. Guía del aficionado*. Barcelona: OMEGA.

- Beltrán, M. C., & Martínez, J. (1996). Orquídeas medicinales en la flora cubana. *Natura Medicatrix*(43), 42-43.
- Billard, C. E., Dalzotto, C. A., & Lallana, V. H. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*(38), 145-157.
- Boeri, P. (2015). Nutrientes para las plantas de probeta. Medios de Cultivo-Reguladores de Crecimiento. En S. Sharry, M. Adema, & W. Abedini, *Plantas de probeta; Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pág. 46-72). Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata.
- Calderón Arias, A. M., Restrepo Gómez, A., & Urrea Trujillo, A. I. (2011). Morfogénesis *in vitro* a partir de yemas apicales y bases de hojas de las especies de bromelias *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*. *Actualidades Biológicas* , 23(94), 17-33.
- Campbell, N., & Reece, J. (2007). *Biología* (7 ed.). España: Médica Panaericana.
- CCA. (2005). EL comercio ilegal de flora y fauna silvestres. Perspectiva de América del Norte. Montreal, Canadá. Obtenido de <http://www3.ccc.org/islandora/en/item/2226-illegal-trade-in-wildlife-north-american-perspective-es.pdf>
- Chen, J. T., & Chang, W. C. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, 50(2), 169-173
- Chen, Y., Liu, X., & Liu, Y. (2005). *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(2), 247-251.
- CONABIO. (2000). *Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. México.
- da Costa, C., Almeida, M., Ruedell, C., & Schwambach, J. (2013). When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Plant Science*, 4(133), 1-19.

- Damon, A., Aguilar, E., Rivera, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 195-203.
- Davery, M., Montagu, M. V., & Inzé, D. (2002). Ascorbate Metabolism and Stress. En D. Inzé, *Oxidative Stress in Plants*. Londres: Taylor & Francis Editorial.
- Davies, P. (2010). Introduction. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. En P. Davies, *Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action!* (3 ed., págs. 1-15). N. Y. , U.S.A: Springer.
- De la Fuente, B., & Staines, L. (1998). *La pintura mural prehispánica en México, II Área Maya Bonampak*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Del Mazo, A., & Damon, A. (2006). Comparison of floral fragrance components of species of *Encyclia* and *Prosthechea* (Orchidaceae) from Soconusco, southeast Mexico. *Lankesteriana*, 6(3), 83-89.
- Departamento de biotecnología India*. (04 de Julio de 2016). Obtenido de <http://www.dbtindia.nic.in/improving-agricultural-yield-and-quality-through-tissue-culture-technology/>
- Díaz, L., Namur, J., & Bollati, S. (2006). Efecto del ácido cítrico y del carbón activado en la regeneración de plantas de orquídeas (*Laelia lundii*) por cultivo in vitro de semillas. *Congreso Argentino de Floricultura. Jornadas Nacionales de Floricultura*. Buenos Aires.
- Dirks-Mulder, A., Ahmed, I., Broek, M., Krol, L., Menger, N., Snier, J., . . . Gravendeel, B. (2019). Morphological and Molecular Characterization of Orchid Fruit Development. *frontiers in Plant Science*, 10(137), 1-18.
- Dressler, R. (2005). How Many Orchid Species? *Selbyana*, 26(1,2), 155-158.
- Embajada de Belice*. (2013). Obtenido de https://www.embelize.org/?page_id=307

- Espinosa, D., Ocegueda, S., Aguilar, C., & Llorente, J. (2008). El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. En J. Sarukhán, *Capital Natural de México. Conocimiento actual de la biodiversidad* (Vol. 1, págs. 33-65). México: CONABIO.
- Estrela, C., Estrela, C., Barbin, E., Spanó, J., Marchesan, M. A., & Pécora, J. D. (2002). Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. *Braz Dent J*, 13(2), 113-117.
- Flores, A., & Valencia, S. (2007). Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation*(136), 372-387.
- Florida's Regulated plant index. (2016). Obtenido de <https://www.flrules.org/gateway/ruleNo.asp?ID=5B-40.0055>
- Gallagher, K. L. (2013). Cellular Patterning of the Root Meristem: Genes and Signals. En A. Eshel, & T. Beeckman, *Plant Roots, The Hidden Half* (4 ed., págs. 3-1-3-26). USA: CRC Press.
- García, J., Sánchez, L. M., Jiménez, R., & Solano, R. (2003). Orchidaceae, Tribu Epidendreae. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*(119), 1-175.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J. F., & Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37(3), 263-285.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3 ed.). Netherlands: Springer.
- González, M., Mogollón, N., Alvarado, G., & Capote, T. (2012). Efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento del cocuy (*Agave cocuy trelease*). *Bioagro*, 24(1), 39-44.
- Gregory, P. J. (2006). Roots and the architecture of roots systems. En P. J. Gregory, *Plant Roots. Growth, activity and interaction with soils*. India: Blackwell Publishing.
- Gutting, A., Zettler, J. A., Zettler, L. W., & Richardson, L. W. (2015). An Update on Mealybugs and Scale Insects (Hemiptera) on Native Epiphytic Orchids in South Florida, Including a New

