



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la temperatura en la
supervivencia y el crecimiento *in*
vitro de *Laelia autumnalis* (Lex.)
Lindl. (Orchidaceae) en dos medios
de cultivo

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

JIMENA ITZEL GARCÍA NATERAS



Director de tesis:
Dr. Eduardo Alberto Pérez García

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2024



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.

HOJAS DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

García
Nateras
Jimena Itzel
55 42 82 78 88
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312041953

2. Datos del asesor

Dr.
Eduardo Alberto
Pérez
García

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Helia Reyna
Osuna
Fernández

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Diego
García
Meza

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Oscar
Hinojosa
Espinosa

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Beatriz
Zúñiga
Ruíz

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la temperatura en la supervivencia
y el crecimiento *in vitro* de *Laelia*
autumnalis (Lex.) Lindl. (Orchidaceae) en
dos medios de cultivo
50 pp
2024

Agradecimientos académicos

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con clave IN227371. Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca otorgada.

Al CCH Sur y a la Facultad de Ciencias de la UNAM por ser recintos importantes en mi formación académica.

Al Dr. Eduardo Alberto Pérez García, por brindarme la oportunidad de colaborar en proyectos de conservación de orquídeas.

Al Departamento de Ecología y Recursos Naturales y al taller “Investigación ecológica de comunidades y poblaciones” por proporcionarme las herramientas necesarias para la elaboración del presente proyecto.

Al Biól. Marco Antonio Romero Romero del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, por su apoyo técnico desde que inició mi proyecto.

Al Dr. Edgar Javier González Liceaga del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, por orientarme con los análisis estadísticos de mi proyecto de investigación.

A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos, responsable técnico del Invernadero de la Facultad de Ciencias, por el apoyo técnico y uso de las instalaciones.

Al Orquideario Miguel Ángel Soto de la Facultad de Ciencias por apoyarme con la aclimatización de las plantas sobrevivientes del presente proyecto.

A la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruíz del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, por el apoyo técnico y uso de las instalaciones.

A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias, por el apoyo técnico y uso de las instalaciones.

Al M. en C. Octavio González y a la M. en C. Wendy Juárez quienes imparten la optativa “El cultivo de tejidos vegetales como herramienta biotecnológica” en la Facultad de Ciencias.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla del Laboratorio de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales, por compartirme su técnica de CTV.

A mis compañeros del Invernadero de la Facultad de Ciencias, y en especial a Salvador Guillén Tinoco, por compartirme su experiencia y acompañarme en el mundo del CTV.

A la Asociación Mexicana de Orquideología por los apoyos proporcionados para asistir al Encuentro Mexicano de Orquideología.

A mis sinodales, la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, el M. en C. Diego García Meza, el Dr. Oscar Hinojosa Espinosa y la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruíz, por sus valiosos comentarios al presente proyecto.

Agradecimientos personales

A mi mamá, Angélica Nateras, por apoyarme hasta el último momento de la carrera. También por ayudarme a cumplir mis sueños. Gracias por estar a mi lado.

A mi papá, Jaime García, por acercarme a la vida en el campo y contribuir a mi interés por la conservación de las áreas naturales.

A mi hermana, Ángeles García, por ser mi fiel compañera, y a Víctor Rodríguez, porque siempre ha estado pendiente de mí.

A Juan Carlos Hernández, por guiarme a lo largo de la carrera y compartirme sus conocimientos de ciencia, diseño, música y deportes. Me siento muy afortunada de recibir tu cariño.

A mi familia de la Cd. de México (Julieta, Hermilo, Nayeli, Brandon, Daniel, Miguel y Litzzy), de Puebla (Irma, Ámbar, Caridad, Yolanda, Guadalupe y Sofía), y a la familia de Juan Carlos (Maru, EHO, Ale, Moni y Steph), por cada momento que hemos compartido, y en especial a Enrique, porque tus consejos me ayudaron mucho cuando se trataba de tomar decisiones.

A Irving Nieblas, Ollin Torres y Sofía García, por estar conmigo todos estos años, por ayudarme a desarrollar muchas habilidades y por compartir muchos momentos bonitos. Asimismo, a Javier Andrade porque de no ser por ti, no hubiera descubierto mi gusto por el baile.

A Asela, Eréndeni, y Eréndira -con quien compartí clase de biología en CCH Sur y terminamos coincidiendo en la licenciatura-, por hacer grata mi vida universitaria.

A Cekouat, por darme muchos ánimos, desde mi primera presentación del taller hasta el día de hoy en diferentes aspectos de mi vida.

A Silvana, Aura, David, Vanesa, Abraham, Stanislav, Mirna e Isabel por su compañía y apoyo en el Invernadero y Orquideario, así como a Valerie, Gabriel, Tamara, Paula y Damián.

A la M. en C. Patricia Olguín porque además de estar presente en todo momento para cualquier duda, se toma el tiempo para escucharme.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz del Invernadero de la Facultad de Ciencias por brindarme consejos durante el proceso de titulación.

Al Dr. Daniel León por sus invitaciones a diversos proyectos en la Sección de Algas del Herbario de la Facultad de Ciencias.

A Raymundo, por su disposición para escucharme y ofrecerme su sabio consejo.

A Hugo, Emiliano, Cinthia Reséndiz, Ricardo Medina, Israel Chávez y Mariana Ávila, quienes me han ayudado a desarrollar mis habilidades de comunicación y me han facilitado lo necesario para continuar con mi crecimiento profesional.

Por último, al Dr. Eduardo Alberto Pérez García, quien me ha apoyado incondicionalmente todos estos años, y quien me ha dado su confianza involucrándome en sus proyectos de investigación para la conservación de especies de orquídeas. Estoy completamente agradecida por la oportunidad de aprender y contribuir a tu noble causa. Tu apoyo ha marcado de manera significativa mi vida.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
El cultivo de tejidos vegetales en orquídeas	5
JUSTIFICACIÓN	7
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	8
ESPECIE DE ESTUDIO	9
MÉTODO	11
Obtención de plantas	11
<i>Desinfección y siembra de semillas</i>	11
<i>Subcultivo de protocormos</i>	13
Diseño experimental	13
<i>Desarrollo de plantines</i>	13
<i>Primera etapa experimental</i>	14
<i>Segunda etapa experimental</i>	17
Análisis estadísticos	19
<i>Primera etapa experimental</i>	19
<i>Segunda etapa experimental</i>	21
RESULTADOS	26
Primera etapa experimental	26
Segunda etapa experimental	31
DISCUSIÓN	38
Efecto de la temperatura	38
Efecto del medio de cultivo	40
Efecto de cápsula	41
CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA	44

RESUMEN

El aumento de temperatura, resultado del cambio climático, ha impactado a diversas plantas epífitas; aunque su efecto en *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl. sigue siendo desconocido. Esta orquídea, endémica de México, tenía una distribución amplia en el Eje Neovolcánico Transversal, pero actualmente se considera extinta en estado silvestre en la Ciudad de México. Las técnicas de cultivos vegetales (CTV) se han utilizado para evaluar algunos factores ambientales como el fotoperiodo y la temperatura. Se ha aprovechado el uso de fitorreguladores del crecimiento que contienen los suplementos orgánicos, como el agua de coco (AC) y el homogeneizado de plátano (HP), con el propósito de lograr medios de cultivo más asequibles. Asimismo, en este estudio se investigó el efecto de la temperatura y del uso de agua de coco y homogeneizado de plátano en la supervivencia y el crecimiento de *L. autumnalis*. Se registró la supervivencia y el crecimiento en plantines de *L. autumnalis* en dos etapas experimentales. La primera etapa consistió en evaluar el efecto de cuatro temperaturas (23 °C, 25 °C, 27 °C y 29 °C) y dos medios de cultivo utilizando el medio Murashige-Skoog (MS) modificado y dos suplementos orgánicos (MS+AC y MS+HP). La segunda etapa experimental evaluó el efecto de tres temperaturas (23 °C, 25 °C y 27 °C) y dos medios de cultivo (MS+AC y MS+HP). Los datos obtenidos se analizaron mediante GLM (Modelo Lineal Generalizado por sus siglas en inglés), GLMM (Modelo Lineal Generalizado Mixto por sus siglas en inglés), LM (Modelo Lineal por sus siglas en inglés), y LMM (Modelo Lineal Mixto por sus siglas en inglés). En ambas etapas experimentales, la supervivencia de los plantines de *L. autumnalis* dependió de la interacción entre la temperatura y el medio de cultivo. En la primera etapa, se encontró una mayor supervivencia en las temperaturas de 23 °C y 27 °C. Sin embargo, se obtuvieron resultados contrastantes en la segunda etapa experimental, ya que los plantines respondieron de manera diferencial a la temperatura y al medio de cultivo. En general, se encontró que los plantines tuvieron un mejor desempeño en temperaturas más bajas, especialmente cuando se utilizó agua de coco, aunque esta tendencia no se manifestó para las variables de: longitud del tallo, longitud de la raíz, y supervivencia. Se recomienda el uso de agua de coco en lugar de homogeneizado de plátano para obtener plantines de *L. autumnalis* con un mayor desarrollo, particularmente si hay condiciones de temperaturas elevadas.

