



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del tamaño del explante en la  
propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina*  
(Orchidaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

**SARAI ZAMORA CORTEZ**



DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ana Laura López Escamilla

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS

### 1. Datos del alumno

Sarai Zamora Cortez  
[oziris358@gmail.com](mailto:oziris358@gmail.com)  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
311016176

### 2. Datos del tutor

Dra. Ana Laura López Escamilla  
Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales  
Instituto de Biología, Tlaxcala  
Universidad Nacional Autónoma de México

### 3. Datos del sinodal 1

Dr. Eduardo Alberto Pérez García  
Laboratorio de Ecología y Diversidad Vegetal  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Autónoma de México

### 4. Datos del sinodal 2

M. en C. Alma Yadira Martínez Rendón  
Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales  
Instituto de Biología, sede Tlaxcala  
Universidad Nacional Autónoma de México

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C. María de los Ángeles Aída Téllez Velasco  
Área de Colecciones del Jardín Botánico  
Universidad Nacional Autónoma de México

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C. Laura Patricia Olguín Santos  
Invernadero  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Autónoma de México.

### 7. Datos del trabajo escrito

Efecto del tamaño del explante en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* (Orchidaceae).  
47p  
2021

El presente trabajo se desarrolló en el Invernadero de la Facultad de Ciencias de la UNAM dentro de las actividades del taller “Biología de la Reproducción, Propagación y Fisiología de Angiospermas que Viven en Ambientes Contrastantes” y en el Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales, Instituto de Biología, UNAM-Tlaxcala, bajo la dirección de la Dra. Ana Laura López Escamilla.

## Agradecimientos

A la Dra. Ana Laura López Escamilla, Académico del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biología, UNAM-Tlaxcala por su apoyo y dirección en el desarrollo del presente trabajo.

A la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, por su asesoría y sugerencias durante la fase experimental de esta tesis, así como por facilitar las instalaciones del Invernadero de la Facultad de Ciencias y los insumos para la ejecución del misma.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, responsable académico del Invernadero de la Facultad de Ciencias, por permitir el uso de los laboratorios del Invernadero para el desarrollo de este proyecto.

Al proyecto PAPIME PE211817, a la Dra. Judith Márquez Guzmán responsable, y a los participantes en el Invernadero el Dr. Javier Andrés Juárez Díaz y la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, por los recursos que permitieron la infraestructura adecuada en el Invernadero Templado de la Facultad de Ciencias para la realización de este trabajo.

Agradecimiento a la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León por el apoyo técnico proporcionado durante el desarrollo de mi trabajo de tesis, en el Taller de Biología de Plantas I y II de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A la M. en C. Argelia Díaz Rico por el uso de las cámaras de ambiente controlado para la incubación de los cultivos *in vitro*.

A las profesoras Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Karina Jiménez Durán, Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, M. en C. Laura Patricia Olgún Santos y Dra. Margarita Collazo Ortega del Taller Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes por las aportaciones y sugerencias durante el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Dr. Eduardo Alberto Pérez García por su asesoría y conocimiento en la fase de aclimatización de esta tesis, así como por facilitar las instalaciones Orquideario MAS-FC-UNAM.

A los sinodales, Dr. Eduardo Alberto Pérez García, M. en C. Alma Yadira Martínez Rendón, M. en C. María de los Ángeles Aída Téllez Velasco y a la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, por sus valiosos comentarios y observaciones al trabajo escrito.

## **Dedicatoria**

A mis padres, María de los Ángeles Cortez Ánzo y Abel Javier Zamora García por su maravilloso apoyo a lo largo de cada etapa y sobre todo de la universitaria, con mucho, mucho amor.

A mi hermano, Javier Zamora Cortez por su amistad y apoyo.

A mi abuelita, María de los Ángeles Ánzo Aranda por su amor y palabras de aliento, te quiero mucho.

En memoria de mi abuelito, Ismael Aranda, gracias, por tanto.

A mi mejor amiga Haydee Alejandra Hernández por su hermoso apoyo a lo largo de mi vida y en especial en esta etapa por sus palabras de apoyo.

A mi familia en general, con mucho cariño.

Al Taller de Ciencia para Jóvenes 2012 CGEO – CEIEPAA proyecto PAPIME PE100912 por impregnarme de motivación e inspiración en el futuro camino que recorrería y recorreré en la ciencia.

Resumen	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes	4
1.- Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	4
Etapas de la morfogénesis <i>in vitro</i>	4
Respuestas morfogénéticas	5
Etapas de la micropropagación	6
2.- Factores que influyen en la micropropagación	6
Edad fisiológica del explante	10
Tamaño del explante	10
Tipo de explante	11
3.- Problemática en la familia Orchidaceae	11
El género <i>Stanhopea</i>	11
<i>Stanhopea tigrina</i> Bateman	14
4.- Estrategias de conservación	16
Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas	16
Medios para el cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas	18
Cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Stanhopea</i>	19
III. Justificación	22
IV. Hipótesis	22
V. Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
VI. Materiales y métodos	23
Material biológico	23
Desinfección y siembra de semillas	23
Desarrollo de protocormos y plántulas	24
Análisis estadístico	26
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
Germinación <i>in vitro</i>	28
Fase de inducción	31
Fase de proliferación	32

Tratamiento BA 1 mgL <sup>-1</sup>	32
Tratamiento con BA 5 mgL <sup>-1</sup>	34
VIII. Conclusiones	39
Anexos	40
Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) y preparación a partir de soluciones stock concentradas.	40
Anexo 2. Descripción botánica de <i>Stanhopea tigrina</i>	41
Bibliografía	42

## Resumen

Se analizó y evaluó el efecto del tamaño de los explantes en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina*, especie que presenta un alto valor ornamental y que, debido a la sobrecolecta y destrucción de su hábitat, se encuentra en la lista NOM-059-SEMARNAT-2010 bajo la categoría de riesgo “Amenazada”. Por ello, el estudio de las óptimas respuestas morfológicas para su micropropagación es muy relevante para ayudar a la conservación de esta especie. El tamaño del explante es importante para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, ya que existe un tamaño mínimo que depende de la especie y del tejido vegetal, y por debajo del cual no se obtienen respuestas morfogénicas. Conocer el potencial regenerativo de los explantes es importante para la obtención de un mayor número de regenerantes. El objetivo del trabajo fue determinar el tamaño mínimo de los explantes de *Stanhopea tigrina* para promover la formación de brotes en dos concentraciones de 6-bencilaminopurina. Se utilizaron cultivos preexistentes y semillas los cuales fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) basal para obtener plántulas del tamaño adecuado para posteriormente diseccionarlas y utilizar como explante el tallo en diferentes intervalos de tamaño (1-3, 3.1-5, 5.1-10 y 10.1-15 mm). Para la fase de inducción se utilizó como control el medio MS basal y dos tratamientos con la citocinina 6-bencilaminopurina (BA) (1 y 5 mgL<sup>-1</sup>) y para la penúltima fase de proliferación se subcultivaron en medio MS. Las mejores respuestas morfogénicas se dieron en los explantes de mayor tamaño 10.1-15 mm con el tratamiento BA 5 mgL<sup>-1</sup> obteniendo en promedio 9.27 brotes por explante. El 100 % de sobrevivencia *ex vitro* se obtuvo de las plántulas procedentes del tratamiento BA 1 mgL<sup>-1</sup> independientemente del tamaño del explante inicial. De esta manera, se pudo determinar el mejor tamaño del explante y concentración de citocinina que favorece la micropropagación de esta especie.

## I. Introducción

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permiten entre otras cosas la propagación masiva de especies de interés económico y/o ecológico, uno de los aspectos importantes a considerar es el tamaño del fragmento inicial (explante) que dará paso a la eficiente micropropagación. Mroginsky y Roca (1993) señalan que la elección adecuada y el tamaño del explante son importantes, si este es grande es posible que dé lugar a la formación de un tejido indiferenciado llamado callo, pero a la vez a una mayor probabilidad de contaminación por microorganismos. Por otro lado, el empleo de explantes muy pequeños conlleva la elaboración de medios de cultivo más complejos para que puedan prosperar (Mroginsky *et al.*, 2010).

Existen diversos reportes sobre la importancia del tamaño del explante principalmente en especies de interés comercial como en cultivares de *Musa* (Sandoval y Müller, 1992; Orellana *et al.*, 2002) y palma (Viñas y Jiménez, 2011).

En orquídeas, generalmente se establecen asépticamente las semillas para promover su germinación (Damon *et al.*, 2004; Ávila y Salgado-Garciglia, 2006; Flores-Escobar *et al.*, 2008) y obtener plántulas, o que, en la etapa de desarrollo de estas, los protocormos, hojas y pseudobulbos sean empleados como fuente de explantes (Ávila y Salgado-Garciglia, 2008; Flores-Escobar *et al.*, 2011).

La evaluación del tamaño adecuado del explante en orquídeas ha sido poco explorado, sólo algunos trabajos lo señalan, como el de Ávila y Salgado-Garciglia (2006), que mencionan la selección de protocormos de 2 a 3 mm de diámetro para realizar la micropropagación de nueve especies y, el de Flores-Escobar *et al.* (2011) quienes realizaron lo mismo para *Brassia verrucosa*.

En el género *Stanhopea* no existen registros del estudio del tamaño óptimo del explante para su propagación *in vitro*. Por ello en el presente trabajo se analizaron los efectos de diferentes intervalos de tamaño del explante en dos concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA). *Stanhopea tigrina*, es una especie que tiene gran

importancia ornamental por su llamativa y peculiar flor, habita principalmente en Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Veracruz (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007) y se encuentra en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie amenazada (A) (SEMARNAT, 2010), debido a la deforestación de su hábitat natural, su compleja y poca germinación simbiótica, baja tasa de repoblación, así como la colecta y saqueo ilegal de ejemplares silvestres.

El presente estudio aportará información sobre la concentración del regulador de crecimiento y tamaño de explante óptimo con una mayor proliferación de brotes de *Stanhopea tigrina*, para contribuir así a su conservación *ex situ*, y con ello aminorar el saqueo y el comercio ilegal de estas especies.

## II. Antecedentes

### 1.- Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* es una herramienta biotecnológica que comprende un amplio grupo de técnicas basadas en la teoría de la totipotencialidad [(Totuspotens: totus (todo), potens (poder o habilidad)] en donde las células son cultivadas, excluyendo toda clase de microorganismos patógenos (condiciones asépticas) en medios de cultivo con una composición químicamente definida y variables ambientales controladas como temperatura, humedad e iluminación, para dar diversas respuestas morfogénicas como la activación de yemas axilares, la formación de brotes y de embriones somáticos, precedidos por la formación de callo (organogénesis/embriogénesis indirecta) o a partir del tejido inicial (organogénesis/embriogénesis directa) (Arditti, 1967, Pierik, 1990; Villalobos y Thorpe, 1991; Arditti y Ernst 1992; Iriondo, 2001; Mroginski *et al.*, 2003; Chawla, 2004; Caponetti *et al.*, 2005; Buenavista, 2010; Organista, 2015).

En condiciones de cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo regenerando embriones o brotes, raíces y/o flores, como respuesta a un estímulo (Feri y Paul, 2000). La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar para los tres tipos de morfogénesis citadas. De Klerk y sus colaboradores en 1997 denominaron a estas diferentes fases como fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización (citado por Radice, 2010).

#### **Etapas de la morfogénesis *in vitro***

La regeneración es un proceso que comprende tres diferentes fases (Radice, 2010):

- 1) Adquisición de la competencia: en esta fase las células adquieren la competencia organogénica durante la etapa de desdiferenciación.
- 2) Inducción: las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de

reguladores del crecimiento adicionados el medio de cultivo y el órgano a desarrollar.

- 3) Realización: en esta última fase las células presentan continuas divisiones para formar el órgano determinado.

### **Respuestas morfogénicas**

La organogénesis es la diferenciación de órganos a partir de meristemos formados de células o tejidos cultivados; dichos meristemos pueden dar lugar a una planta. La formación de una nueva planta puede darse por la activación de yemas axilares preexistentes o de inducción de yemas adventicias. La activación de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago o brote, esto último generalmente en ausencia del regulador (Olmos *et al.*, 2010).

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas en cultivo, estos embriones siguen las mismas etapas de desarrollo que los embriones cigóticos, pero no son el resultado de la fecundación de los gametos. Las principales diferencias de la embriogénesis con respecto a la organogénesis, se da en que la producción de tallos y raíces es un proceso organogénico independiente, mientras que los embriones resultantes de un proceso de embriogénesis somática germinan dando lugar a un tallo y una radícula simultáneamente al igual que ocurre con una semilla (López y Olguín, 2013).

La formación de brotes, órganos o embriones somáticos que se desarrollan a partir del explante se conoce como organogénesis directa, por el contrario, si a partir del explante se observa la proliferación desordenada de células y sin ninguna función predeterminada (callo) y posteriormente la diferenciación de órganos o embriones somáticos se denominará organogénesis indirecta y embriogénesis somática indirecta (Radice, 2010).

## **Etapas de la micropropagación**

La propagación por cultivo de tejidos vegetales (CTV) o micropropagación se divide en cinco etapas (Olmos *et al.*, 2010, López y Olguín 2013):

- Etapa 0: Se selecciona el material vegetal, manteniendo adecuadamente las plantas madre, que son la fuente de explantes tomando en cuenta que se deben conservar saludables.
- Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico de explantes a partir de la planta madre, los cuales se lavan y desinfectan, para posteriormente ser colocados en un medio de cultivo.
- Etapa II: Multiplicación de brotes o de embriones somáticos utilizando medios de cultivo específicos adicionados con reguladores de crecimiento.
- Etapa III: Elongación y enraizamiento de los brotes regenerados *in vitro* y/o germinación de los embriones somáticos, dando lugar a un tallo y una radícula simultáneamente al igual que ocurre en una semilla germinada.
- Etapa IV: Transferencia de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*, que consiste en la reducción gradual de la humedad relativa, el incremento de la intensidad luminosa, en la reducción de nutrientes y sacarosa para incrementar la sobrevivencia de los regenerantes. Este proceso es denominado aclimatización.