record for *Pseudococcus microcirculus* (Pseudococcidae). *Florida Entomologist*, 98(2), 401-404.

Hammer, R. L. (1984). The native orchids of Florida. En K. W. Tan (Ed.), *Proceedings of the eleventh world orchid conference*, (págs. 202-204). Miami.

Higgins, W. (1997). A reconsideration of the genus *Prosthechea* (Orchidaceae) *Phytologia*, 82(5), 377.

Higgins, W. (2003). *Prosthechea*: a chemical discontinuity in Laeliinae. *Lankasteriana*, 7, 39-41.

Jankiewicz, L. S., & Acosta, C. (2003). Auxinas. En L. S. Jankiewicz, *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción* (págs. 21-66). México: Mundi Prensa.

Kauth, P. (2005). *In vitro seed germination and seedling development of Calopogon tuberosus and Sacoila lanceolata var. lanceolata. Two Florida native terrestrial orchids* (tesis de Maestría). University of Florida, Florida.

Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T.R., Stewart, S. Kane, M. & Vendrame, W. (2008). *Techniques and applications of in vitro orchid seed germination*. J.A. Teixeira da Silva (Ed.) Floriculture, Ornamental and plant biotechnology: Advances and Tropical Issues, global Science Books, Iselworth, UK, 375-391.

Kauth, P. J., Vendrame, W. A., & Kane, M. E. (2006). *In vitro seed culture and seedling development of Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 91-102.

Kitsaki, C. K., Zygouraki, S., Ziobora, M., & Kintzios, S. (2004). In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species (Orchidaceae). *Plant Cell Rep*(23), 284-290.

Krupnick, G. A., McCormick, M. K., Miranda, T., & Whigham, D. F. (2013). The Status and Future of Orchid Conservation in North America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 99(2), 180-198.

- Kuo, H.-L., Chen, J.-T., & Chang, W.-C. (2005). Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis "Little Steve"*. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 453-456.
- Lee, H. E., Laguna, A., Murguía, J., Iglesias, L., García, B., Escobedo, D., . . . Santana, N. (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *In vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(4), 323-332.
- Lee, Y.-I., Yeung, E., Lee, N., & Chung, M.-C. (2006). Embryo Development in the Lady's Slipper Orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with Emphasis on the Ultrastructure of the Suspensor. *Annals of Botany*, 98, 1311-1319.
- Llorente, B. E. (2000). *Aislamiento, purificación, caracterización y producción In vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche* (tesis de Doctorado). Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- Llorente, J., & Ocegueda, S. (2008). Estado del conocimiento de la biota. En J. Sarukhán, *Capital Natural de México. Conocimiento actual de la biodiversidad* (Vol. 1, págs. 283-322). México: CONABIO.
- López, G. (2009). *Regeneración in vitro de Encyclia adenocaula (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae)* (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Mano, J. (2002). Early events in environmental stresses in plants- induction mechanisms of oxidative stress. En D. Inzé, & M. Montagu, *Oxidative Stress in Plants* (págs. 267-302). Londres: Taylor & Francis.
- Mathur, J. (1993). Somatic embryogenesis from callus cultures of *Nardostachys jatamansi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(2), 163-169.
- Matkowski, A. (2008). *Plant in vitro* culture for the production of antioxidants- A review. *Biotechnology Advances*, 26, 548-560.
- Mayo, A., Cázares, J. G., de la Cruz, E., & Flores, A. (2010). *Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco*. Villahermosa: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