Palabras clave: agua de coco, cultivo *in vitro*, homogeneizado de plátano, Modelo Lineal Generalizado Mixto, Modelo Lineal Mixto.

ABSTRACT

The increase in temperature, as a result of climate change, has impacted several epiphytic plants; however, its effect on *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl. remains unknown. This orchid, endemic to Mexico, had a broader distribution in the Trans-Mexican Volcanic Belt but is now considered extinct in the wild in Mexico City. Plant tissue culture techniques (PTC) have been used to evaluate some environmental factors such as photoperiod and temperature. The use of growth regulators contained in organic supplements, such as coconut water (CW) and banana homogenate (BH), have been exploited to achieve more affordable culture media. Likewise, this study investigated the effect of temperature and the use of coconut water and banana homogenate on the survival and growth of *Laelia autumnalis*. Survival and growth were recorded in *L. autumnalis* seedlings in two experimental stages. The first stage consisted of evaluating the effect of four temperatures (23 °C, 25 °C, 27 °C, and 29 °C) and two culture media using a modified Murashige-Skoog (MS) medium and two organic supplements (MS+CW and MS+BH). The second experimental stage evaluated the effect of three temperatures (23 °C, 25 °C, and 27 °C) and two culture media (MS+CW and MS+BH). The data obtained were analyzed by GLM (Generalized Linear Model), GLMM (Generalized Linear Mixed Model), LM (Linear Model), and LMM (Linear Mixed Model). In both experimental stages, the survival of *L. autumnalis* seedlings depended on the interaction between temperature and culture medium. In the first stage, higher survival was found at 23 and 27 °C temperatures. However, contrasting results were obtained in the second experimental stage, as seedlings responded differently to temperature and culture medium. Overall, it was found that seedlings performed better at lower temperatures, especially when coconut water was used. However, this trend was not apparent for the variables: stem length, root length, and survival. The use of coconut water instead of banana homogenate is recommended to obtain *L. autumnalis* seedlings with enhanced development, particularly if high-temperature conditions are present.

Keywords: coconut water, in vitro culture, banana homogenate, Generalized Linear Mixed Model, Linear Mixed Model.

INTRODUCCIÓN

Lograr predecir cómo responderán las especies de plantas ante el cambio climático es uno de los principales retos en la ecología (Parmesan y Hanley, 2015). Esto debido a que son los productores primarios, y sus respuestas podrían influir sobre las redes tróficas e incluso en el funcionamiento de los ecosistemas (Cleland *et al.*, 2007; Wolkovich *et al.*, 2012). El cambio climático global implica variaciones en la temperatura, la precipitación, el CO₂ atmosférico y la radiación solar UV, siendo estos factores abióticos más importantes (Häder y Barnes, 2019). Los cambios climáticos pueden influir en los aspectos fisiológicos y ecológicos de las plantas (Estrella y Menzel, 2006; Olaya-Arenas *et al.*, 2011; Wolkovich *et al.*, 2012).

Particularmente, la temperatura ambiental afecta diferentes aspectos del desarrollo y de la productividad vegetal (Hatfield y Prueger, 2015) y junto con la disponibilidad de agua y nutrientes, es un determinante principal del área de distribución de las especies (Körner y Hiltbrunner, 2018). Así mismo, la temperatura regula el crecimiento y el desarrollo de las plantas, y se encuentra involucrada en procesos fisiológicos, tales como la contractilidad de las raíces, la apertura estomática y la conducción del agua en el xilema (Hua, 2009; Mason y Raven, 2017). En un extremo, cuando la temperatura ambiental sobrepasa la temperatura de tolerancia fisiológica, las plantas pueden modificar sus respuestas fenológicas. Esto puede ser mediante la inhibición o el retraso de los procesos fenológicos (Cleland *et al.*, 2007; Häder y Barnes, 2019), o bien, con la inducción de la producción temprana tanto del follaje como de las flores (Wolkovich *et al.*, 2012). En el otro extremo, las bajas temperaturas también pueden inhibir el crecimiento de las plantas (Hua, 2009).

Además de los efectos directos de la temperatura sobre las plantas, este factor también regula otras variables ambientales como la humedad relativa. Esta última variable ambiental influye sobre la pérdida de agua en las plantas al abrir sus estomas para realizar el intercambio gaseoso (Driesen *et al.*, 2020). La humedad relativa, al ser una variable de carácter atmosférico, tiene un mayor impacto en plantas epífitas ya que dependen más de la humedad atmosférica y no tanto de la retención de la humedad en el suelo (Pérez-García y Meave, 2004).

Una planta epífita es aquella que habita sobre ramas o troncos de otra (forofito u hospedero). Los forofitos son principalmente árboles, pero pueden ser otro tipo de plantas como cactáceas columnares, arbustos, palmas, helechos arborescentes, cicadáceas, entre otras (De la Rosa *et al.*, 2018). Las epífitas son un ejemplo claro de plantas cuya diversidad y abundancia puede

explicarse por el incremento en la humedad relativa (Nadkarni y Solano, 2002; De la Rosa *et al.*, 2018). Por ejemplo, en México la mayoría de las especies de orquídeas habitan en el bosque de niebla (Hágsater y Arenas, 1998).

Como resultado del cambio climático global, las epífitas pueden sufrir un aumento en sus tasas de mortalidad, así como un decremento en las tasas de crecimiento (Nadkarni y Solano, 2002); en sequías, pueden propiciar incendios en el dosel (Soto-Arenas *et al.*, 2007).

Además de las limitaciones debidas a la poca disponibilidad de agua y nutrientes en el dosel, las plantas epífitas presentan algunas otras desventajas ya que el sustrato en donde se desarrollan es muy discontinuo y heterogéneo. Esta heterogeneidad ocurre entre forofitos de una misma especie como entre forofitos de especies distintas, así como los diferentes tamaños de éstos, su arquitectura particular, su edad, así como su ubicación espacial en distintos microambientes (Timsina *et al.*, 2016).

También, las distintas especies de forofitos pueden aportar otros niveles de variación debido a sus propias características arquitectónicas, tipo de corteza (lisas, rugosas, exfoliantes, etcétera), de pH, compuestos orgánicos (incluidas las sustancias alelopáticas), y el tipo y la cantidad de otros organismos que albergan (Benzing, 1990; Timsina *et al.*, 2016; Zotz, 2016). No obstante, existen diversas ventajas en el hábitat epífita, como son: (1) mejor dispersión de las semillas, (2) mayor exposición a los polinizadores, (3) mayor acceso a la luz y (4) evasión a los herbívoros (Valencia-Díaz *et al.*, 2007).

Las orquídeas (Orchidaceae), son una de las familias de angiospermas con más especies epífitas, sobre todo en la zona intertropical. Esta familia es una de las más diversas en todo el mundo, ya que existen aproximadamente 30,000 especies (Kindlmann *et al.*, 2023). Una de las hipótesis que ayudan a explicar esta gran diversidad radica justamente en la habilidad de explotar el medio epífita, ya que cerca del 70-80 % de las orquídeas son epífitas (Gravendeel *et al.*, 2004; Givnish *et al.*, 2015). Las orquídeas se clasifican en el orden Asparagales, dentro del clado Liliopsida (Villaseñor, 2004). La mayoría de las orquídeas epífitas pertenecen a la subfamilia Epidendroideae (Chase *et al.*, 2015). Esta subfamilia contiene más de 15,000 especies las cuales se caracterizan por poseer una sola antera fértil (adnada al estilo formando una columna) y las flores normalmente son resupinadas (Neyland, 1995).

Al igual que el resto de las orquídeas, las Epidendroideae tienen diversas causas endógenas que las hacen vulnerables y que sean plantas raras en estado silvestre. Entre estas causas se pueden

mencionar sus bajas tasas de germinación, crecimiento lento, ciclos de vida largos, e interacciones complejas con hongos micorrícicos y polinizadores (Dearnaley *et al.*, 2016; Fay, 2018). Además, las orquídeas epífitas generalmente tienen una distribución geográfica limitada y a menudo discontinua (De la Rosa *et al.*, 2018).