La aclimatización se puede realizar utilizando bolsas de plástico sobre las macetas, con túneles de PVC, láminas de plástico transparente que cubran las plantas trasplantadas al invernadero o cámaras de crecimiento de ambiente controlado (Vázquez, 1994; citado por Cruz, 2006).

Para el establecimiento de los cultivos, es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante y la planta madre (donadora del explante), el medio de cultivo y las condiciones físicas de incubación.

## **2.- Factores que influyen en la micropropagación**

Existen factores importantes que deben considerarse y que influyen en los sistemas de micropropagación. Como son: **la planta donadora del explante, el**

**explante, los factores físicos, el medio de cultivo y reguladores del crecimiento vegetal (RCV).**

El estado fisiológico de la **planta madre** influye en la capacidad de respuesta de los tejidos *in vitro* si las plantas donantes tienen diferentes edades fisiológicas habrá que considerar proporcionar distintos requerimientos nutricionales y hormonales (Styer *et al.*, 1983 citado por Villalobos y Thorpe, 1991), lo que puede influir también en la respuesta del explante dependiendo del tamaño.

El segundo elemento son los **factores físicos** como la luz y la temperatura, que han sido estudiados ampliamente. Se estima que la temperatura óptima para la propagación en la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C, así como utilizar un fotoperiodo determinado induce el desarrollo de raíces y tallos con un alto éxito en la propagación (Chée y Pool, 1982).

El tercer componente por considerar es el **medio de cultivo y los RCV**, el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo (composición química y su forma física) (Gamborg *et al.*, 1976 citado por Villalobos y Thorpe, 1991). Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos (Mroginsky *et al.*, 2010).

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas. Se debe incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl) que las células requieren, así como de compuestos orgánicos requeridos para la nutrición de las plantas, una fuente de carbono y un agente gelificante (en el caso de los medios semisólidos) (Eskew *et al.*, 1984; Mroginski y Roca, 1993).

En la actualidad uno de los medios más utilizados es el Murashige & Skoog (1962) (Anexo 1).

Para promover las respuestas morfogénicas, al medio de cultivo se le adicionan **RCV**, los cuales están conformados por moléculas pequeñas, de estructura química relativamente simple; que no cuentan con grupos proteicos asociados y están presentes en todas las plantas. Estas sustancias permiten regular todas las

respuestas de crecimiento y desarrollo durante la ontogenia de las plantas (Overbeek, 1954). A diferencia de las hormonas animales, algunos de los RCV pueden tener acción en los mismos sitios de su síntesis. En ciertos casos la presencia y acción conjunta de dos RCV (por ejemplo, auxina y citocinina) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica en un tejido de acuerdo con los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas (Jordán y Casaretto, 2006).

Los RCV más empleados en el cultivo *in vitro* son las **auxinas y citocininas** y de acuerdo con su proporción pueden conducir a la formación de brotes, alternativamente de raíces y/o a la proliferación de callo (Figura 1) (Jordán y Casaretto, 2006).

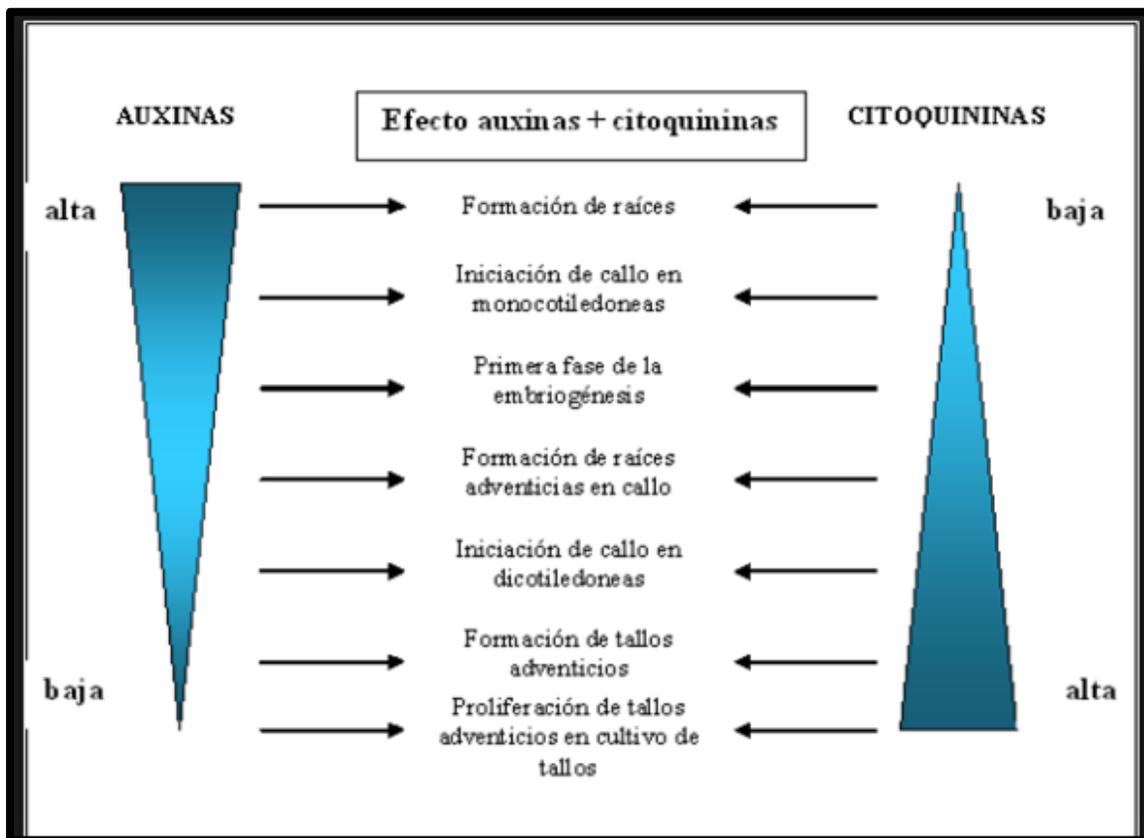


Figura 1. Respuestas morfogénicas que se pueden obtener al aplicar la combinación de los RCV auxina y citocinina. Tomado de: <http://cv.udl.cat/cursos/76304/t5/t5.html>, 22 de febrero del 2019.

Las **citocininas** intervienen en varios procesos fisiológicos, como el desarrollo del meristemo floral, la ruptura de la dormición de la yema, la germinación y crecimiento de la semilla y durante la formación de gametos y embriones. También parece mediar muchos aspectos del desarrollo regulados por la luz, como la diferenciación de los cloroplastos, el desarrollo del metabolismo autotrófico y la expansión del cotiledón y la hoja. Presenta un papel en la regulación de la senescencia, así como en varios aspectos de los procesos celulares, destacando entre ellos el control de la división celular en el crecimiento y desarrollo (Gan y Amasino, 1996; Taíz y Zeiger, 2006). Como reguladores de crecimiento vegetal, los más empleados son benciladenina (BA), Kinetina (K), Zeatina (ZEA).

Las **auxinas** como compuestos naturales o sintéticos presentan actividades biológicas similares a la del ácido indol acético (AIA), tienen la capacidad de promover la elongación celular en el coleóptilo y las secciones del tallo, la división celular en cultivos de callos en presencia de citoquininas, la formación de raíces adventicias en hojas y tallos cortados y otros fenómenos del desarrollo relacionados con la acción del AIA. Las más empleadas como reguladores de crecimiento son: ácido indolbutírico (AIB), ácido indol acético (AIA), ácido naftalenacético acético (ANA), ácido 2,4–diclorofenoxiacético (2,4-D) y picloram.

El rango de concentración empleado varía con el regulador del crecimiento, por ejemplo, el 2,4-D se utiliza en concentraciones de 0.81- 7.11 mgL<sup>-1</sup> mientras que el AIB, tiene en un rango de 0.02 a 0.40 mgL<sup>-1</sup> (Olmos *et al.*, 2010).

El gradiente longitudinal de auxinas desde el tallo a la raíz afecta a varios procesos del desarrollo, como son la elongación del tallo, la dominancia apical, la reparación de heridas y la senescencia de las hojas (Taíz y Zeiger, 2006).

El cuarto factor importante es el **explante**, el cual es un tejido (células somáticas) que se aísla del resto de la planta, y pueden ser fragmentos de hojas, tallos, raíces, y pétalos, entre otros, con excepción de óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticas (Ramos, 2012). Es importante considerar varios aspectos de los explantes como son: la **edad fisiológica**, **tamaño**

**y tipo** y en gran medida esto depende de la especie con la que se esté trabajando y de los objetivos que se persigan (Aceves y Hernández, 1997; Montoya, 1991).

### **Edad fisiológica del explante**

Tiene gran influencia en la morfogénesis, debido a que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos y Velázquez, 1982) y esto ha sido reportado en diversos trabajos (Mroginski *et al.*, 2003; Collado *et al.*, 2004; Roque y Ardisana, 2006; López, 2010; Ramos, 2012) señalando que los mejores resultados fueron con explantes tomados de plantas jóvenes debido a que el desarrollo de la morfogénesis fue más rápida. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes, la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros. Este hecho genera la necesidad de realizar tratamientos de rejuvenecimiento de las plantas donantes de explantes (Radice, 2010)

### **Tamaño del explante**

Se ha señalado que cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir callo o la regeneración directa de órganos, pero también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. Por lo que es necesario tomar en cuenta que existe un tamaño mínimo de explante, que depende de la especie y del material vegetal (Mroginski *et al.*, 2003; Sevilla y Holle, 2004), y que por debajo de este tamaño mínimo no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (Aceves y Hernández, 1997; Montoya, 1991).

El efecto del tamaño del explante puede apreciarse en cualquier sistema de cultivo e independientemente de la fuente de donde proviene; su importancia ha sido señalada en cultivos de meristemas (Hu y Wang, 1983), anteras (Xu y Sunderland, 1982), suspensiones celulares (Street, 1977), embriones (Monnier, 1976), y protoplastos (Kao y Michayluk, 1980).

### **Tipo de explante**

En este aspecto los meristemas apicales y axilares han sido ampliamente utilizados en numerosas especies. Por otro lado, las yemas adventicias son genéticamente inestables y producen un alto grado de variabilidad en los clones, este procedimiento no es útil para la producción de plántulas con una determinada característica de cultivo, pero sí lo es en el fitomejoramiento, ya que mediante esta variación semi-natural es posible obtener nuevas líneas de cultivo de explantes (Aceves y Hernández, 1997; Montoya, 1991).

### **3.- Problemática en la familia Orchidaceae**

Debido a la elegancia y belleza de sus flores las orquídeas representan un gran potencial para la industria ornamental existiendo dos tipos de mercados: el mercado amplio para todos aquellos que las quieren tener de manera legal y un mercado ilegal; el tráfico internacional de orquídeas se ha presentado tanto para satisfacer a aficionados como para integrarlas a colecciones científicas. Suarez (2004), menciona que en relación con la depredación de orquídeas, algunos colectores del siglo XX tomaban los mejores ejemplares de una especie, endémica de cierta región, y destruyendo a los demás con el ánimo de poseer la exclusividad de dicha especie, lo que significaba venderla en altos precios. Aunque no se tienen cifras exactas, se sabe que en México se trafican más ejemplares de orquídeas que los que son vendidos legalmente, tanto en el comercio internacional como el local. Se estima, por ejemplo, que en los años noventa se traficaban ilegalmente en México 12 millones de plantas, de los cuales el 1% eran principalmente unos cuantos géneros, existiendo dificultad para regular su comercio, y sólo se vendían legalmente 152,000 ejemplares aproximadamente (Flores-Palacios y Brewster, 2002).

### **El género *Stanhopea***

El nombre del género es en honor al Lord P. H. Stanhopea (1791- 1855). Su cultivo tradicional se conoce desde la época prehispánica con los aztecas, ellos la conocían con el nombre de coatzontecoxóchitl que proviene de coa (tl), culebra; tzontecom

(atl), cabeza, y xóchitl, refiriéndose a una flor cabeza de culebra (Hernández, 2010). Actualmente se le conoce con el nombre común de “toritos” por la forma en que termina el labelo, conformado de tres piezas y con terminaciones en dos estructuras semejantes a cuernos parecidos a la cabeza de una serpiente (Anexo 2). Este género comprende alrededor de 55 especies de las cuales en el territorio mexicano se encuentran 14.

Se distribuye desde el centro de México (noreste del país en toda la Sierra Madre Occidental, en la Sierra Madre Oriental, en la Sierra Madre del Sur y en la Sierra Madre de Chiapas) y, a través de América central, hasta Brasil (Sureste) y Perú (Figura 2).



Figura 2. Distribución del género *Stanhopea*. Tomado de Dodson y Frymire (1961).

En condiciones naturales se encuentran en localidades secas donde al menos hay un poco de sombra. Pueden soportar largos periodos de moderada sequía, aunque necesitan una considerable cantidad de agua en las estaciones de crecimiento

(Dodson y Frymire, 1961). En condiciones de invernadero, la temperatura óptima para su crecimiento es de 18-25 °C de día y 15-20° por la noche, la luz óptima es de 15000- 30000 luxes (Lecoufle, 2005, citado en Sedano *et al.*, 2015).

Habita en lugares entre los 1500-2900 msnm en selva mediana, selva alta perennifolia, bosque mesófilo de montaña y bosque de pino-encino, principalmente epífitas o rupícolas (Menchaca y Moreno, 2011).