- McClelland, M. T., & Smith, M. A. (1990). Vessel Type, Closure, and Explant Orientation Influence in vitro Performance of Five Woody Species. *Horticulture Science*, 25(7), 797- 800.
- Menéndez, V., Arbesú, R., Somer, M., Revilla, A., & Fernández, H. (2011). From Spore to Sporophyte: How to Proceed In Vitro. En H. Fernández, A. Kumar, & M. A. Revilla, *Working with Ferns. Issues and Applications* (págs. 97-110). Springer.
- Mó, E., Cetzal-ix, W., Carnevali, G., Pérez, E., & Basu, S. (2014). A new natural hybrid between *Prosthechea cochletata* and *P. radiata* (Orchidaceae) from alta Verapaz, Guatemala. *Turkish Journal of Botany*, 38, 988-998.
- Munguía, G., Vázquez, L. M., & López, J. A. (2010). Plantas silvestres ornamentales comercializadas en los mercados de la flor de Tenancingo y Jamaica, México. *Polibotánica*(29), 281-308.
- Muñoz, M., Seemann, P., Jara, G., & Riegel, R. (2009). Influence of vessel type, physical state of medium and temporary immersion on the micropropagation of three *Rhodophiala* species. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(4), 581-587.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murthy, H. N., & Pyati, A. N. (2001). Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 37(2), 223-226.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T. R., Seaton, P. T., & Pritchard, H. W. (2011). Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science*, 23(2), 204-2012.
- Naranjo, E. J., & Dirzo, R. (2009). Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna. En J. Sarukhán, *Capital Natural de México. Estado de Conservación y Tendencias de Cambio* (Vol. 2, págs. 247-276). México: CONABIO.
- Nature Serve explorer (2020). Obtenido de https://explorer.natureserve.org/Taxon/ELEMENT_GLOBAL.2.145879/Prosthechea_cochleata

- Nava, J. J., Jiménez, A. R., De Jesús, A., Arenas, M., Ventura, E., & Evangelista, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatización de plantas de *Laelia Eyermanian* Rchb. f. generadas *in vitro*. *Polibotánica* (32), 107-117.
- Navarro, L. C. (2007). Large scale commercial micropropagation in Mexico. The experience of Agromod, S. A. de C.V. *Acta Horticulturae*, 748, 91-94.
- Ngezahayo, F., & Liu, B. (2014). Axillary bud proliferation approach for plant biodiversity conservation and restoration. *International Journal of Biodiversity*, 1-9.
- Nikishina, T. V., Popov, A. S., Kolomeitseva, G. L., & Golovkin, B. N. (2001). Effect of Cryoconservation on Seed Germination of Rare Tropical Orchids. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(6), 810-815.
- Nongrum, I., Kumaria, S., & Tandon, P. (2007). Influence of *In vitro* Media on Asymbiotic Germination, Plantlet Development and Ex Vitro Establishment of *Coelogyne ovalis* Lindl. and *Coelogyne nitida* (Wall. ex Don) Lindl. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 73(4), 205-207.
- Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*, 22(2), 119-125.
- Ossenbach, C., Arce, J., & Warner, J. (2007). Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: I. Maduración, viabilidad y longevidad de semillas. *Tierra Tropical*, 3(1), 75-83.
- Parthibhan, S., Franklin, J. H., Muthukumar, M., Ahamed, N., Senthil, T., & Rao, M. V. (2012). Influence or nutritional media and photoperiods on *in vitro* asymbiotic seed germination and seedling development of *Dendrobium aqueum* Lindley. *African Journal or Plant Science*, 6(14), 383-393.
- Pop, T. I., Pamfil, D., & Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Not Bot Hort Agrobot Cluj*, 39(1), 307-316.
- Preil, W. (2003). Micropropagation of ornamental plants. En M. Laimer, & W. Rücker, *Plant Tissue Culture. 100 years since Gottlieb Haberlandt* (págs. 115-133). Springer.