El cultivo de tejidos vegetales en orquídeas

Las orquídeas son un grupo muy atractivo desde diversos puntos de vista como pueden ser en la horticultura, el uso ceremonial, medicinal y alimenticio. Estas plantas son muy vulnerables a la sobreexplotación y a la pérdida de sus hábitats naturales (Swarts y Dixon 2009; Olaya-Arenas *et al.*, 2011; Dearnaley *et al.*, 2016; Fay, 2018). Debido a esto, para atender las crecientes demandas del mercado, así como para los esfuerzos de conservación, se ha recurrido al cultivo de tejidos vegetales (CTV) desde hace algún tiempo; no obstante, existe una urgente necesidad de innovar las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para que sean más eficaces para los distintos fines que persiguen (Shao *et al.*, 2017).

El cultivo de tejidos vegetales, o bien, cultivo *in vitro*, es un conjunto de técnicas que consisten en desarrollar y mantener tejidos vegetales en recipientes de cristal con un medio de cultivo nutritivo, bajo condiciones asépticas y en ambientes controlados (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Se ha usado el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) para la germinación y el crecimiento de orquídeas ya que contiene micronutrientes y macronutrientes que les aporta el hongo micorrícico en el medio natural (Salazar-Mercado, 2012). Esto es importante ya que las semillas de orquídeas carecen de reservas alimenticias, lo que hace que el embrión dependa del carbono y los nutrientes inorgánicos proporcionados por hongos simbióticos micorrícicos compatibles (Rasmussen, 1995; Dearnaley *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2017).

Asimismo, la agregación de aditivos al medio de cultivo como carbón activado y extracto de levadura, promueve varias respuestas como estimular y mejorar la germinación en orquídeas (Arditti, 1967). De igual manera, la adición de compuestos orgánicos como el homogeneizado de jitomate, el jugo de piña, el agua de coco y el homogeneizado de plátano, son benéficos en la germinación y el desarrollo de tejidos celulares ya que son fuentes de carbono, además de que son ricos en vitaminas, aminoácidos y fitohormonas (Arditti, 1967; Yong *et al.*, 2009; Salazar y Cancino, 2012; Salazar *et al.*, 2013). Unas de las ventajas del uso de compuestos orgánicos es la

producción de grandes volúmenes de material vegetal, así como alta supervivencia *ex vitro*. Decruse *et al.* (2003) han encontrado que la adición de agua de coco y homogeneizado de plátano produjo mayor tamaño en plantas de *Sthanoepa tigrina* Bateman ex Lindl. También encontraron mayor formación de raíces en el medio con homogeneizado de plátano. Los medios MS suplementados con agua de coco tienen mayor eficacia en la germinación y formación de plantas de *Phalaenopsis* Blume (Salazar-Mercado *et al.*, 2012); asimismo, en combinación con antioxidantes, promueven la formación de brotes y su elongación en *Anoectochilus elatus* Lindl. (Sherif *et al.*, 2016).

Los medios de cultivo *in vitro* han permitido la posibilidad de poner a prueba experimentalmente no sólo los nutrientes y reguladores del crecimiento en los medios de cultivo (Arditti, 1967; Zoltán *et al.*, 2011). También se han utilizado para evaluar el efecto de algunas variables ambientales (tales como el pH, el fotoperiodo, la intensidad y la calidad lumínica, la composición de gases y la temperatura), en: 1) el crecimiento de las plantas (Hughes 1981; Islam *et al.*, 2005; Alvarenga *et al.*, 2015); 2) la eliminación de virus (Hu *et al.*, 2015); 3) la estimulación de la producción de compuestos químicos, metabolitos primarios y secundarios o la actividad meristemática (Dias *et al.*, 2016; Fahad *et al.*, 2016; Anjum *et al.*, 2017); y 4) la inducción de la organogénesis o embriogénesis de una determinada planta (Duran-Vila *et al.*, 1992; Zeng *et al.*, 2014). En orquídeas se ha evaluado el efecto de la temperatura sobre la germinación de semillas y el desarrollo de las plantas en especies de los géneros *Bletilla* Rchb. f., *Brassavola* R. Br., *Calanthe* R. Br., *Cattleya* Lindl., *Cymbidium* Sw., *Cypripedium* L., *Dendrobium* Sw., *Disa* P.J. Bergius, *Epidendrum* L., *Galeola* Lour., *Goodyera* R. Br., *Laelia* Lindl., *Listera* R. Br., *Odontioda* hort., *Odontoglossum* Kunth, *Oncidium* Sw., *Ophrys* L., *Paphiopedilum* Pfitzer, *Phalaenopsis* Blume, *Rodriguezia* Ruiz & Pav., *Vanda* Jones ex R. Br., *Vandopsis* Pfitzer, *Vanilla* Mill., y *Zygopetalum* Hook. (Arditti, 1967; Kubota *et al.*, 2005; Gudiño *et al.*, 2015). También se ha evaluado el efecto de la temperatura en algunos híbridos, como $\times$ *Brassocattleya*, $\times$ *Brassolaeliocattleya* y $\times$ *Laeliocattleya* (Arditti, 1967; Blanchard y Runkle, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Las plantas epífitas sirven como fuente de agua y alimentos, así como para refugio a un numeroso grupo de animales que viven en la copa de los árboles. Además, las plantas epífitas tienen importancia ecológica porque actúan como bioindicadores de grados de disturbios. Se ha observado que este grupo de plantas son muy susceptibles a la falta de humedad atmosférica y esta condición ambiental está negativamente correlacionada con la temperatura, de tal forma que los incrementos en la temperatura las pueden poner en mayor riesgo de extinción. Esto debido a que la temperatura ambiental se suma a las otras variables que impactan negativamente a sus poblaciones. Al mismo tiempo, las orquídeas son sobreexplotadas por su valor cultural y ornamental, aunado a que su hábitat se ha reducido por diversos factores climáticos y antropogénicos. Hasta el último registro, se han extinguido cerca de 32 especies de orquídeas de los bosques mesófilos de montaña de México, todas estas especies de orquídeas eran epífitas, con pocas poblaciones, y con una preferencia estricta en su hábitat (Soto-Arenas *et al.*, 2007).

En este trabajo, se estudió el efecto de la temperatura sobre el crecimiento *in vitro* de una orquídea epífita, *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl., de ciclo de vida largo, endémica de México y considerada como localmente extinta en la Ciudad de México. Esta especie tiene un valor cultural muy fuerte dado que sus flores son utilizadas para adornar altares de muertos, iglesias, y cementerios en las festividades de los Días de Muertos, particularmente en el estado de Michoacán, Morelos y Estado de México. Así mismo, el estudio del incremento de la temperatura sobre las especies epífitas es un tema de gran relevancia, debido a la alta sensibilidad de este tipo de plantas ante el cambio climático global. El calentamiento de la Tierra y la consecuente disminución de la humedad relativa puede poner en riesgo a las orquídeas epífitas, pero hasta la fecha no hay estudios que lo demuestren.

HIPÓTESIS

Debido a que *Laelia autumnalis* es una especie que habita en zonas montañosas, de clima templado, se esperó que a mayor temperatura se incremente la tasa de mortalidad y que el crecimiento sea menor. Por otro lado, debido a que los medios de cultivo adicionados con homogeneizado de plátano suelen estimular el crecimiento de las raíces, se espera que los plantines de *L. autumnalis* cultivados en este tipo de medio de cultivo tengan más raíces respecto al medio adicionado con agua de coco.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de cuatro temperaturas diferentes en dos medios de cultivo sobre el crecimiento y la supervivencia *in vitro* de *Laelia autumnalis*.

Particulares

- a) Analizar la supervivencia de los plantines de *Laelia autumnalis* en dos medios de cultivo distintos, adicionado con agua de coco o con homogeneizado de plátano, y bajo cuatro temperaturas diferentes, en dos etapas de cultivo *in vitro*.
- b) Comparar el crecimiento vegetativo *in vitro* temprano (primera etapa de cultivo) de *Laelia autumnalis*, tanto en talla (longitud total, longitud del tallo y número de raíces) como de biomasa (peso fresco y seco), en dos medios de cultivo MS adicionados con agua de coco y con homogeneizado de plátano, bajo cuatro temperaturas diferentes.
- c) Comparar el crecimiento vegetativo en subcultivos *in vitro* avanzados (segunda etapa de cultivo) de *Laelia autumnalis*, tanto en talla (longitud total, longitud de la hoja, longitud de la raíz, longitud y grosor del tallo) como de biomasa (peso fresco y seco), en dos medios de cultivo MS adicionados con agua de coco y con homogeneizado de plátano, bajo tres temperaturas diferentes.