Tiene flores llamativas de penetrante aroma, en inflorescencias pendulares con una o dos flores de hasta 15 cm de diámetro de color marfil con manchas vino y olor característico a chocolate; antes utilizadas como un ingrediente para el nixtamal. Es epífita y litófita, llega a medir 50 cm de alto con pseudobulbos globosos (Mora-Retana y González, 1996).

A pesar de ser un género muy conocido, existe una gran confusión en su taxonomía ya que presentan una gran variabilidad en el tamaño, forma y la coloración de las flores de algunas de las especies (Mora-Retana y González, 1996). Sin embargo, en general las flores de este género tienden a ser de gran tamaño y una duración muy corta que oscila entre los 2 y 4 días (Fisher, 2007).

### ***Stanhopea tigrina* Bateman**

En la mayor parte del país la especie es conocida como “torito”, y en algunas localidades de Querétaro como “calavera”; es una especie que tiene una gran importancia ornamental por sus llamativas y peculiares flores (Figura 3).

Su hábitat natural es el bosque húmedo de pino-encino y bosque de pino-encino-Liquidámbar, ocasionalmente en bosque de lluvia de montaña, entre los 600 a 1700 msnm (CONABIO, 2010).

Florece en julio y agosto y es polinizada por abejas de la especie *Euglossa viridissima* (Van der Pijl y Dodson, 1966; Tinoco, 2006). Su distribución abarca los estados de Hidalgo, Oaxaca, Puebla, San Luís Potosí, Tamaulipas, Querétaro y Veracruz (Dodson, 1963; Kennedy, 1975; Soto, 1988 y Soto, 2002 citados en Téllez 2011) (Figura 4).



Figura 3. Inflorescencias de *Stanhopea tigrina*. Tomado de [http://www.akerne-orchids.com/shop/index.php?route=product/product&product\\_id=2172](http://www.akerne-orchids.com/shop/index.php?route=product/product&product_id=2172) 3 de enero de 2019.

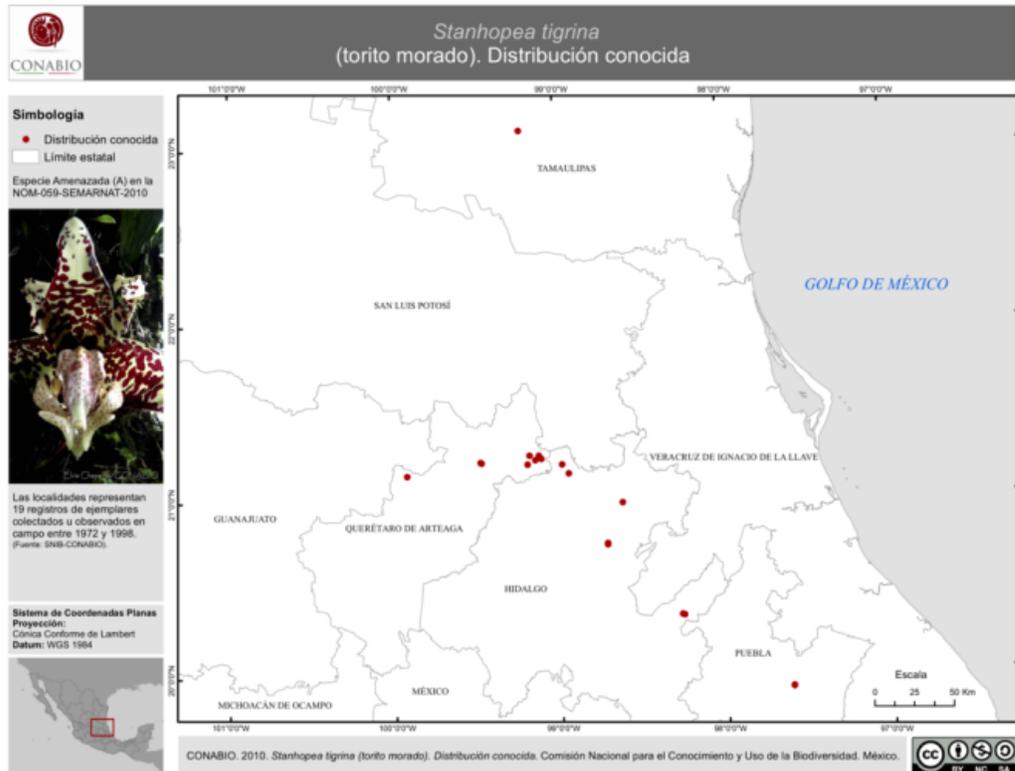


Figura 4. Distribución geográfica de *S. tigrina* Bateman. Tomado de CONABIO (2010).

Se distribuye en la Sierra Gorda-Río Moctezuma, en los Bosques mesófilos de la Sierra Madre Oriental; en Cuetzalan, Puebla; en la Sierra Norte de Oaxaca-Mixe y en la reserva estatal del Rancho de El Cielo en el estado de Tamaulipas, que está mucho mejor vigilada que las reservas federales y, probablemente en el Parque Nacional Cañón del Río Blanco en el estado de Veracruz (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007).

Además, presentan diversas dificultades para su reproducción silvestre ya que su germinación simbiótica es poca, requiere de largos periodos para su establecimiento, posee una baja tasa de repoblación, se requiere de por lo menos cinco años para su desarrollo y floración.

El saqueo ilegal de ejemplares silvestres sin control para su comercialización, han colocado a esta especie endémica de México como amenazada (A) en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

#### 4.- Estrategias de conservación

*S. tigrina* es una especie con alta demanda comercial y apreciada en el sector hortícola, y para los coleccionistas aficionados, por lo que es importante plantear estrategias que permitan su conservación.

Entre ellas, generar y difundir información a los poseedores de este recurso con el fin de que ellos mismos apoyen en su protección, el establecer áreas naturales protegidas, así como bancos de germoplasma *in situ*.

Así mismo estrategias de conservación *ex situ* como jardines botánicos y bancos de germoplasma *in vitro*. Con las técnicas de cultivo de tejidos es posible disminuir el tiempo de regeneración e incrementar las poblaciones, por lo que es elemental realizar estudios relacionados con su capacidad de germinación y regeneración, en donde la respuesta depende de la especie y condiciones de cultivo (Menchaca y Moreno 2011).

##### **Cultivo *in vitro* de orquídeas**

Las orquídeas producen un vasto número de semillas que varía entre unos pocos miles y cuatro millones; su tamaño es muy pequeño, miden entre 0.3 y 4 mm de largo y pesan por lo general entre 0.4 y 2 µg (Arditti y Ernst, 1992).

Para que se dé el proceso de la germinación de las semillas, éstas deben absorber agua a través de la testa (imbibición), se da la división de las células en la región anterior, provocando un aumento en el volumen del embrión y rompiendo así la testa. El desarrollo del embrión da como resultado una estructura esférica llamada protocormo, y tienen estadios secuenciales en el proceso de desarrollo (Arditti, 1967, Barba *et al.*, 2002; Arditti, 2008) (Figura 5).

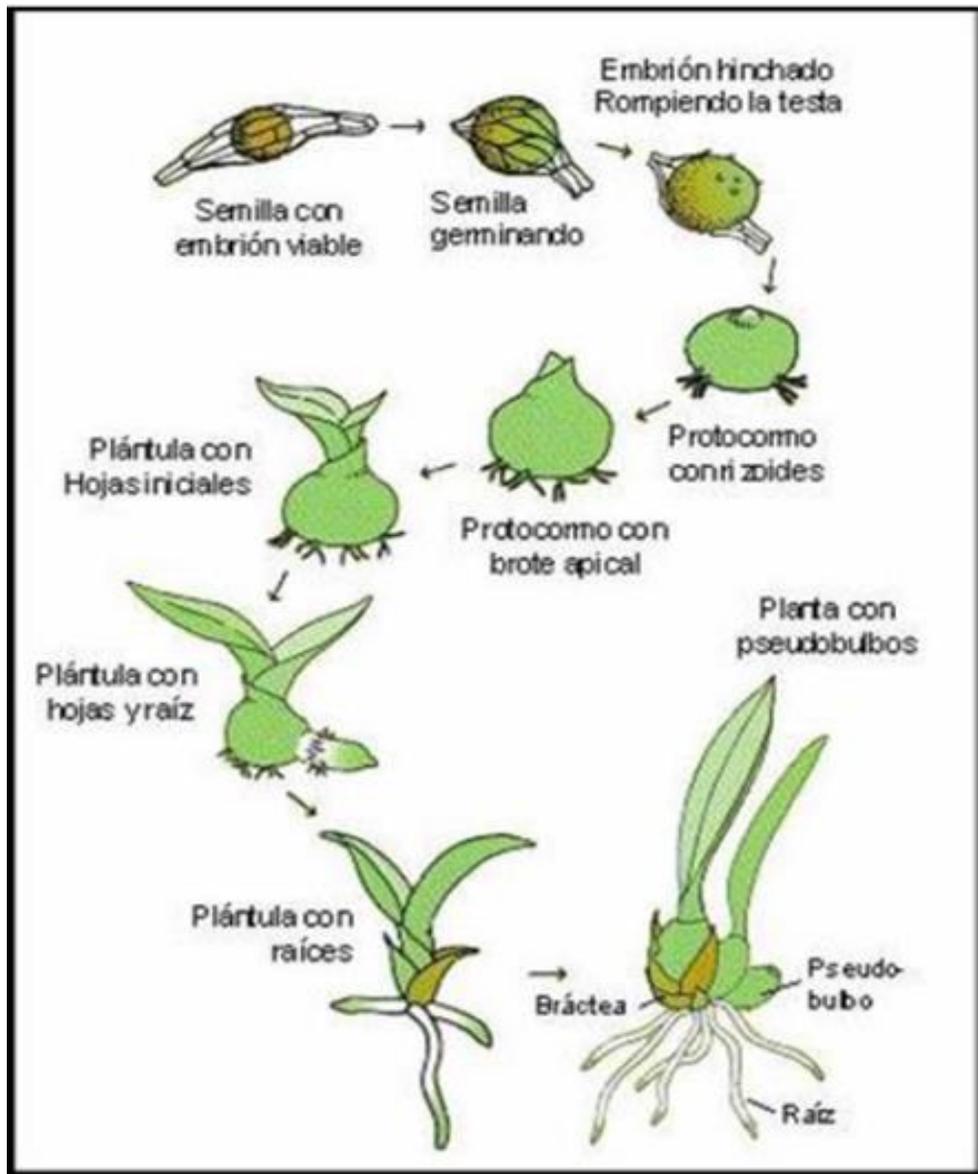


Figura 5. Estadios ontogenéticos de *Laelia* sp. Tomado de Seaton y Ramsay (2015).

El protocormo se refiere a una masa de células pequeñas y esféricas el cual funge como un depósito orgánico de reservas. Cuenta con una región apical llamada primordio foliar, donde se establecerán las hojas fotosintéticas con células grandes parenquimatosas, y con polo radical que presenta rizoides que darán origen a las raíces (Barba *et al.*, 2002).

Si la semilla se estableció en condiciones *in vitro* el protocormo puede dar lugar a estructuras denominadas cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) por sus siglas en inglés (Batygina *et al.*, 2003). Los PLBs son múltiples brotes esféricos generados a partir de tejido de un explante o callo *in vitro*, ya sea por inducción con reguladores de crecimiento (auxinas o citocininas), o por efecto de fitohormonas endógenas, con un alto grado de estabilidad genética (Arditti, 2008).

En algunas orquídeas silvestres la adición de suplementos orgánicos al medio muestra un efecto significativo en el crecimiento y desarrollo de PLBs y regeneraciones subsecuentes de plántulas.

Mediante el cultivo *in vitro* se propicia la germinación de semillas en medios nutritivos con los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan, dando como resultado un mayor porcentaje de germinación, en comparación con la germinación en condiciones naturales, la cual es dependiente de la asociación con hongos micorrízicos, simbioses muchas veces especie-específicos (Cavalcante *et al.*, 2001).

La germinación *in vitro* de orquídeas puede ser efectuada por dos vías:

- 1) Co-cultivo, con la implementación de diversos hongos micorrízicos para establecer una relación simbiótica. Para ello es necesario el aislamiento y cultivo del hongo en un medio específico.
- 2) Inoculación de las semillas en un medio de cultivo, que, en ausencia de hongos simbióticos, proporciona los nutrientes requeridos para el desarrollo de la semilla.

Las diferentes respuestas de la germinación en la propagación *in vitro* son dependientes del uso de medio nutritivo adecuado, el empleo de tejidos viables, incubación (luz y temperatura) calidad de reactivo y asepsia, entre otros (Álvarez *et al.* 1982; Merino, 1987).

### **Medios para el cultivo *in vitro* de orquídeas**

Lewis Knudson formuló un medio para promover la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas, y a su vez fue el primer procedimiento práctico para la propagación *in vitro* de cualquier planta en condiciones asépticas, probando que era posible la

germinación sobre un medio simple que contuviera minerales y azúcares (Knudson, 1921). Knudson en 1946 demostró que las semillas de orquídeas pueden germinar en ausencia de hongos micorrízicos, cultivados *in vitro* en un medio de cultivo adicionado con minerales, sales y azúcares, logrando germinar semillas de *Cattleya*, *Epidendrum*, *Laelia* y otras (Duarte, 2014). Los medios más utilizados para la propagación de orquídeas son el Knudson B (1921), al cual posteriormente se le adicionaron nuevos componentes, manteniendo la sacarosa, a este medio se le llamó Knudson C (1946), y el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) entre otros (Arditti, 1972). El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) ha sido probado en la germinación y crecimiento de muchas especies de orquídeas con resultados óptimos gracias a su contenido de sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, lo que brinda una alta disponibilidad de nitrógeno y potasio, necesarios para la nutrición (Arditti, 2008).