- Purohit, S. D. (2013). *Introduction to Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Delhi: PHI Learning.
- Radice, S. (2010). Morfogénesis. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski, *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II* (págs. 26-33). INTA ArgenBio
- Ranjan, N., Sahoo, S., Patnaik, S., & Prasad, S. (2002). Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*, 94(1-2), 107-116.
- Ray, H., McCormick, J., Stice, A., Stocks, I., & Zettler, L. (2012). Occurrence of Boisduval Scale, *Diaspis boisduvalii* (Hemiptera: Diaspididae), on Native Epiphytic Orchids in Collier Co., Florida, Including Fakahatchee Strand State Preserve. *Florida Entomologist*, 95(2), 312-318.
- Ray, H., Stuhl, C., & Gillett-Kaufman, J. (2018). Floral fragrance analysis of *Prosthechea cochleata* (Orchidaceae), an endangered. *Plant Signaling & Behavior*, 13(1).
- Read, P. E., & Preece, J. E. (2014). Cloning: Plants-Micropropagation/Tissue Culture. En N. K. Van, *Encyclopedia of Agriculture and Food systems* (Vol. 1, págs. 317-336). USA: ELSEVIER.
- Roca, W., & Mroginski, L. A. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cali: CIAT.
- Rodríguez, L., González, R., Díaz, A., Fajardo, E., Sánchez, E., Hernández, J., . . . González, J. (2005). Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. Cuba. Obtenido de <http://www.dama.gov.co/>
- Rodríguez, L., Valles, J. R., González, R., Alvarado, K., Telles, E., Díaz, A., & Sánchez, E. (2001). Germinación asimbiótica in vitro de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. *Bioteconología vegetal*, 1(2), 115-116.
- Salazar, G. A. (2009). Orquídeas. En A. Lot, & Z. Cano, *Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel* (págs. 153-169). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Salazar, S. A., & Cancino, G. O. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana Biotecnológica*, 14(1), 53-59.

- Sánchez, F. H., Taketoshi, A., Arroniz, S., Gómez, A., & Gómez, L. (2009). Comparación de la acción bactericida del hipoclorito de sodio y Microcyn 60. *Revista Odontológica Mexicana*, *13*(1), 9-16.
- Sarkar, A. (2009). *Plant Stem Cells*. Nueva Delhi: DPH.
- Seaton, P. T., & Pritchard, H. W. (1993). Orchid Seed Storage: Historical Perspective, Current Status, And Future. *Selbyana*, *14*, 89-104.
- Semarnat. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF).
- Smith, R. H. (2013). *Plant Tissue Culture. Techniques and experiments* (3ed.). Texas: Elsevier Academic Press.
- Stadwelson, D., Suman, K., & Pramod, T. (2012). Multiple shoot induction from axillary bud cultures of the medicinal orchid, *Dendrobium longicornu*. *AoB PLANTS*, 1-7.
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, *86*, 147-158.
- Tariqul, M., Dembele, D. P., & Keller, E. R. (2005). Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *81*, 123-130.
- Téllez, M. A. (2011). *Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México (con énfasis en los géneros Stanhopea y rhynchostele y en las especies Prosthechea citrina, Prosthechea vitellina, Encyclia adenocaula, Laelia speciosa, Laelia gouldiana)*. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Téllez, M. A., & Flores, L. (2007). *Orquídeas terrestres del Pedregal de San Ángel*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- The Plant List*. (2013). Obtenido de <http://www.theplantlist.org/>

- Villafuerte, A. (2013). *Micropropagación de Barkeria whartonia y Barkeria scandens (Orchidaceae), especies mexicanas en peligro de extinción* (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Villareal, B. (2015). ¿Cómo se forman las nuevas plantas in vitro?. Morfogénesis in vitro, organogénesis, embriogénesis somática. En M. A. S. Sharry, *Plantas de probeta; Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (págs. 92-101). Buenos Aires.
- Villaseñor, J. L. (2004). Los géneros de las plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*(75), 105-135.
- Villaseñor, J. L., & Ortiz, E. (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de la Biodiversidad*(85), s134-s142.
- Winkelman, T., Geier, T., & Preil, W. (2006). Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tissue Organ Culture*(86), 319-327.
- Wirth, M., & Withner, C. L. (1959). Embryology and development in the Orchidaceae. En C. L. Withner, *The Orchids. a scientific survey* (págs. 155–188). New York: The Ronald Press Company.
- Yamazaki, J., & Miyoshi, K. (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98, 1197-1206.
- Yan, N., Hu, H., Huang, J.-l., Xu, K., Wang, H., & Zhou, Z.-k. (2006). Micropropagation of *Cypripedium flavul* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 113-117.
- Yew, C. K., & Hew, C. S. (2000). Orchid pseudobulbs - "false" bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival! *Scientia Horticulturae*, 83, 165-172.
- Yong, J. W., Ge, L., & Ngin, S. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14, 5144-5164.

Zettler, L., Poulter, S. B., & McDonald, K. I. (2007). Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a micorrhizal fungus. *HortScience*, 42(1), 135-139.

Zimmerman, R. H., & Barnhill, J. (1993). Commercial micropropagation in North America. En P. C. Debergh, & R. H. Zimmerman, *Micropropagation. Technology and Application* (págs. 173-180). Kluwer Academic Publishers.