ESPECIE DE ESTUDIO

Laelia autumnalis es una orquídea endémica de las montañas del Cinturón Volcánico Transmexicano; crece en altitudes de 1,400 a 2,700 m s.n.m. En este intervalo altitudinal, se han registrado temperaturas medias anuales de entre 16.8 y 21.7 °C para la localidad de Uruapan, Michoacán, donde habita esta especie. *Laelia autumnalis* ha sido registrada en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Guanajuato, Michoacán, Guerrero, Morelos, Estado de México, Ciudad de México y Puebla. Frecuentemente *L. autumnalis* crece sobre encinos y ocasionalmente en rocas, se encuentra en bosques deciduos a perennifolios, tanto en bosques de encino, mixtos de pino-encino y en bosques mesófilos de barranca (Halbinger y Soto, 1997). Se tiene información de que esta especie habitaba en la Ciudad de México, pero actualmente se considera extinta en esta entidad (Salazar *et al.*, 2016). Los nombres comunes para esta orquídea son “flor de las ánimas”, “flor de todos santos” “San Diegos”, “flor de los muertos”, “flor de la calavera”, “flor de catarinas”, “flor de encino”, “lirio de San Francisco”, “gallitos”, “ahoatxóchitl”, “ahusúchil”, “tzauhtli”, “tzacuxóchitl”, “ahuaxóchitl” y “chichitictepetzacuxóchitl” (Balme, 1946; Wright, 1958; Román-Torres *et al.*, 2014). *Laelia autumnalis* se usa en la medicina tradicional para el alivio de la tos y la hipertensión, ya que tiene propiedades vasodilatadoras (Aguirre-Crespo *et al.*, 2005). También se usaba el mucílago que contienen sus pseudobulbos para realizar figuras, principalmente calaveras, a partir de una pasta moldeable, y para el *tzauhtli*, que es un pegamento utilizado en la manufactura plumaria. Actualmente, este uso se restringe a Michoacán (Hágsater *et al.*, 2005). Además, debido a que su floración ocurre en los meses de octubre y noviembre, *L. autumnalis* tiene valor ornamental en la temporada de día de muertos, tanto en las ofrendas, como en panteones e iglesias de los estados de Michoacán, Morelos y Estado de México (Hágsater *et al.*, 2005).

Las dimensiones del vástago de *Laelia autumnalis* son de 20 a 40 cm de altura sin considerar la inflorescencia. Tienen rizoma y las raíces son blanquecinas y redondas, de 1 a 2.5 mm de diámetro. Transversalmente los pseudobulbos son elípticos, ligeramente comprimidos, de color verde oscuro, cubiertos por los restos de vainas papiráceas y de 4-11 cm de largo y 1.2-4 cm de ancho. Generalmente hay dos hojas por pseudobulbo y éstas son coriáceas, arqueadas y subagudas, de 9-23 cm de largo. Las inflorescencias son de 40-100 cm de largo y tienen de 4 a 13 flores, con raquis de 8 a 36 cm (Figura 1). Las flores son de color lila a magenta, miden de 6.5 a 11 cm de diámetro y tienen fragancia débil, aunque intensa cuando se expone a la luz solar. En cuanto a los frutos, son cápsulas elipsoides con 3 quillas de 36 mm de longitud y 28 mm de

diámetro, el pedicelo llega a medir 25 mm y el pico apical 8 mm de longitud. *Laelia autumnalis* alcanza la etapa reproductiva después de los 6-9 años (Halbinger y Soto, 1997). Entre los hongos patógenos que llegan a tener las plantas de *L. autumnalis* son *Fusarium bactridioides* Wollenweber, *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg y *F. solani* (Mart.) Sacc. (Almanza-Álvarez *et al.*, 2017).

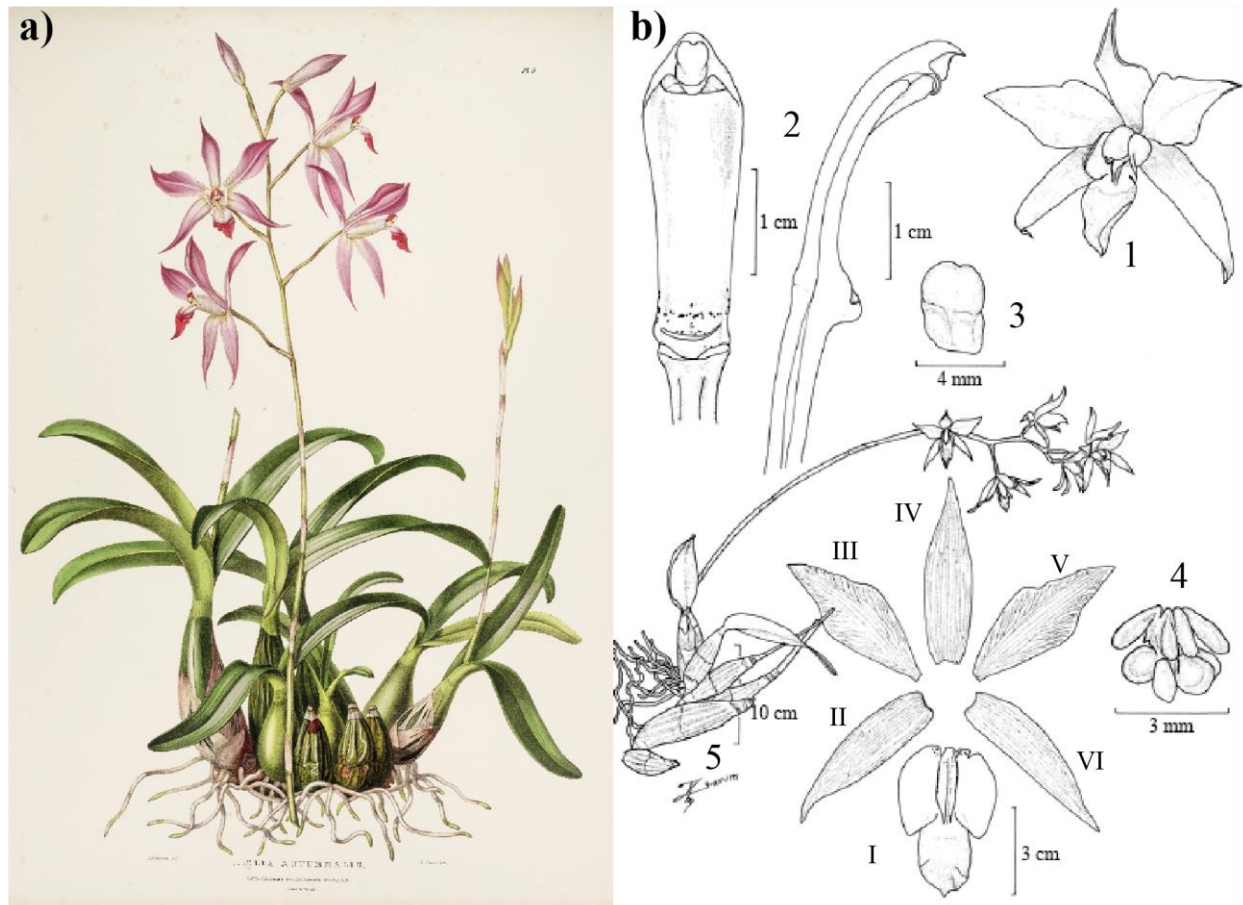


Figura 1. a) Ilustración de *Laelia autumnalis* (Bateman, 1895) y **b)** esquema modificado de *Laelia autumnalis* fo. *atrorubens* (Halbinger y Soto, 1997), señalando: flor (1), columna (2), cápside (3), polinios (4), pseudobulbo (5), labelo (I), sépalos (II, IV y VI) y pétalos (III y V).

Dentro de *Laelia autumnalis* se han reconocido tres formas: *L. autumnalis* fo. *autumnalis*, *L. autumnalis* fo. *atrorubens* (Gower) Halb. y *L. autumnalis* fo. *xanthotrophis* (Rchb. f.) Halb. & Soto Arenas. Así mismo se han reconocido algunas variedades hortícolas como *alba*, *semialba* y *cerúlea* (Halbinger y Soto, 1997).

MÉTODO

Obtención de plantas

Desinfección y siembra de semillas

Se desinfectaron y sembraron semillas de cuatro cápsulas maduras que se obtuvieron a partir de polinización manual en el Orquideario Miguel Ángel Soto, Facultad de Ciencias, UNAM. Esta polinización manual se realizó con las siguientes cruces: (1) *Laelia autumnalis* rubra $\times$ *L. autumnalis* fo. *atrорubens*, (2) *L. autumnalis* fo. *xanthotrophis* $\times$ *L. autumnalis* fo. *atrорubens*, (3) *L. autumnalis* fo. *atrорubens* $\times$ sí misma y (4) *L. autumnalis* rubra $\times$ *L. autumnalis* fo. *atrорubens*.