### **Cultivo *in vitro* del género *Stanhopea***

En los trabajos reportados para la propagación *in vitro* de *Stanhopea* se han utilizado semillas, protocormos y plántulas como fuente de explante y empleado el medio MS adicionado con reguladores del crecimiento o algún extracto orgánico como pulpa de plátano y agua de coco para determinar su efecto en la sobrevivencia (Tabla 1).

El mayor número de trabajos reportados ha sido con *Stanhopea tigrina*; Moreno y Menchaca (2007) reportaron que el tratamiento de MS adicionado con 100 gL<sup>-1</sup> de pulpa de plátano más 120 mL<sup>-1</sup> de agua de coco fue el más exitoso.

Así mismo, Chávez *et al.* (2007) establecieron semillas *in vitro* de *S. tigrina* empleando tres medios: MS 100%, MS 50% y KC; reportando que no hubo diferencias, pero el crecimiento de las plántulas y raíz fue más favorable en MS 50%, seguido de MS 100% y en medio KC sólo se observó el crecimiento en las raíces y germinación de esta especie, a las 26 semanas sin diferencia significativa en los tres tratamientos probados.

La micropropagación *in vitro* de *S. tigrina* ya se ha reportado utilizando bencilaminopurina o bencilaminoadenina (6-BAP o BA) y ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D), siendo el tratamiento más exitoso la concentración de BA 1 y 5 mgL<sup>-1</sup> obteniendo un total de 208 explantes a partir de semilla (Cañedo y López, 2016).

Además de los reportes de *S. tigrina*, solo hay un reporte más con *S. oculata*, al cual al medio MS se le adicionaron complejos orgánicos y el jugo de piña, que resultó ser el más eficaz en el crecimiento *in vitro* de las plántulas (Organista, 2015).

Tabla 1. Reportes de propagación *in vitro* en algunas especies del género *Stanhopea*.

<b>Especie</b>	<b>Tipo de explante</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Regulador de crecimiento o compuesto orgánico (mgL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Respuesta <i>in vitro</i></b>	<b>Número de brotes por explante</b>	<b>Referencia</b>
<i>S. tigrina</i>	Protocormos	MS	BA (5) 2,4-D (0.5)	Brotes y PLBs	8.75±2	Tinoco (2006)
<i>S. tigrina</i>	Plántulas de 1 cm	MS	Pulpa de plátano (100 gL <sup>-1</sup> ) + Agua de coco (120 mL)	Crecimiento de las plántulas (7cm), con suficientes raíces	NE	Moreno y Menchaca (2007)
<i>S. tigrina</i>	Semillas	MS 50%	NE	PLBs Plántulas	NE	Chávez (2008)
	Protocormos					
<i>S. oculata</i>	Plántulas	MS	Jugo de piña (200 mL)	Formación de hojas, raíces y pseudobulbos	NE	Organista (2015)
<i>S. tigrina</i>	Semillas	MS	BA (1) y (5)	Formación de PLBs	208 brotes en total	Cañedo y López (2016)

BA = 6-bencilaminopuina, 2,4-D = ácido 2,4 diclorofenoxiacético, NE = No especificado; PLBs = Cuerpos parecidos a protocormos; MS = Murashige y Skoog al 50% de su concentración.

### III. Justificación

*Stanhopea tigrina* especie endémica de México se encuentra catalogada como amenazada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) debido a la alteración y destrucción de su hábitat, así como a la colecta ilegal con fines comerciales. Determinar el tamaño óptimo del explante permitirá obtener brotes mejor desarrollados y en mayor número para optimizar su propagación por cultivo de tejidos vegetales y en un futuro satisfacer la demanda comercial sin afectar a las poblaciones silvestres.

### IV. Hipótesis

Se espera que el tamaño de los explantes utilizados en la micropropagación de *S. tigrina* tenga una influencia significativa en la formación de brotes, y una mayor probabilidad de supervivencia, resultando más favorable en uso de explantes con un tamaño mayor o igual a 1 cm al ser cultivados con reguladores de crecimiento.

### V. Objetivos

#### Objetivo general

Determinar el tamaño mínimo adecuado de los explantes (protocormos y tallos) de *Stanhopea tigrina* que permitan promover la formación de brotes en dos concentraciones de 6-bencilaminopurina.

#### Objetivos particulares

- Evaluar el porcentaje de sobrevivencia de los explantes en función de su tamaño.
- Cuantificar el número de regenerantes obtenidos en cada tipo de explante cultivados con reguladores de crecimiento.
- Realizar el establecimiento *ex vitro* de las plantas micropropagadas.

## VI. Materiales y métodos

### Material biológico

Se emplearon dos fuentes de material biológico:

Semillas procedentes de Tenango de Doria, Hidalgo, y extraídas de una cápsula madura (15 mayo del 2016).

Cultivos asépticos con protocormos y plántulas de *Stanhopea tigrina* de aproximadamente nueve meses de edad previamente establecidos en medio Murashige y Skoog (1962) MS.

Semillas y cultivos *in vitro* fueron donados por la Biól. Valentina Cañedo Molina, Laboratorio de Morfofisiología Vegetal, Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

### Desinfección y siembra de semillas

Para la desinfección se hicieron pequeños paquetes de papel filtro (tipo Whatman # 1) de 1-2 cm con semillas y se aseguraron con grapas. Cada paquete se desinfectó durante 15 min con una solución al 15% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex), el cual contiene 6% de cloro activo de acuerdo con la etiqueta. Posteriormente, en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada durante un minuto cada uno. Al paquete se le retiraron las grapas con ayuda de pinzas y se sembraron las semillas en la superficie del medio con ayuda de pequeños trozos de papel filtro previamente esterilizados y ligeramente húmedos; se pusieron en contacto con el paquete de semillas previamente abierto y una vez adheridas al papel filtro estéril, se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo presionando ligeramente con las pinzas. El medio utilizado fue Murashige y Skoog (1962) MS con sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>, agar bacteriológico Bioxon® 9 gL<sup>-1</sup>, pH 5.7-5.8. Los frascos se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado a 25± 2 °C, fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y 30-40 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, de intensidad luminosa. De las semillas germinadas se seleccionaron protocormos de entre 1-3 mm y 3.1- 5 mm. Se realizó el registro fotográfico con un microscopio estereoscópico en diferentes aumentos, utilizando el programa "LAS EZ". Se seleccionaron diferentes etapas del desarrollo *in vitro* de *S. tigrina*.

### **Desarrollo de protocormos y plántulas**

Para promover el desarrollo y crecimiento de los protocormos y plántulas previamente establecidos, se subcultivaron a medio fresco MS basal sólido (MS más sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>, agar bacteriológico Bioxon® 9 gL<sup>-1</sup> y pH 5.7-5.8).

- **Selección del tamaño del explante**

Se definieron cuatro tamaños de explante a evaluar de 1-3 mm, 3.1-5 mm, 5.1-10 mm y 10.1-15 mm; los primeros (1-3 mm) provinieron de las semillas germinadas y el resto de los cultivos pre-establecidos.

### **Fase de inducción**

Bajo condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar, se colocó por debajo de la caja Petri una hoja de papel milimétrico para así seleccionar las plántulas mayores de 3 mm a las cuales se les disecaron las hojas y las raíces para obtener los diferentes tamaños de los explantes (3.1-5 mm, 5.1-10 mm y 10.1-15 mm) (Figura 6) y se seleccionaron los protocormos procedentes de la germinación de semillas (1- 3 mm,) los cuales no se disecaron

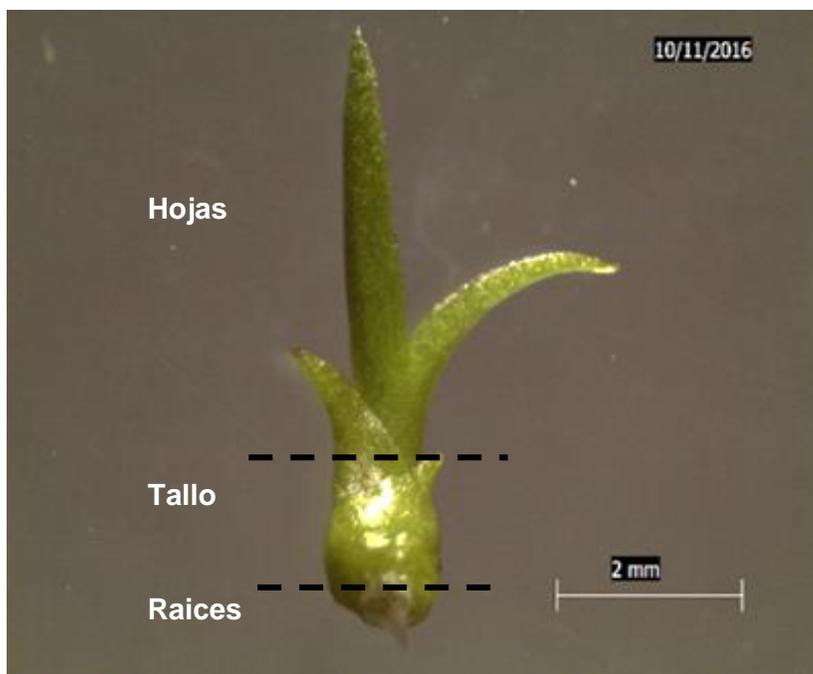


Figura 6. Plántula de *S. tigrina* disecada para obtener los explantes de más de 3 mm.

Los explantes de diferente tamaño se sembraron en medio MS (sacarosa  $30 \text{ gL}^{-1}$ ,  $9 \text{ gL}^{-1}$  agar Bacteriológico Bioxon®, y pH 5.7–5.8) adicionado con 6-bencilaminopurina (BA) (1 y  $5 \text{ mgL}^{-1}$ ) además del grupo control (MS basal). Se colocaron 40 explantes de cada tamaño, conformando un total de 160 explantes por tratamiento y 80 explantes en el grupo control, en total se emplearon 400 explantes que permanecieron 42 días en incubación.

### **Proliferación**

Al concluir la fase de inducción los explantes se subcultivaron a medio MS sin reguladores de crecimiento. Los cultivos se evaluaron mensualmente durante cinco meses (147 días). Para cada tamaño de explante y tratamiento, se registró el número de brotes formados, número de PLBs y el porcentaje de supervivencia de los explantes. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado a  $25 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ , 16/8h luz/oscuridad y  $30\text{-}40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### **Fase de aclimatización**

Posterior a la etapa de proliferación o expresión, se realizó el conteo de brotes obtenidos de cada tamaño de explante y tratamiento empleado. Las plantas de cada frasco se sacaron, se les lavaron con agua destilada y estéril, se retiró el medio de cultivo adherido a las raíces, tratando de no dañarlas, y se sembraron en envases de plástico (capacidad 1L) con una mezcla de sustrato de corteza, tezontle y pequeños trozos de carbón (1:1:1) previamente esterilizado en autoclave. La siembra de las plantas se realizó dentro de una campana de flujo laminar. Después de un mes se transfirieron a un sustrato compuesto de corteza y tepojal (1:2) y se perforó la tapa del envase. A los dos meses se les cambió el envase de plástico por una maceta calada, para evitar la retención de agua y proliferación de hongos, además se les colocó un envase de plástico en la parte superior para mantener la humedad. Después de un mes en el invernadero templado el envase de plástico se les retiró y se transfirieron al Orquideario MAS-FC-UNAM.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos, número de brotes por explante de cada intervalo de tamaño por tratamiento, fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), y para conocer cuáles tratamientos difirieron entre sí se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey, con ayuda del paquete estadístico SPSS.

El desarrollo metodológico global muestra en el diagrama de flujo de la Figura 7.

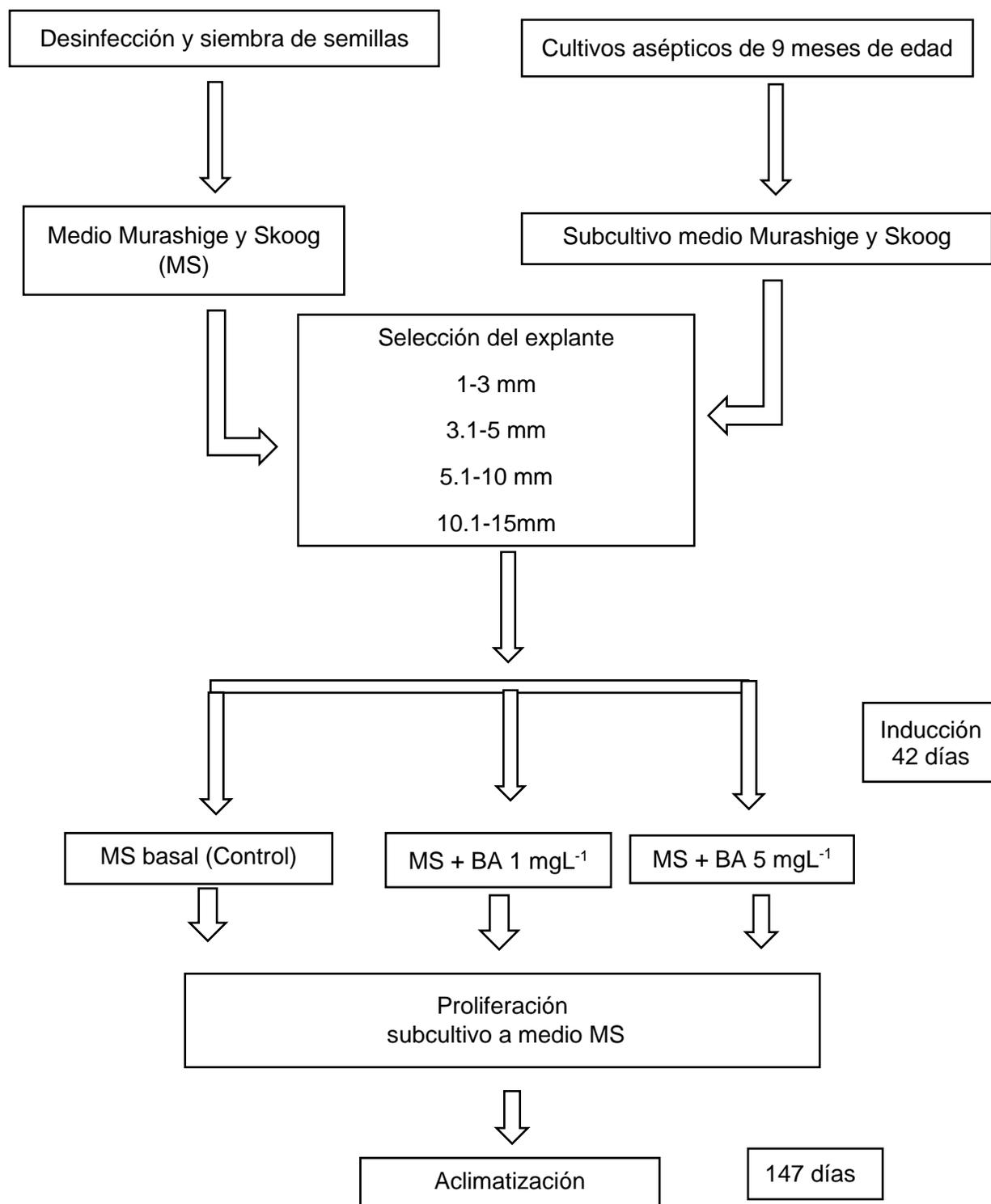


Figura 7. Diagrama de flujo del método para la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* utilizando explantes de diferentes tamaños.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Germinación *in vitro***

La técnica de desinfección de semillas fue exitosa. La germinación se inició alrededor de los 48 días de incubación, similar a lo reportado por Bhadra y Hossain (2003) que mencionan un periodo de 45-60 días para *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. Lee y Lee (1991) citados por Ávila y Salgado-Garciglia (2006) señalan que dependiendo de la especie las semillas pueden germinar en un periodo de entre 30-60 días.

Se observó que la semilla (Figura 9a) se embebió y la testa se tornó transparente. Fue posible observar, a través de la cubierta seminal, al embrión de forma esférica que de color blanco adquirió una coloración verde claro (Figura 9b). Posteriormente, se observó el desarrollo del protocormo (Figura 9c) y el rompimiento de las testas, después de 60 a 80 días alcanzaron un tamaño de 1 a 3 mm, se pudo apreciar la diferenciación de los primordios foliares en la zona apical (Figuras 9d y 9e). Los protocormos se desarrollaron hasta la formación de plántulas a lo largo de cinco meses de cultivo, durante este tiempo se seleccionaron los explantes de los tamaños correspondientes, siendo los de 1-3 mm las etapas iniciales del desarrollo de la plántula (Figura 10a y 10b), de 3.1-5 mm (Figura 10c) y de 5.1-10 mm (Figura 10d).

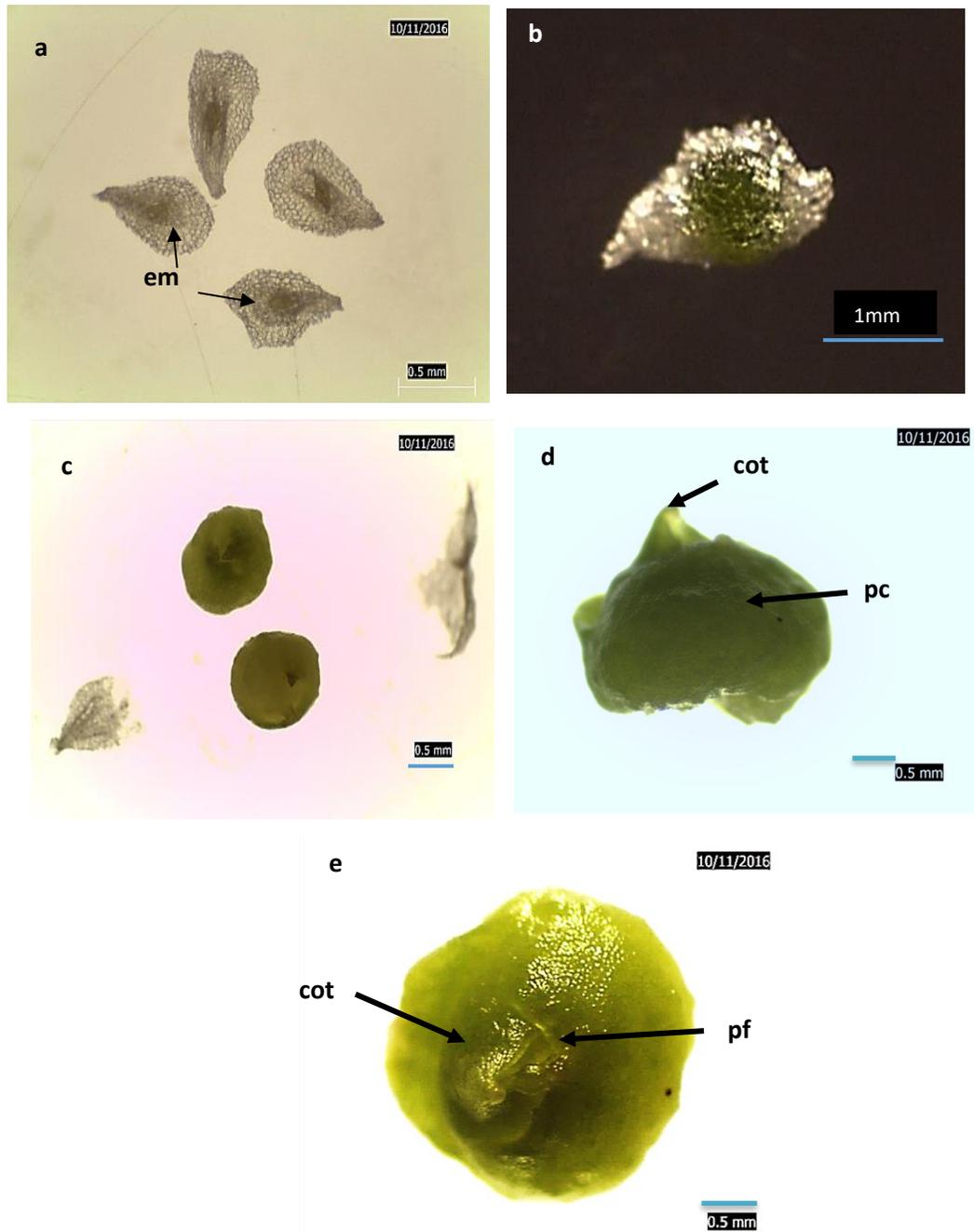


Figura 9. Germinación *in vitro* de *Stanhopea tigrina*. a) semillas deshidratadas, se observa al centro el embrión (em), b) semilla embebida con el evidente desarrollo del embrión, c) ruptura de la cubierta seminal y desarrollo del protocormo (pc), d) y e) protocormo vista lateral y apical, emergencia del cotiledón (cot) e inicio de primordio foliar (pf) en la zona apical.

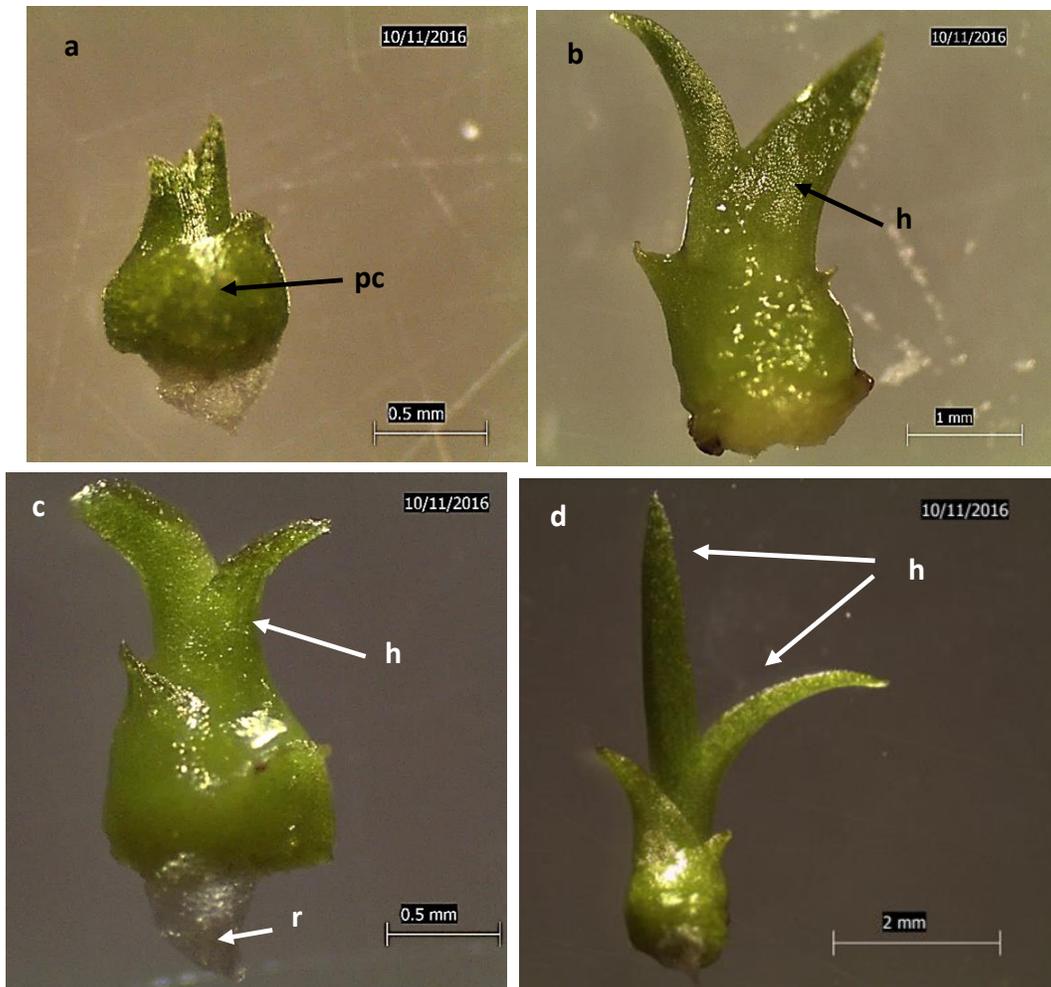


Figura 10. Desarrollo de los protocormos a plántulas de *Stanhopea tigrina in vitro*, que se utilizaron como fuente de explante para seleccionar los diferentes tamaños. a) protocormo (pc) y primeras hojas (h), b) y c) crecimiento de las hojas y formación de raíz (r), d) plántula de 6 mm.

La formación de brotes se obtuvo por organogénesis directa a partir de la activación de yemas preexistentes. Esto ocurrió tanto en el tratamiento control (MS basal) como en los dos tratamientos con la citocinina. El número de regenerantes obtenidos muestra que el tamaño del explante influyó notablemente de manera favorable en el porcentaje de sobrevivencia en la fase de inducción, proliferación y aclimatización.

## Fase de inducción

Durante el tiempo de inducción (42 días) se presentaron bacterias sistémicas, así como oxidación en los explantes. La sobrevivencia en los explantes de 1-3 y 3.1 - 5 mm en presencia de BA 1 mgL<sup>-1</sup> fue del 5 y 12.5% respectivamente, con BA 5 mgL<sup>-1</sup> del 10 y 35%. El grupo control tuvo el 12.5% de sobrevivencia. Los explantes de mayor tamaño presentaron porcentajes mayores de sobrevivencia, para los de 5.1-10 y 10.1–15 mm en presencia de BA 1 mgL<sup>-1</sup> fueron del 45 y 85% respectivamente, con BA 5 mgL<sup>-1</sup> del 87.5 y 80 %, mientras que el grupo control registró el 47.5 y 25% (Tabla 2).

Tabla 2.- Porcentaje de sobrevivencia de los diferentes tamaños de explantes de *Stanhopea tigrina* con presencia de Bencilaminopurina y el grupo control. Tiempo de inducción 42 días.

Tamaño de explante (mm)	Control (MS basal) %	BA 1 mgL <sup>-1</sup> %	BA 5 mgL <sup>-1</sup> %
1 – 3	12.5	5	10
3.1 – 5	12.5	12.5	35
5.1 – 10	47.5	45	87.5
10.1 – 15	25	85	80

Se ha reportado que existe una influencia del tipo, tamaño del explante y la oxidación de este. Suqimura y Salvaña (1988) citados por Azofeifa (2009) señalan que en *Cocos nucifera* segmentos pequeños de la inflorescencia tuvieron mayor sobrevivencia porque presentaron menor oxidación. Otro factor importante es la edad del material biológico, George (1996) ha señalado que los tejidos jóvenes tienden a oxidarse menos que los tejidos adultos, aunque esto no es siempre así, Azofeifa (2009) señala que explantes jóvenes de *Saccharum* spp. presentaron una oxidación muy fuerte en comparación a los explantes más desarrollados.

En este caso, los explantes más pequeños de 1 a 5 mm de *S. tigrina*, mostraron más oxidación que aquellos que medían más de 5.1 mm y por lo tanto su capacidad de respuesta fue menor.

Mroginski y Roca (1993) señalan que hay un tamaño mínimo del explante y que la respuesta puede ser nula si el tamaño está por debajo del indicado.

La presencia de citocininas en concentraciones altas es un factor que puede provocar la acumulación de compuestos fenólicos (Viñas y Jiménez, 2011).

Por lo tanto, es muy probable que, en este trabajo, los explantes de menos de 5 mm y la presencia de la citocinina dieran como resultado los bajos porcentajes de sobrevivencia.