En una hoja de papel se colocaron las semillas de una cápsula para posteriormente desinfectarlas y sembrarlas por el método de jeringa (Figura 2A). Este método consistió en retirar la aguja colocando en su lugar una gasa estéril de 5 $\times$ 5 cm, doblada a la mitad, y sujeta con una liga; luego se quitó el émbolo de la jeringa y se introdujeron las semillas de tal forma que no sobrepasara la marca de 3 ml. Después se colocó el émbolo a la jeringa y se aforó a 5 ml con una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 15% y 3 gotas de jabón líquido para trastes (Salvo®) como desinfectante. Durante 15 minutos se agitó ligeramente la jeringa para homogeneizar la mezcla.

Después del tiempo de agitación, se trabajó en la campana de flujo laminar. Se retiró la solución de hipoclorito de sodio bajando el émbolo de la jeringa y enseguida se aforó a 5 ml con agua estéril. Se hicieron tres enjuagues de esta forma. Por último, se aforó la jeringa a 5 ml con agua estéril y se agitó ligeramente hasta volver una mezcla homogénea.

Para la siembra de las semillas previamente desinfectadas se retiró la gasa de la jeringa y se distribuyó la mezcla de semillas en los envases de vidrio (frasco Gerber® de 113 g, con tapa transparente), con 15 ml de medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962; Phyto Technology Laboratories®), al 30%, adicionado con 20 ml/L de vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina-HCl y tiamina-HCl), 20 g.L⁻¹ de azúcar refinada, 1 g L⁻¹ de levadura, 1 g.L⁻¹ de dextrosa, 2 g.L⁻¹ de carbón activado y 6.5 g.L⁻¹ de agar bacteriológico. El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.6.

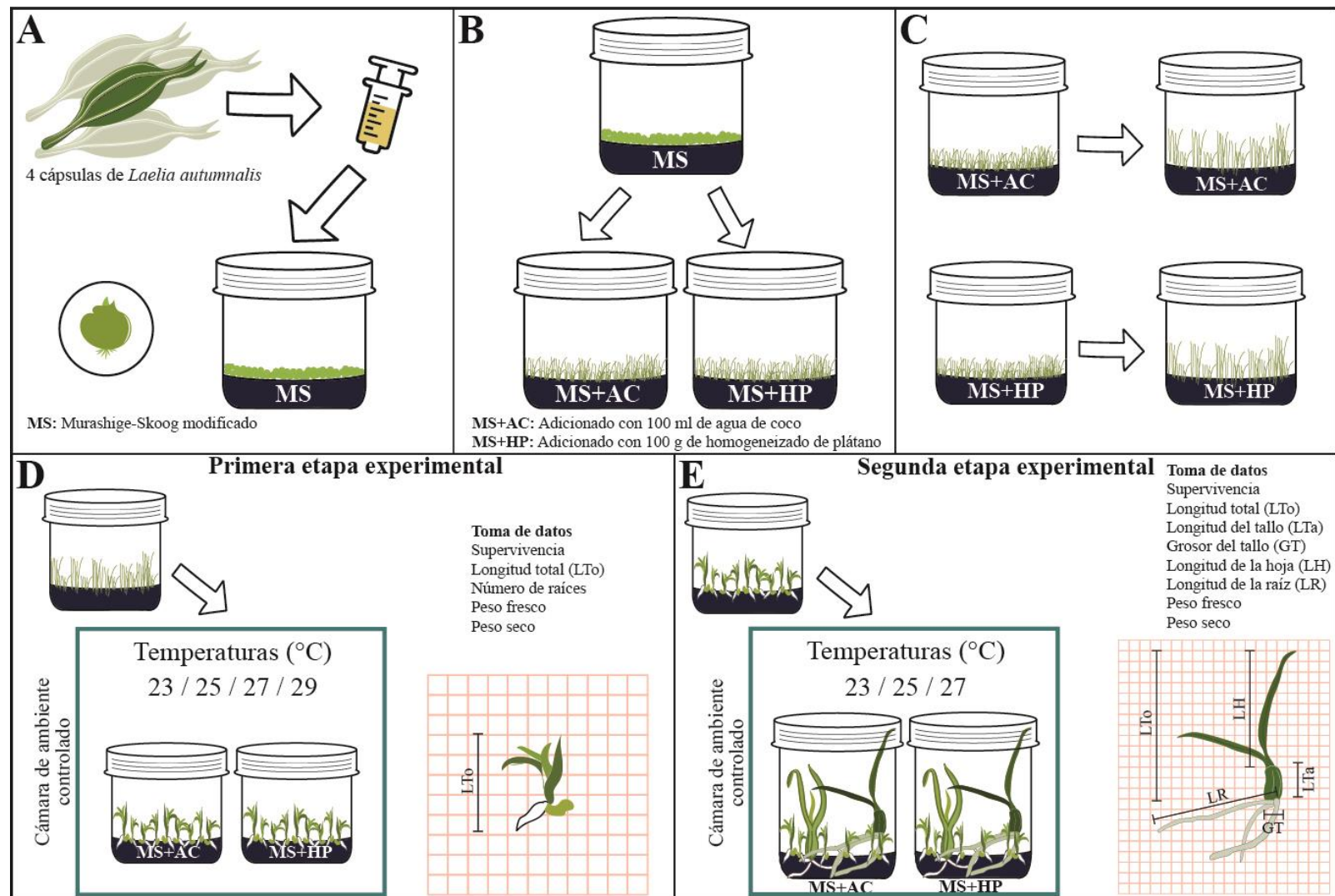


Figura 2. Método experimental. A) Desinfección y siembra de semillas. B) Primer subcultivo: siembra de protocormos a los 2 meses posteriores a su germinación. C) Segundo subcultivo: siembra de plantines a los 4 meses posteriores a la siembra de protocormos. D) Primera etapa experimental: ingreso de los cultivos a los tratamientos de temperatura durante 3 meses. Al término de este tiempo, se realiza subcultivo de los plantines restantes. E) Segunda etapa experimental: ingreso de los cultivos, plantines subcultivados previamente, a los tratamientos de temperatura durante 5 meses. Al término de este tiempo, las plantas restantes se aclimataron en invernadero.

Subcultivo de protocormos

A los dos meses, las semillas comenzaron a germinar, que consistió en la expansión del embrión y la ruptura de la testa, e inició la formación del protocormo. Este último es una masa de células que puede diferenciarse en plantín, o formar cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) (Arditti y Ernst, 1993; Johnson y Kane, 2007; Salazar y Cancino, 2012). Los protocormos tienen 1) una región apical, correspondiente al ápice del brote, 2) una parte basal formada por grandes células que actúan como reserva orgánica, y 3) rizoides (Free *et al.*, 2003).

Se realizó un primer subcultivo de los protocormos (Figura 2B) en dos medios de cultivo diferentes, con medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962; Phyto Technology Laboratories®) al 30%, 25 g.L⁻¹ de azúcar refinada, 1 g.L⁻¹ de levadura y dextrosa, 2 g.L⁻¹ de carbón activado, 6.5 g.L⁻¹ de agar bacteriológico y suplementado con un componente orgánico, agua de coco verde y homogeneizado de plátano. Al primer medio de cultivo se le agregó 100 ml/L de agua de coco verde (MS+AC), mientras que al segundo se le incorporó 100 g.L⁻¹ de homogeneizado de plátano dominico semimaduro (MS+HP). El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.6.

Diseño experimental

Desarrollo de plantines

Después de cuatro meses desde el primer subcultivo, los protocormos se diferenciaron dando lugar a plantines que contaban con al menos dos hojas. Se realizó un segundo subcultivo para los plantines obtenidos (Figura 2C). Para ello, los plantines se extrajeron de los frascos y se fueron colocando en una caja de Petri estéril. Ahí se seleccionaron los plantines que tuvieran tallas mayores a 1 cm, pero menores a 2 cm de largo (sin considerar la raíz). Este criterio se utilizó para descartar ambos extremos de tamaño en los plantines, pero seleccionando a los que probablemente tuvieran las mayores posibilidades de sobrevivir.