## **Fase de proliferación**

### **Tratamiento BA 1 mgL<sup>-1</sup>**

Durante el tiempo de inducción (42 días), se observó la formación de brotes en todos los tamaños de explantes ensayados.

Al ser transferidos a medio MS y después de 147 días de incubación (cinco meses) se registró la mayor formación de brotes en los explantes de 10.1–15 mm (Figura 11a) generando en promedio 8.33 brotes/explante, seguido de los explantes de 5.1– 10 mm con 4.1 brotes/explante (Figura 11b). Al ser menor el tamaño del explante inicial el número promedio de número de brotes formados por explante fue menor el (Figura 11c): de 1.9 brotes en explantes de 3.1-5 mm y de 0.6 brotes/explante de 1-3 mm (Figura 11d).

El número promedio de brotes por explante en los explantes más pequeños (1-3 y 3.1-5 mm) fue escaso (0.6 y 1.98) debido a que el número de explantes que sobrevivieron durante la etapa de inducción fue bajo, del 5 y 12.5%.

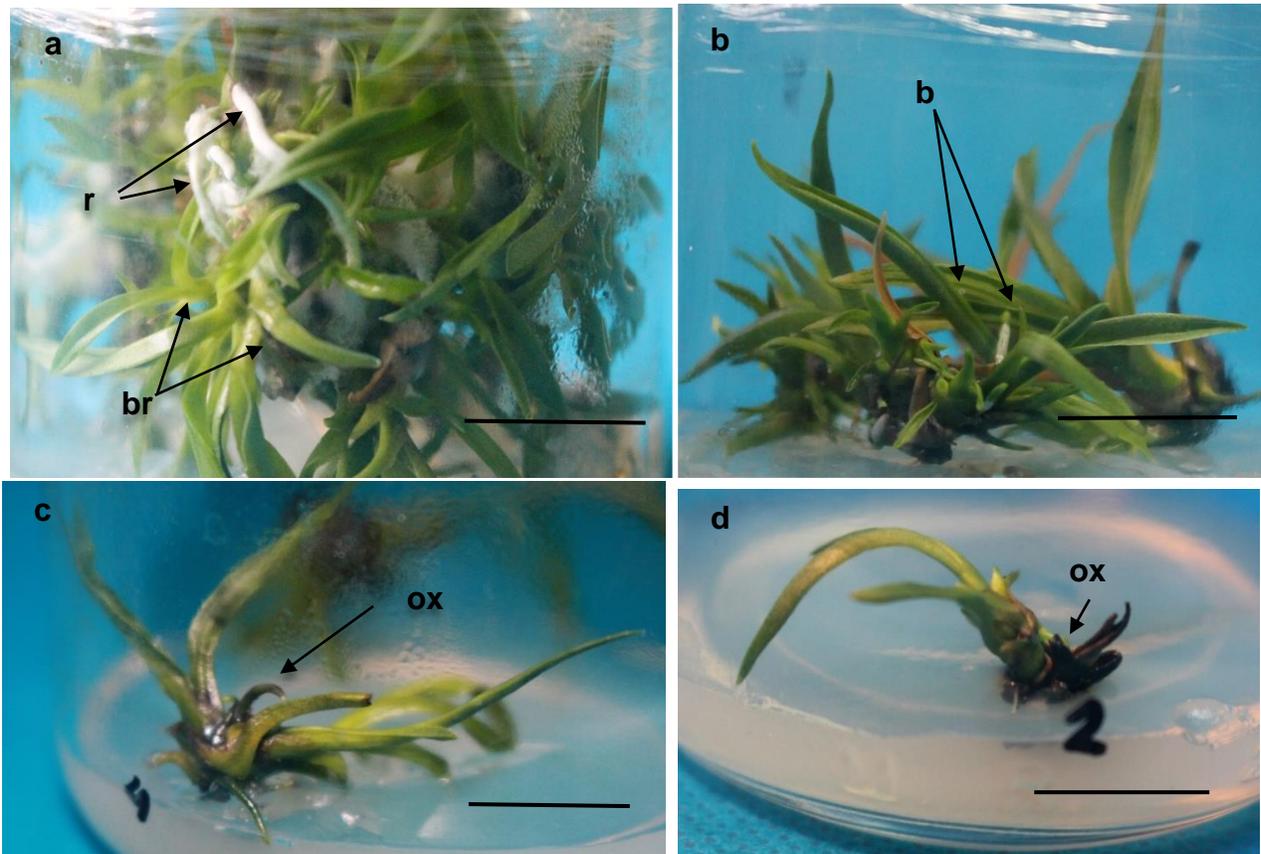


Figura 11. Formación de brotes de *Stanhopea tigrina* a partir de explantes de: a) 10-15 mm, se observan las raíces (r) y numerosos brotes (br), b) 5-9.9 mm, c) 3-4.9 mm, d) 1-2.9 mm, se observa oxidación (ox). El número de brotes disminuyó al ser menor el tamaño del explante inicial. Barra=1 cm.

Así mismo el tamaño del protocormo permitió que se expresaran algunos brotes, independientemente de la oxidación que inicialmente manifestaron, gracias a la presencia del regulador de crecimiento. Los explantes de mayor tamaño tuvieron más posibilidades de sobrevivencia que los más pequeños, con la ventaja de poseer mayor superficie y zonas potencialmente regenerativas que se estimularon con la presencia de la citocinina, lo que permitió obtener el mayor número promedio de brotes por explante (8.33 y 8.63) en los explantes de 10.1 – 15 mm en el medio con BA 1 y 5 mgL<sup>-1</sup> respectivamente (Grafica 1).

### Tratamiento con BA 5 mgL<sup>-1</sup>

El incremento en la concentración de la citocinina permitió que se desarrollaran más brotes por explante. La mayor formación de estos se registró en los explantes de 10.1-15 mm (8.6 brotes/explantes) (Figura 12a), seguido del explante de 5.1-10 mm (8.45 brotes/explante) (Figura 12b), los explantes de menor tamaño 3.1-5 mm y 1-3 mm generaron 3.85 y 1.85 brotes en promedio por explante, respectivamente (Figuras 12c y 12d) (Gráfica 1).

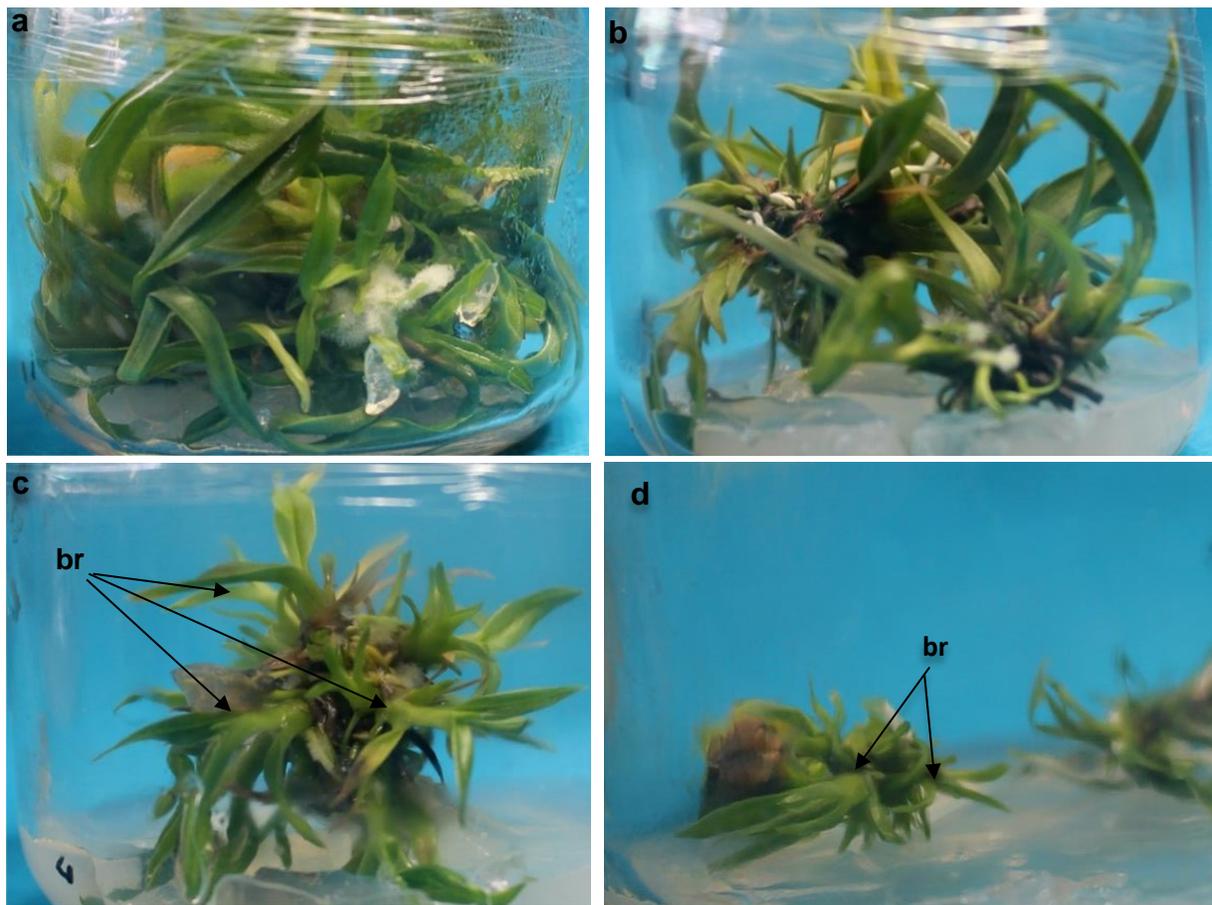
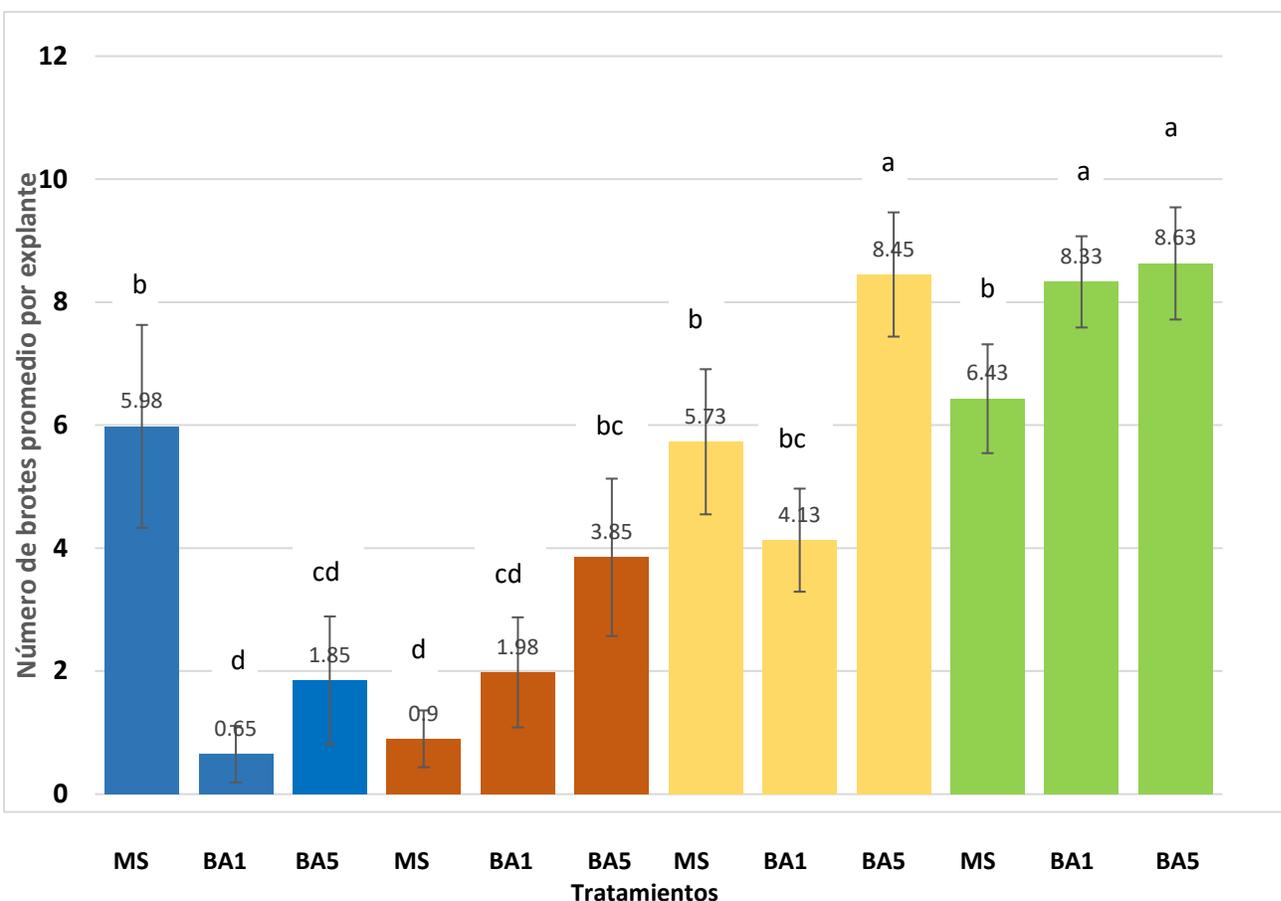


Figura 12. Formación de brotes de *Stanhopea tigrina* en BA (5 mgL<sup>-1</sup>) a partir de explantes de: a) 10.1-15 mm, b) 5.1-10 mm, c) 3.1-5 mm, d) 1-3 mm. El número de brotes disminuyó al ser menor el tamaño del explante inicial. br= brote. Barra=1 cm



Grafica 1. Promedio de brotes por explante en los diferentes tratamientos, el color azul indica el tamaño de 1-3 mm, el color naranja de 3.1- 5 mm, el amarillo de 5.1-10 mm y el verde de 10.1-15 mm.

El análisis de varianza muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con MS y los diferentes tamaños de explante ( $F= 5.214$ ,  $p= 0.002$ ) y en los tratamientos de MS adicionados con BA  $1 \text{ mgL}^{-1}$  ( $F= 20.15$ ,  $p=0.000$ ) y BA  $5 \text{ mgL}^{-1}$  ( $F= 9.895$ ,  $p= 0.000$ ). Los mejores tratamientos fueron con BA  $5 \text{ mgL}^{-1}$  en explantes de 10.1-15 mm, y 5.1-10 mm y BA  $1 \text{ mgL}^{-1}$  en explantes de 10.1-15 mm.

Es posible determinar que hay un efecto del tamaño del explante en la formación de brotes. Las tallas de 1-3 y 3.1-5 mm resultaron poco regenerativas aun estando en contacto con el regulador de crecimiento, esto se debió en gran medida a que fueron pocos los explantes que sobrevivieron como se mostró en la Tabla 2, la mayoría de ellos se oxidaron y necrosaron.

Se observó que la respuesta de los grupos control de los tamaños de 1-3 mm (5.98) de 5.1-10 mm (5.73) y de 10.1-15 mm (6.43) fueron regenerativos excepto el control de

3.1-5 mm (0.9), esto probablemente pudo deberse a la selección y manipulación del material biológico. La capacidad de generar brotes aún sin la adición de la citocinina se ve reflejada en estos resultados y muestran que el explante por sí mismo tiene niveles de hormonas vegetales que permiten su propagación. Tinoco y Mata (2007) reportaron a partir de protocormos de *S. tigrina* la formación de 1.6 brotes por explante en ausencia de reguladores de crecimiento. En este trabajo, la combinación del tamaño del explante y la presencia de la citocinina mostraron un incremento en el número de brotes. En explantes de 5.1-10 mm y BA 5 mgL<sup>-1</sup> se obtuvieron en promedio 8.45 brotes por explante y en los de 5.1-10 mm con BA 1 mgL<sup>-1</sup>, 8.33 brotes, mientras que con BA 5 mgL<sup>-1</sup>, 8.63. Tinoco y Mata (2007) señalan para esta misma especie 2.2 brotes en promedio con BA 1 mgL<sup>-1</sup> y 2.5 en BA 5 mgL<sup>-1</sup> a partir de protocormos.

### Fase de aclimatización

Se realizó el conteo de plantas que se obtuvieron de los diferentes tratamientos y para cada tamaño de explante (Tabla 3). En total se registraron 2,346 plantas, de las cuales 806 provenían del medio MS basal, del tamaño de explante 1-3 mm (239), de 3.1-5 mm (36), 5.1-10 mm (274) y de 10.1-15 mm (257).

Del tratamiento con BA 1 mgL<sup>-1</sup> se registraron en total 603 plantas, procedentes de 1-3 mm (26), de 3.1-5 mm (79), de 5.1-10 mm (165) y de 10.1-15 mm (333).

Del tratamiento con BA 5 mgL<sup>-1</sup> se obtuvo un total de 937, provenientes de 1.3 mm (74), de 3.1-5 mm (154), de 5.1-10 mm (338), de 10.1-15 mm (371) (Tabla 3).

Tabla 3-. Número de plantas obtenidas de *S. tigrina* procedentes de los diferentes tratamientos y tamaño de explantes empleados para su propagación *in vitro*.

Tamaño del explante (mm)	Tratamientos			Total
	MS	BA1 mgL <sup>-1</sup>	BA5 mgL <sup>-1</sup>	
<b>1-3</b>	239	26	74	339
<b>3.1-5</b>	36	79	154	269
<b>5.1-10</b>	274	165	338	777
<b>10.1-15</b>	257	333	371	961
<b>Total</b>	806	603	937	2346

Después de 120 días (4 meses) en condiciones *ex vitro* el mayor porcentaje de sobrevivencia (100%) se registró en las plantas provenientes de BA 1 mgL<sup>-1</sup> en los diferentes tamaños de explantes, seguido de BA 5 mgL<sup>-1</sup> con el 92% total y con el 100% las plantas provenientes del tamaño de explantes de 1-3 mm. Finalmente se registró el 82% de sobrevivencia de las procedentes del medio MS basal (Tabla 4, Figura 13).

La fase de aclimatización fue exitosa y se obtuvieron altos porcentajes de sobrevivencia *ex vitro* con el 100% de las plántulas que procedían de la concentración de BA 1 mgL<sup>-1</sup> seguido de BA 5 mgL<sup>-1</sup>.

Tabla 4.- Número de plantas y porcentaje de sobrevivencia después de 120 días (4 meses) en condiciones *ex vitro*.

Tamaño del explante (mm)	Tratamientos		
	MS No. (%)	BA1 mgL <sup>-1</sup> No. (%)	BA5 mgL <sup>-1</sup> No. (%)
1-3	191 (79)	26 (100)	74 (100)
3.1-5	30 (83)	79 (100)	101 (65)
5.1-10	250 (91)	165 (100)	336 (99)
10.1-15	196 (76)	333 (100)	358 (96)
Total	667 (82)	603 (100)	869 (92)

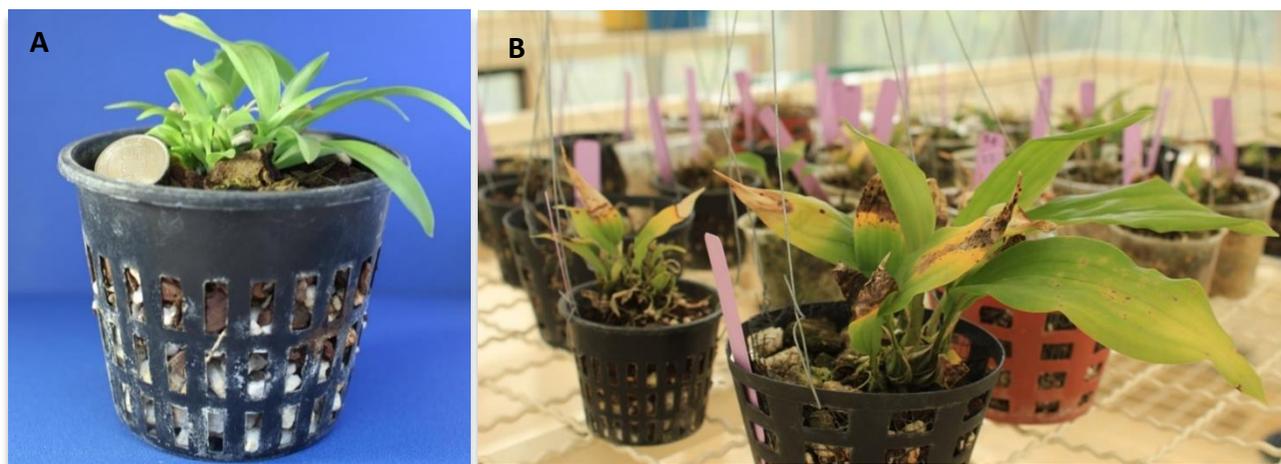


Figura 13. A) Planta de *S. tigrina* en maceta calada con sustrato corteza y tepojal (1:2), como referencia con una moneda de 50 centavos. B) Lote de plantas de *S. tigrina* en maceta calada, después de cuatro meses en el Orquideario MAS-FC-UNAM.

Hay escasos trabajos sobre la sobrevivencia *ex vitro* de orquídeas. Gayá (1995), reporta con *Bletia striata* el 95% de sobrevivencia de plantas enraizadas y rebrotadas a los 30 días.

Dorneles y Trevelin (2011) utilizaron dos sustratos para la aclimatización *ex vitro* de *Catleya intermedia* reportando el 53% de sobrevivencia en plantas colocadas en Sphagnum y el 27% en corteza de pino. Sil-va *et al.* (2006) citado por Dorneles y Trevelin (2011) obtuvieron entre 4 y 40% de sobrevivencia en la aclimatización de *C. tigrina* comparando un cultivo no hidropónico versus hidropónico. Estos resultados concuerdan con lo señalado por Keithly *et al.* (1991), que la pérdida de plántulas de orquídeas obtenidas *in vitro* puede exceder al 50% durante los primeros seis meses. López y Rangel-Villafranco (2018) obtuvieron una sobrevivencia similar de 58.6% a los 30 días con solo MS en *Galeandra greenwoodiana* aplicando extracto de banana y agua de coco obtuvieron una sobrevivencia del 78%, además de fitohormonas, por lo que probablemente requieren de un estímulo externo como la adición de la citocinina para incrementar los porcentajes de sobrevivencia, sin embargo, fue mayor el número de plántulas que el tratamiento BA 1mgL<sup>-1</sup>.

## VIII. Conclusiones

- La formación de brotes ocurrió por organogénesis directa a partir de la activación de yemas preexistentes, en el tratamiento control y con la citocinina.
- El tamaño mínimo del explante para la micropropagación de *Stanhopea tigrina* fue de 5.1 mm, los explantes de menor tamaño presentaron oxidación y necrosis, aun en presencia de la citocinina 6-bencilaminopurina (BA) en el medio de cultivo.
- La combinación del tamaño mínimo del explante con la presencia de la citocinina permitió obtener mayores porcentajes de sobrevivencia. Los explantes de al menos 5.1 mm mantuvieron su capacidad regenerativa en medio MS basal, así como en presencia de las dos concentraciones de la BA.
- La mejor concentración de citocinina para todos los tamaños de explantes fue BA 5 mgL<sup>-1</sup>, excepto para los más pequeños (1-3 mm) los que respondieron mejor en el medio basal.
- El mayor número promedio de brotes (8.63) se obtuvo en los explantes de 10.1-15 mm, seguido, en forma decreciente, en los explantes de 5.1-10 mm (8.45) y 3.1-5 mm (3.85), todos en MS+ BA 5 mgL<sup>-1</sup>.
- Después de cuatro meses, el mayor porcentaje de sobrevivencia (100%) se registró en las plantas obtenidas en MS+BA 1 mgL<sup>-1</sup>, en todos los tamaños de explantes.

## Anexos

### Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) y preparación a partir de soluciones stock concentradas.

	mg/L	g/L	g/10L	g/20L
<b>Macronutrientes</b>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1.65	16.5	33
KNO <sub>3</sub>	1900	1.9	19	38
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	0.37	3.7	7.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	0.17	1.7	3.4
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440	0.44	4.4	8.8
<b>Micronutrientes</b>				
KI	0.83	0.00083	0.0083	0.0166
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	0.0062	0.062	0.124
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	0.0223	0.223	0.338
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6	0.0086	0.086	0.172
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.00025	0.0025	0.005
Cu SO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.000025	0.00025	0.0005
Co Cl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.000025	0.00025	0.0005
<b>Solución Fe-EDTA</b>				
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	0.0373	0.373	0.746
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8	0.0278	0.278	0.556
<b>Vitaminas</b>				
Ac. Nicotínico	0.5	0.0005	0.005	0.01
Piridoxina-HCl	0.5	0.0005	0.005	0.01
Tiamina-HCl	0.1	0.0001	0.001	0.002
Inositol	100	0.1	1	2
Glicina	2	0.002	0.02	0.04
Sacarosa		30		
Agar		9		

## **Anexo 2. Descripción botánica de *Stanhopea tigrina***

Hierba epífita, cespitosa, masiva, de 40-70 cm de alto. Raíces flexuosas, 2-3 mm de grosor. Pseudobulbos unifoliados, agregados, ovoides a subglobosos, longitudinalmente sulcados, de 3-7.5 cm de alto, 2-3.5 cm de ancho. Vainas fibrosas, fugaces, hasta de 12.5 cm de largo. Hoja con un pecíolo sulcado, de 5-14 cm de largo, 4.5-6.5 mm de grosor; lámina elíptica, acuminada, margen ondulado, de 23-45 x 5-13 cm Inflorescencia péndula, de 20-35 cm de largo, pedúnculo subterete, de 5-12.5 cm de largo, con brácteas cafés, imbricadas, cimbiformes, ampliamente ovadas, obtusas, apiculadas, papiráceo-cartáceas, de 1.5-7 cm de largo; usualmente biflora. Brácteas florales elípticas u oblanceoladas, agudas u obtusas, aristadas, de 7-9 x 3-7.5 cm Ovario subtrígono, 3-carinado, furfuráceo, de 7.5-10.5cm de largo, 7-8 mm de grosor. Flores mirando hacia abajo, muy grandes, de 11-18 cm de diámetro; sépalos crema o amarillos, con manchas variables, algo reticuladas de color púrpura a púrpura negruzco, más grandes y densas hacia la base y en el margen superior de los sépalos laterales; pétalos amarillos y una gran mancha púrpura en la base y otras pocas submarginales hacia el ápice; hipoquilo amarillo, con 2 bandas púrpura, grandes a los lados y 2 más pequeñas brillantes a los lados del orificio, púrpura en la superficie interna; mesoquilo y epiquilo punteados de púrpura, columna blanquecina, axialmente verdosa, con manchas púrpura claro; fragancia muy intensa, dulce, aromática (fenil etil acetato, acetato de cinamilo, indol, acetato de bencilo, fenil etil alcohol; fenil acetato,  $\beta$ -ioneno, cumarina, p-hidroxifenilbutanona (Whitten y Williams, 1992; Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007). Sépalo dorsal extendido o reflexo, ovado u ovado-lanceolado, obtuso-redondeado, cóncavo en la base, los márgenes revolutos, de 8-11 x 3-5 cm Sépalos laterales connados entre sí por 15-20 mm, extendidos o algo reflexos, cóncavos, incurvados, oblicuamente ovados, obtuso-redondeados, márgenes ligeramente revolutos, de 7-10 x 4.5-7.5 cm Pétalos reflexos, torcidos, linearoblongos, obtusos, apiculados, repandos, plicados, de 7-9.8 x 1.8-2.8 cm Labelo de 63-87 mm de largo, hipoquilo profundamente cóncavo-saccato, ampliamente cimbiforme, de 30-40 mm de largo, 40-50 mm de ancho, 20-23 mm de alto, con una quilla ancha cerca de la base y rodeado el orificio, orificio muy amplio, obtriangular, obcordado; fondo interno del saco 7-8-carinado, la parte distal gibosa y carinada, rugosa; mesoquilo con 2 cuernos falcados, muy carnosos, anchos, aplanados, arqueados, alzados en la base y recurvados en el ápice, aproximándose al ápice de la columna, de 4.5-5.8 cm de largo, 1.3-1.8 mm de ancho; epiquilo más o menos transversalmente rómbico-flabelado, longitudinalmente canaliculado especialmente en el ápice; de 33-43 x 42-50 mm, base cuneada, ápice trilobado, lóbulos laterales alzados, agudos, el medio pequeño, deltoide, obtuso, deflexo, canaliculado. Columna de 65-90 mm de largo, 30-35 mm de ancho; arqueada en el  $\frac{1}{4}$  basal, subparalela al labelo arriba de la base; trígono-subróbica en corte transversal, dorsiventralmente comprimida, los  $\frac{2}{3}$  distales alados, esta parte elíptica, las alas petaloides, membranáceas, apicalmente enrolladas; ápice con 2 dientes divergentes, redondeados, de 3.5 mm de largo; ventralmente con una carina elevada, subestigmática, de 15 mm de largo. Cavidad estigmática, una ranura transversal, de 1 x 4.5 mm Rostelo un tabique transversal con 2 pequeños dientes laterales divergentes, recurvados. Antera subovoide, el ápice prominente, ovado, bilocular, con 2 dientes laterales, de 5 x 4 mm. Polinario de 11.5-12 mm de largo, con 2 polinios, de 4.5 x 0.8 mm, oblanceolados, dorsiventralmente comprimidos; estípite oblanceolado, grueso, de 2 mm de largo; viscidio obovado, basalmente bifido, apicalmente caudado, 6.5 mm de largo. Cápsula elipsoide, 6-carinada, de 8-8.5 cm de largo, 3.1-3.8 cm de grosor, con la columna persistente. Número cromosómico  $2n = 40$  (Tinoco, 2006).