De los plantines seleccionados para el experimento, se sembraron 30 en cada envase de vidrio (frasco Gerber® de 113 g, con tapa transparente) con 25 ml de medio de cultivo con algún componente orgánico, ya sea agua de coco u homogeneizado de plátano, pero alternando los medios de cultivo, es decir, un grupo de 30 plantines en el medio MS+AC y luego el otro grupo de 30 en el medio MS+HP. Este procedimiento se siguió hasta que se sembraron todos los frascos

experimentales (196 en total), más 20 frascos para reposición en caso de contaminación. Cabe señalar que se realizó el intercambio de 6480 plantines de ambos medios de cultivo para borrar del experimento el posible efecto del medio de cultivo. La preparación del medio de cultivo para este segundo subcultivo se hizo de la misma forma que para el primero.

Algunos de los plantines que se obtuvieron en este segundo subcultivo se separaron para tener puntos de referencia del tamaño inicial; para ello se tomó su longitud total, el peso fresco y seco, y se registró la presencia de alguna raíz. Para esto se tomaron entre 5 y 20 plantines por cada uno de los frascos por cápsula y por medio de cultivo (de 3 a 5 frascos por tratamiento) y se obtuvo un promedio por frasco para cada variable.

Primera etapa experimental

El proceso de obtención de los frascos experimentales se extendió durante tres meses, debido a que hubo diversos problemas de contaminación que en algunos casos tardaron varias semanas en manifestarse. En caso de que algún frasco presentara contaminación, se reponía con otro. Cada frasco fue numerado y etiquetado de acuerdo con la cápsula de origen de las semillas y el tipo de medio de cultivo que contenía.

Al azar se tomaron seis frascos por cápsula para cada medio de cultivo y se asignaron a cada uno de los cuatro tratamientos de temperatura (23 °C, 25 °C, 27 °C y 29 °C) (Figura 2D). La temperatura se controló en cámaras de germinación con fotoperiodo (18 h luz). En total se tuvieron 192 frascos con 30 plantines cada uno ($6 \text{ frascos} \times 4 \text{ cápsulas} \times 2 \text{ medios de cultivo} \times 4 \text{ temperaturas}$).

Los plantines permanecieron en las cámaras de germinación durante 4 meses (Figura 3). Al final de este tiempo, se evaluó la supervivencia por frasco. Debido a que se requería del mayor número posible de plantines para el siguiente experimento, las medidas del crecimiento final para esta primera etapa se tomaron de submuestras de cada frasco.

El número de plantines obtenido de cada frasco varió considerablemente, dependiendo de la supervivencia de los plantines de cada uno de ellos. De esta forma, primero se tomaron los plantines que se requerían para continuar con la segunda etapa del experimento y después se tomó el mayor número posible de plantines para tener una media del crecimiento de esta etapa. Cabe

señalar que la cosecha de estos plantines se realizó en condiciones asépticas (en la campana de flujo laminar) al momento del subcultivo de los plantines para la segunda etapa del experimento.

A los plantines cosechados se les tomó la longitud total, la cual fue medida desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja más larga. Además, se contó el número de raíces, y se tomó el peso fresco y el peso seco de los plantines. Posteriormente se obtuvo el promedio por frasco para cada variable, excepto la de supervivencia.

El número de plantines cosechados para evaluar las variables de crecimiento fue de 1 a 13 plantines por frasco, pero en la mayoría de los casos el número de plantines evaluados fue de tres; se omitieron aquellos frascos que no tuvieran muchos plantines sobrevivientes por frasco, por lo que no se incluyeron en la etapa experimental. Por este motivo, y por la contaminación desarrollada a lo largo de esta etapa experimental, el número de frascos analizados varió entre los tratamientos de temperatura y de medio de cultivo.

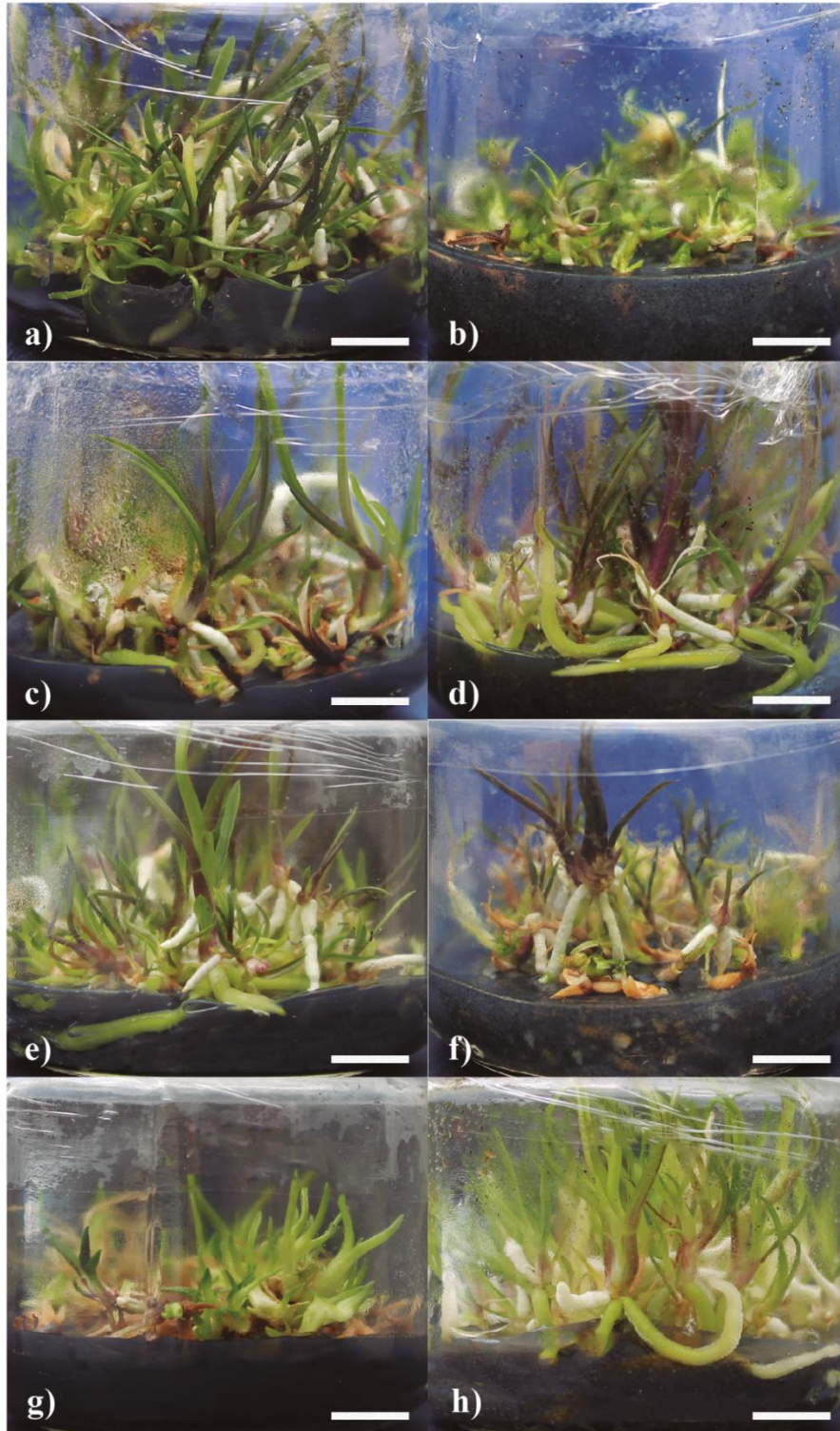


Figura 3. Plantines *in vitro* de *Laelia autumnnalis* en la primera etapa experimental con diferentes temperaturas: 23 °C (a y b), 25 °C (c y d), 27 °C (e y f) y 29 °C (g y h), y medio de cultivo MS adicionado con agua de coco (a, c, e, g) y homogeneizado de plátano (b, d, f, h). Escala (barra blanca) = 1 cm.

Segunda etapa experimental

Los plantines que no fueron cosechados en la primera etapa experimental se subcultivaron en frascos de vidrio con más volumen respecto a los utilizados en la primera etapa experimental. En esta etapa se utilizaron frascos Gerber® de 170 g, con tapa transparente y con 35 ml de medio de cultivo. En cada frasco se colocó medio de cultivo nuevo, preparado de la misma manera que en la etapa anterior. Cada planta se sembró en sus mismas condiciones experimentales; es decir, se mantuvieron en el mismo tipo de medio y de temperatura a los que previamente estuvieron expuestas. Cada frasco tenía un número variable de plantines, esto dependió del tamaño de los plantines, así como del número de plantines sobrevivientes en cada frasco. Los plantines que medían menos de 2 cm se sembraron hasta 15 por frasco, mientras que los que medían entre 2 y 4 cm se sembraron hasta 10 por frasco, y los que tenían una talla mayor a 4 cm se colocaron sólo 5 o menos por frasco. Una vez finalizada la siembra de 1,943 plantines sobrevivientes de la primera etapa experimental, se trasladaron a las cámaras de germinación con su correspondiente tratamiento de temperatura, 23 °C, 25 °C y 27 °C (Figura 2E). Se suprimió el tratamiento de temperatura de 29 °C debido a que hubo muy baja supervivencia de plantines, de tal forma que estos se asignaron aleatoriamente (respetando su cápsula y su medio de cultivo) a los tratamientos de temperatura (23 °C, 25 °C y 27 °C).

Debido a que el número de plantines que se sembraron por frasco fue variable, los tratamientos tuvieron diferente número de frascos, por lo que se obtuvieron 212 frascos en total. En consecuencia, las variables de respuesta se tomaron a partir de un plantín por cada frasco. Para ello, se seleccionó la planta más grande que estuviera cerca de la pared del frasco, y se marcó por fuera de este para hacer mediciones. Los plantines se mantuvieron dentro de las cámaras de ambiente controlado durante cinco meses. Mensualmente al plantín seleccionado se le midió la longitud total, la longitud y el grosor del tallo, y la longitud de la hoja. Si el plantín seleccionado moría, se sustituía por otro bajo los mismos criterios de selección. Al finalizar los cinco meses del experimento (Figura 4), se evaluó el número de plantines vivos respecto al número total de plantines por frasco para obtener la probabilidad de supervivencia, luego se cosechó el plantín monitoreado y se le tomaron medidas de longitud total, longitud y grosor del tallo, longitud de la hoja, longitud de la raíz y, por último, se registró el peso fresco y el peso seco de cada ejemplar.

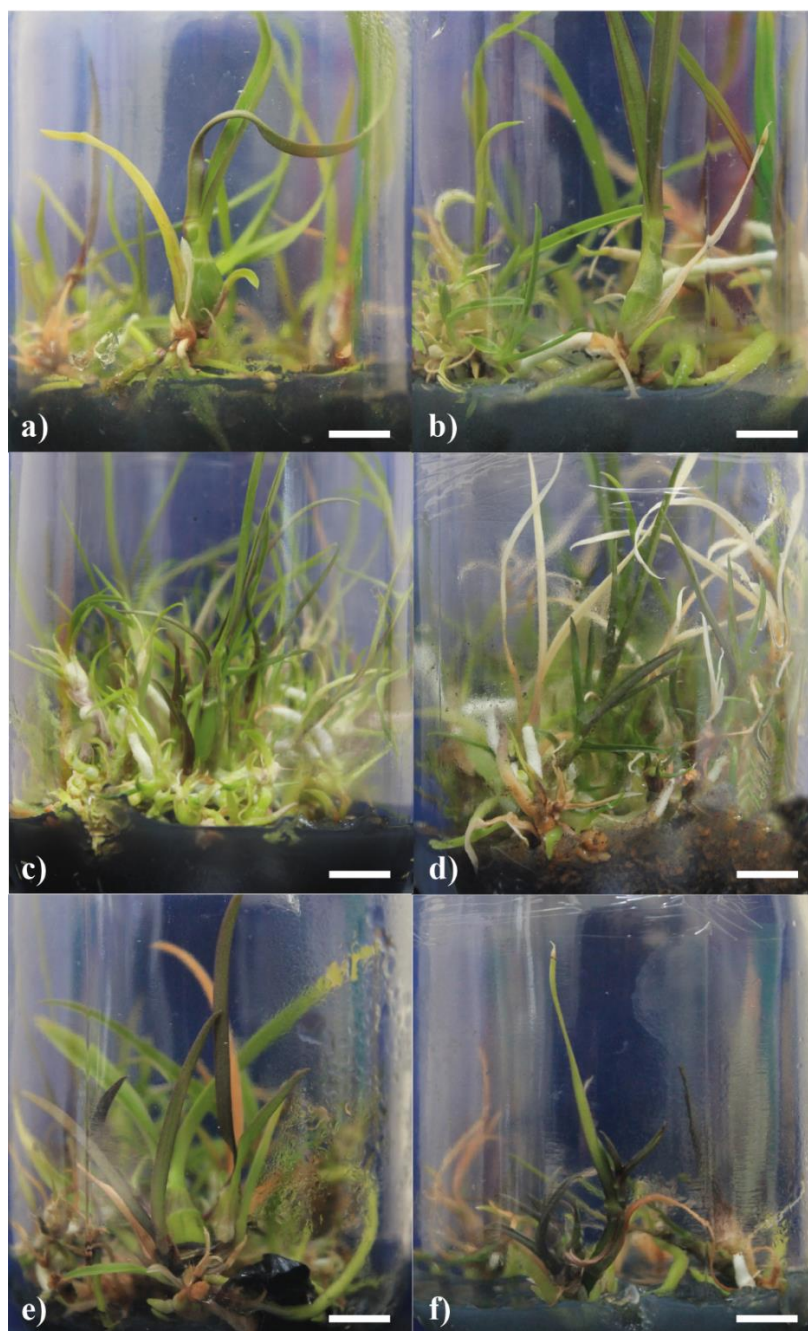


Figura 4. Plantines *in vitro* de *Laelia autumnalis* en la primera etapa experimental con diferentes temperaturas: 23 °C (a y b), 25 °C (c y d) y 27 °C (e y f), y medio de cultivo adicionado con agua de coco (a, c y e) y homogeneizado de plátano (b, d y f). Escala (barra blanca) = 1 cm.

Análisis estadísticos

Primera etapa experimental

Para analizar la probabilidad de supervivencia en la primera etapa, se realizaron modelos lineales generalizados mixtos (GLMM, por sus siglas en inglés Generalized Linear Mixed Model) en el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2022) con la función “glmer” (Bates *et al.*, 2015) tomando en cuenta la temperatura y el medio de cultivo como efectos fijos, mientras que la cápsula de procedencia de las semillas se consideró como un efecto aleatorio. Los criterios para elegir el mejor modelo explicativo fueron: (1) que tuviera el menor valor del Criterio de Información Akaike (AIC, por sus siglas en inglés Akaike information criterion) y (2) que los intervalos de confianza del efecto aleatorio no fueran igual a cero. Los siguientes son cinco GLMM para la variable de supervivencia:

$$\text{Supervivencia} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Supervivencia} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Supervivencia} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Supervivencia} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Supervivencia} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Tres de las cuatro variables de crecimiento (promedios de longitud total, peso fresco y peso seco) se normalizaron con la función “log” y se analizaron a partir de modelos lineales mixtos (LMM, por sus siglas en inglés Linear Mixed Model). En caso de que el intervalo de confianza del efecto aleatorio (cápsula) fuera igual a cero, se procedió a usar un modelo lineal (LM, por sus siglas en inglés Linear Model). En ambos casos se consideraron como los mejores modelos a aquellos que tuvieran los menores valores de AIC. Para realizar el modelaje se ocuparon las funciones “lmer” y “lm” (Bates *et al.*, 2015), en el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2022).

Se realizaron cinco LMM para la variable de longitud total:

$$\text{Longitud total} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

También, se realizaron cinco LM para la variable de longitud total descartando el efecto aleatorio, la cápsula:

$$\text{Longitud total} \sim 1$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Se realizaron cinco LMM para la variable de peso fresco:

$$\text{Peso fresco} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Además, se realizaron cinco LM para la variable de peso fresco descartando el efecto aleatorio, la cápsula:

$$\text{Peso fresco} \sim 1$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Se realizaron cinco LMM para la variable de peso seco:

$$\text{Peso seco} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Igualmente, se realizaron cinco LM para la variable de peso seco descartando el efecto aleatorio, la cápsula:

$$\text{Peso seco} \sim 1$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Se realizaron cinco GLMM para la cuarta variable de crecimiento, promedio del número de raíces:

$$\text{Número raíces} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Número raíces} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Número raíces} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Número raíces} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Número raíces} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Sin embargo, debido a que el intervalo de confianza del efecto aleatorio fue igual a cero, se realizaron cinco modelos lineales generalizados (GLM, por sus siglas en inglés Generalized Linear Model) para esta última variable, descartando el efecto aleatorio y usando la función “glm”, en el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2022):

$$\text{Número raíces} \sim 1$$

$$\text{Número raíces} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Número raíces} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Número raíces} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Número raíces} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Segunda etapa experimental

De la misma forma que en la primera etapa experimental, la probabilidad de supervivencia se analizó con GLMM en el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2022) con la función “glmer” (Bates *et al.*, 2015), tomando en cuenta la temperatura y el medio de cultivo como efectos fijos, y la cápsula como efecto aleatorio. Así mismo, los criterios para elegir el mejor modelo de

probabilidad de supervivencia fueron: (1) que tuviera el menor valor de AIC y (2) que los intervalos de confianza del efecto aleatorio no fueran igual a cero. Se realizaron cinco modelos para la variable de supervivencia:

$$\text{Supervivencia} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Supervivencia} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Supervivencia} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Supervivencia} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Supervivencia} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Las variables de crecimiento (longitud total, longitud y grosor del tallo, longitud de la hoja, longitud de la raíz, peso fresco y peso seco) se analizaron a partir de LMM, o en algunos casos LM, según los criterios para seleccionar el mejor modelo, con las funciones “lmer” y “lm” respectivamente (Bates *et al.*, 2015) con el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2022); también se normalizaron las variables de crecimiento con la función “log”. Si los intervalos de confianza del efecto aleatorio eran igual a cero del modelo con menor AIC de los LMM, se procedía a realizar LM descartando el efecto aleatorio. La selección del mejor LM fue aquel que tuviera el menor valor de AIC.