## Bibliografía

- Aceves JL, Hernández J. 1997. Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, para beneficio social de la comunidad. *Ciencia Administrativa*. 1:148-156.
- Aftab F, Iqbal J. 1999. Plant regeneration from protoplasts derived from cell suspension of adventive somatic embryos in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid cv. CoL-54 and cv. CP-43/33). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 56:155-162.
- Álvarez M, Nueva L, Figueroa C. 1984. Propagación de Plantas Ornamentales. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba, 1-130.
- Arditti J. 1967. Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. Department of Organismic Biology. University of California. New York. *Botanical Review* 1: 33(1): 1-97.
- Arditti J. 1972. El profesor Lewis Knudson y la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas: Cincuentenario. *Orquídea*, 229-236.
- Arditti J, Ernst R. 1992. Micropropagation of orchids. II Title. Department of Developmental and Cell Biology. University of California, Irvine. p. 665.
- Arditti, J. 2008. Micropropagation of orchids. 2 da. Ed. Blackwell Publishing Ltd. Cambridge 1: 2-4.
- Ávila DI, Salgado-Garciglia R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* 8: 38-149.
- Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):153-175.
- Barba A, Luna S, Romero J. 2002. Orquídeología Básica. Biotemas. U.I.B.V. FES. Zaragoza. Universidad Autónoma de México.
- Batygina T, Bragina E, Vasileyva V. 2003. The reproductive system and germination in Orchids. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* 45(2):21-34.
- Bhadra S, Hossain M. 2003. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 13(2):165-171.
- Buenavista T. 2010. A guidebook in orchid propagation. The Plant Biotechnology Laboratory Research and development rizal Technological University.
- Cañedo V, López A. 2016. Micropropagación de *Stanhopea tigrina* (Orchidaceae) especie amenazada. Resumen XX Congreso Mexicano de Botánica. p 9.
- Caponetti J, Gray D, Trigiano R. 2005. History of plant tissue and cell culture. En: Gray D, Trigiano R. eds. *Plant development and biotechnology* Ed. CRC press. p. 9.
- Cavalcante P, Willadino L, Días G, Tenório V. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36(10):13319-1324.

- Chávez M. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae) en diferentes etapas de desarrollo. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. México, D.F. p. 14.
- Chávez V, Flores A, Chávez V. 2007. Establecimiento *in vitro* de semillas de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae) en distintas etapas del desarrollo. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Chawla H. 2004. Introduction to plant biotechnology (2da. Ed.). Enfield, N.H.: Science Publishers, Inc.
- Chée R, M. Pool. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development on shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 16 (1):17-27.
- CONABIO. 2010. *Stanhopea tigrina* (torito morado). Distribución conocida. [ss<http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/statig\\_dcgw.xml?\\_httpcache=yes&\\_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc\\_html.xsl&\\_indent=no>](http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/statig_dcgw.xml?_httpcache=yes&_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc_html.xsl&_indent=no)
- Collado R, Bardón R, Agramonte E, Jiménez F, Pérez M, Gutiérrez O, Ramírez D. 2004. Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla* King). *Biotecnología Vegetal* 4(3):143-146.
- Cruz R. 2006. Micropropagación y adaptación condiciones ambientales de: *Phrosthechea vitellina* (Lindl) W.E. Higgs (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Estudios Superior Zaragoza, Universidad Autónoma de México, D.F.
- Damon A, Aguilar-Guerrero 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.
- Dodson CH, Frymire GP. 1961. Preliminary studies in the genus *Stanhopea* (Orchidaceae) *Annals of the Missouri Botanical Garden* 48(2): 137-172.
- Duarte SI. 2014. Germinación *in vitro* de *Barkeria uniflora* Lex. Dressler y Halbinger, una orquídea endémica de México. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Autónoma de México. México, D.F.
- Dorneles L, Trevelin V. 2011. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. *Iheringia Série Botânica* 66(2):167-174.
- Eskew D, Welch R, Norvell W. 1984. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. *Plant Physiology* 76 (3): 691-693.
- Ferl R, Paul AL. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B, Gruissem W, Jones R. eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, 312-357.
- Fisher A. 2007. Cultivo de orquídeas. 1ra. Ed. Gidesa. Argentina, Buenos Aires. p. 1-96.

- Flores-Escobar G, Legaria-Solano J, Gil-Vásquez I, Colinas-León MT. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3): 347-353.
- Flores-Escobar G, Gil-Vásquez I, Colinas-León MT, Mata-Rosas M. 2011. Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(1): 5-8.
- Flores-Palacios A, Brewster P. 2002. Introducción al cultivo de orquídeas. Instituto de Ecología A. C. y Asociación Mexicana de Orquideología.
- Gan S, Amasino R. 1996. Cytokinins in plant senescence: From spray and pray to clone and play. *Bioessays* 18 (7): 557–565.
- Gayá ST. 1995. Cultivo *in vitro* de orquídeas. *Horticultura* 108:99-100.
- George E. 1996. Plant propagation by tissue culture part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. p.1361.
- Hernández F. 2010. Historia de las Plantas de Nueva España. Instituto de Biología, UNAM. Tomo II. Capítulo LXXXII. Consultado de [www.ibiologia.unam.mx/plantasnuevaespana/historia\\_de\\_las\\_plantas\\_II\\_INM.html](http://www.ibiologia.unam.mx/plantasnuevaespana/historia_de_las_plantas_II_INM.html), México. p. 379.
- Hu CY, Wang PJ. 1983. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y. eds. Handbook of plant cell culture. Volume 1. Techniques for propagation and breeding. MacMillan Publishing Co. New York and London, pp 177-227.
- Iriondo AJM. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación agraria. Producción y protección vegetal* 16(1): 5-22.
- Jordán M, Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En: Squeo FA, Cardemil L eds. Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de la Serena. La Serena, Chile. p. 1-28.
- Kao N, Michayluk MR. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol* 96(2):135-141.
- Knudson L. 1921. La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. *Boletín de la Sociedad Española Historia Natural* 21: 250-260.
- Knudson L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid. *Seed American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Keithly J, Jones D, Yokoyama H. 1991. Survival and growth of transplanted orchid seedlings enhanced by DCPTA. *American Society Horticultural Science* 26(10):1284-1286.
- López AL, Olgún LP. 2013. El cultivo de tejidos vegetales como un método de propagación. En: Márquez J, Collazo M, Martínez M, Orozco A, Vázquez S, eds. Biología de Angiospermas. Capítulo III, Tema XIV. Las plantas y el hombre p 521-527. Facultad de Ciencias, UNAM.

- López R. 2010. Micropropagación *in vitro* de cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) por meristemas y yemas. Tesis de grado. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.
- López C, Rangel-Villafranco M. 2018. Propagación *in vitro* de *Galeandra greenwoodiana* y *Stanhopea herandezii*. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 5(2):28-38.
- Menchaca RA, Moreno D. 2011. Conservación de Orquídeas, una tarea de todos. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, Estado de México. p. 1-41.
- Merino ME. 1987. Medio de Cultivo. En: Hurtado D, Merino M, eds Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. p. 87-95.
- Monnier M. 1976. Culture *in vitro* de l'embryon immature de *Capsella bursapastoris* Moench. *Revue de cytologie et de biologie vegetales* 39:1-120.
- Montoya HLM. 1991. Cultivo de tejido vegetal. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. p. 77.
- Mora-Retana D, González M. 1996. Variabilidad floral de cuatro especies de *Stanhopea* (Orchidaceae). *Revista Biología Tropical* 44(2):517-523.
- Moreno D, Menchaca G. 2007. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Revista Foresta Veracruzana* 9 (2): 27-32.
- Mroginski L, Sansberro P, Flaschla E. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, eds Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 17-25
- Mroginski L.A, Roca WM. 1993. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. En: Roca W, Mroginsky L, eds Cultivo de tejidos en la agronomía. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. p.19-40.
- Mroginski E, Rey H, Mroginski L. 2003. *In vitro* plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliate*, Meliaceae). *New Forest* 25:177-184.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:33-497.
- Olmos S, Luciani G, Galdeano E. 2010. Micropropagación. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, eds Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 353-362.
- Organista V. 2015. Efectos de dos complementos naturales en el crecimiento *in vitro* en plántulas de *Stanhopea oculata* (G. Lodd) Lindl 1832 (Orchidaceae) una especie amenazada. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Biología, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. p. 4-24.
- Orellana P, García L, Bermúdez I, Veitía N, Romero C. 2002. Manejo de hijos y ápices de cultivares de *Musa* spp. para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis meses subcultivos *in vitro*. *Biotecnología vegetal* 2(2): 77-81.

- Overbeek J. 1954. Nomenclature of plant regulators. *Plant Physiological* 29 (3):307-308.
- Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. p 326.
- Radice S. 2010. Morfogénesis *in vitro*. Ed. INTA. Cap 2 de *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. p. 1-7.
- Ramos J. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Especialización en biotecnología agraria. Universidad Nacionalidad Abierta y a Distancia. Bogotá. p. 22-24.
- Roque A, Ardisana E. 2006. Obtención de posturas de papaya (*Carica papaya* L) cv. Maradol roja, por cultivo *in vitro* de segmentos nodales de plantas jóvenes. Universidad Agraria de La Habana, Facultad de Ciencias Agrícolas, Departamento de Biología. Las Tunas. Cuba.
- Sandoval J, Müller L. 1992. Influencia del tamaño del explante en la propagación *in vitro* de cuatro cultivares de musa. Turrialba (IICA) 42(2): 243-248.
- Seaton P, Ramsay M. 2015. Growing orchid from seed. *Royal Botanic Gardens* 1:451-456.
- Sedano G, Manzo A, Roldán R, Castellanos J. 2015. Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:451-456.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación (30 de diciembre de 2010). México, D.F.
- Sevilla R, Holle M. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. Ediciones Torre Azul, Primera Edición, Perú.
- Soto-Arenas MA, Solano-Gómez AR. 2007. Ficha técnica de *Stanhopea tigrina*. En: Soto-Arenas MA (comp.). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México, D.F.
- Street H. 1977. Cell suspension cultures-techniques. En Street H, ed *Plant tissue and cell culture*. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 59-97.
- Suárez O. 2004. Algunas Orquídeas de Oaxaca, Instituto Estatal de Ecología de Oaxaca, México. p.142.
- Taíz L, Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I, D. L. Sunderland, Massachusetts. p. 1- 1265.
- Téllez MA. 2011. *Diagnóstico de la familia Orchidaceae*. 1ra ed. Universidad Autónoma de Chapingo. p.100-103.
- Tinoco M. 2006. Adquisición de competencia para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya x esbetts*

- (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Autónoma de México. p. 5-139.
- Tinoco M, Mata M. 2007. Adquisición de competencia para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya x esbetts* (orchidaceae). *Lankesteriana* 7(1-2):1-16.
- Van der Pijl L, Dodson C. 1966. Orchid Flower: their pollination and evolution. University of Miami Press. p. 1- 213.
- Villalobos A, Velázquez A. 1982. Plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) Libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y ápices vegetativos. Chapingo, México. *Agrociencia* 48:107-118.
- Villalobos M, Thorpe A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W, Mroginski L. eds Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) p. 127-141.
- Viñas M, Jiménez V. 2011. Factores que influyen en la embriología somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana Biotecnológica* 13 (2):229-242.
- Whitten WM, Williams NH. 1992. Floral fragrances of *Stanhopea* (Orchidaceae). *Lindleyana* 7(3): 130-153.
- Xu Z, Sunderland N.1982. Inoculation density in the culture of barley anthers. *Scientia Sinica* 25(9):961-969.