Se realizaron cinco LMM para la variable longitud total:

$$\text{Longitud total} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Además, se realizaron cinco LM para la variable longitud total descartando el efecto aleatorio:

$$\text{Longitud total} \sim 1$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud total} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Para la variable de longitud del tallo, se realizaron cinco LMM:

$$\text{Longitud del tallo} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud del tallo} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud del tallo} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud del tallo} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud del tallo} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Asimismo, se realizaron cinco LM para la variable de longitud del tallo descartando el efecto aleatorio:

$$\text{Longitud del tallo} \sim 1$$

$$\text{Longitud del tallo} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Longitud del tallo} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud del tallo} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud del tallo} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Se realizaron cinco LMM para la variable de grosor del tallo:

$$\text{Grosor del tallo} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Grosor del tallo} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Grosor del tallo} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Grosor del tallo} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Grosor del tallo} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

También se realizaron cinco LM para la variable de grosor del tallo descartando el efecto aleatorio:

$$\text{Grosor del tallo} \sim 1$$

$$\text{Grosor del tallo} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Grosor del tallo} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Grosor del tallo} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Grosor del tallo} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Se realizaron cinco LMM para la variable de longitud de la hoja:

$$\text{Longitud de la hoja} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud de la hoja} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud de la hoja} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud de la hoja} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud de la hoja} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

También se realizaron cinco LM para la variable de longitud de la hoja descartando el efecto aleatorio:

$$\text{Longitud de la hoja} \sim 1$$

$$\text{Longitud de la hoja} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Longitud de la hoja} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud de la hoja} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud de la hoja} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Se realizaron cinco LMM para la variable de longitud de la raíz:

$$\text{Longitud de la raíz} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud de la raíz} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud de la raíz} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud de la raíz} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Longitud de la raíz} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

También se realizaron cinco LM para la variable de longitud de la raíz descartando el efecto aleatorio:

$$\text{Longitud de la raíz} \sim 1$$

$$\text{Longitud de la raíz} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Longitud de la raíz} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud de la raíz} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Longitud de la raíz} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Se realizaron cinco LMM para la variable de peso fresco:

$$\text{Peso fresco} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Además, se realizaron cinco LM para la variable de peso fresco descartando el efecto aleatorio:

$$\text{Peso fresco} \sim 1$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Peso fresco} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

Se realizaron cinco LMM para la variable de peso seco:

$$\text{Peso seco} \sim 1 + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo} + (1|\text{cápsula})$$

Por último, se realizaron cinco LM para la variable de peso seco descartando el efecto aleatorio:

$$\text{Peso seco} \sim 1$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura}$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} + \text{medio de cultivo}$$

$$\text{Peso seco} \sim \text{temperatura} \times \text{medio de cultivo}$$

RESULTADOS

Primera etapa experimental

(a) **Supervivencia:** el modelo que mejor explicó la probabilidad de supervivencia fue el que incluyó todos los efectos y su interacción ($Supervivencia \sim temperatura \times medio\ de\ cultivo + (1|cápsula)$) (Tabla 1). Contrariamente a lo que se había considerado originalmente, la procedencia de las semillas (cápsula) tuvo un efecto para esta variable, ya que los intervalos de confianza del efecto aleatorio no fueron igual a cero (IC inferior = 0.17; IC superior = 0.76), aunque esto sólo fue importante cuando el modelo incluyó las dos variables explicativas (temperatura y medio de cultivo) y su interacción. Los plantines con la menor supervivencia fueron los que provinieron de la cruce de *Laelia autumnalis* fo. *xanthotrophis* $\times$ *L. autumnalis* fo. *atrorubens*. El modelo que tuvo mayor apoyo incluye todos los factores, sin embargo, no se encontró un patrón muy claro. En general, la supervivencia de los plantines fue mejor en el medio MS adicionado con agua de coco. Para la temperatura, la supervivencia tiende a disminuir conforme ésta aumenta (Figura 5), de forma tal que la menor supervivencia se encontró a los 29 °C. No obstante, la mayor supervivencia se presentó en un punto intermedio (a los 27 °C con medio MS adicionado con agua de coco) (Figura 6a).

Tabla 1. Valores de AIC y ΔAIC para los modelos lineales generalizados mixtos realizados para la supervivencia de los plantines de *Laelia autumnalis* en la primera etapa experimental.

Modelo	<i>g.l.</i>	AIC	ΔAIC
Nulo (1 + (1 cápsula))	2	2520.22	233.60
Temperatura + (1 cápsula)	3	2327.22	40.60
Medio de cultivo + (1 cápsula)	3	2482.89	196.27
Temperatura + Medio de cultivo + (1 cápsula)	4	2289.17	2.55
Temperatura $\times$ Medio de cultivo + (1 cápsula)	5	2286.62	0.00

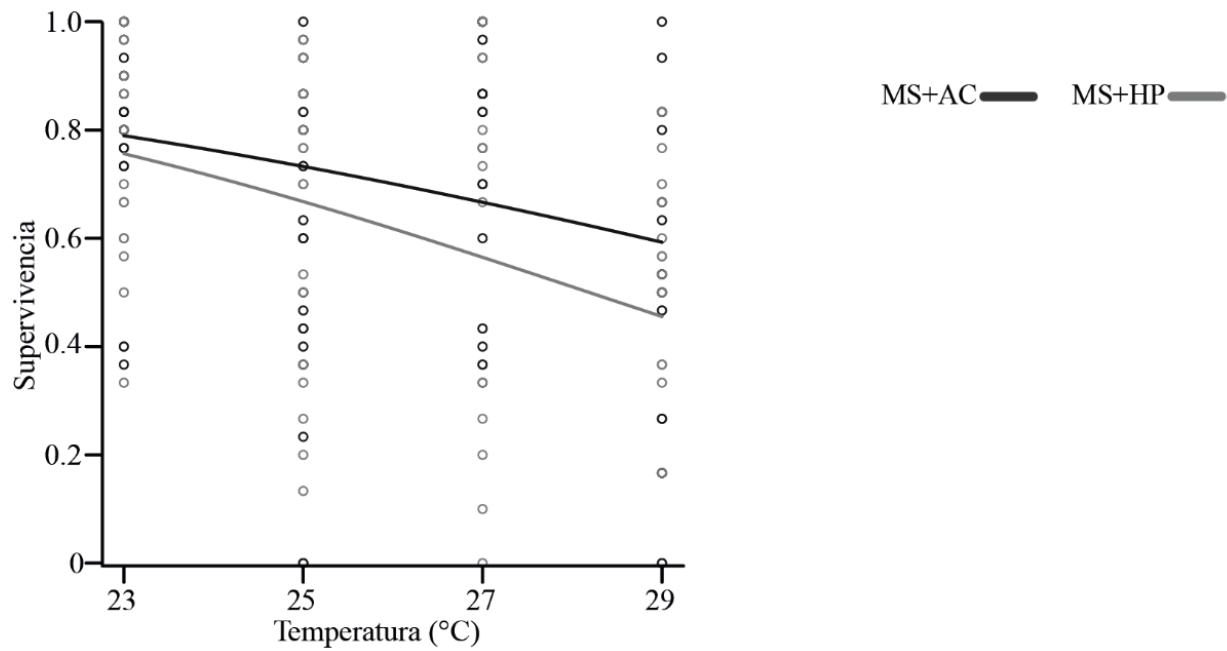


Figura 5. Gráfica del modelo lineal generalizado mixto para la supervivencia de los plantines de *Laelia autumnalis* en medio de cultivo MS adicionado con agua de coco (MS+AC) y en MS adicionado con homogeneizado de plátano (MS+HP) durante la primera etapa experimental en los cuatro tratamientos de temperatura (23 °C, 25 °C, 27 °C y 29 °C).

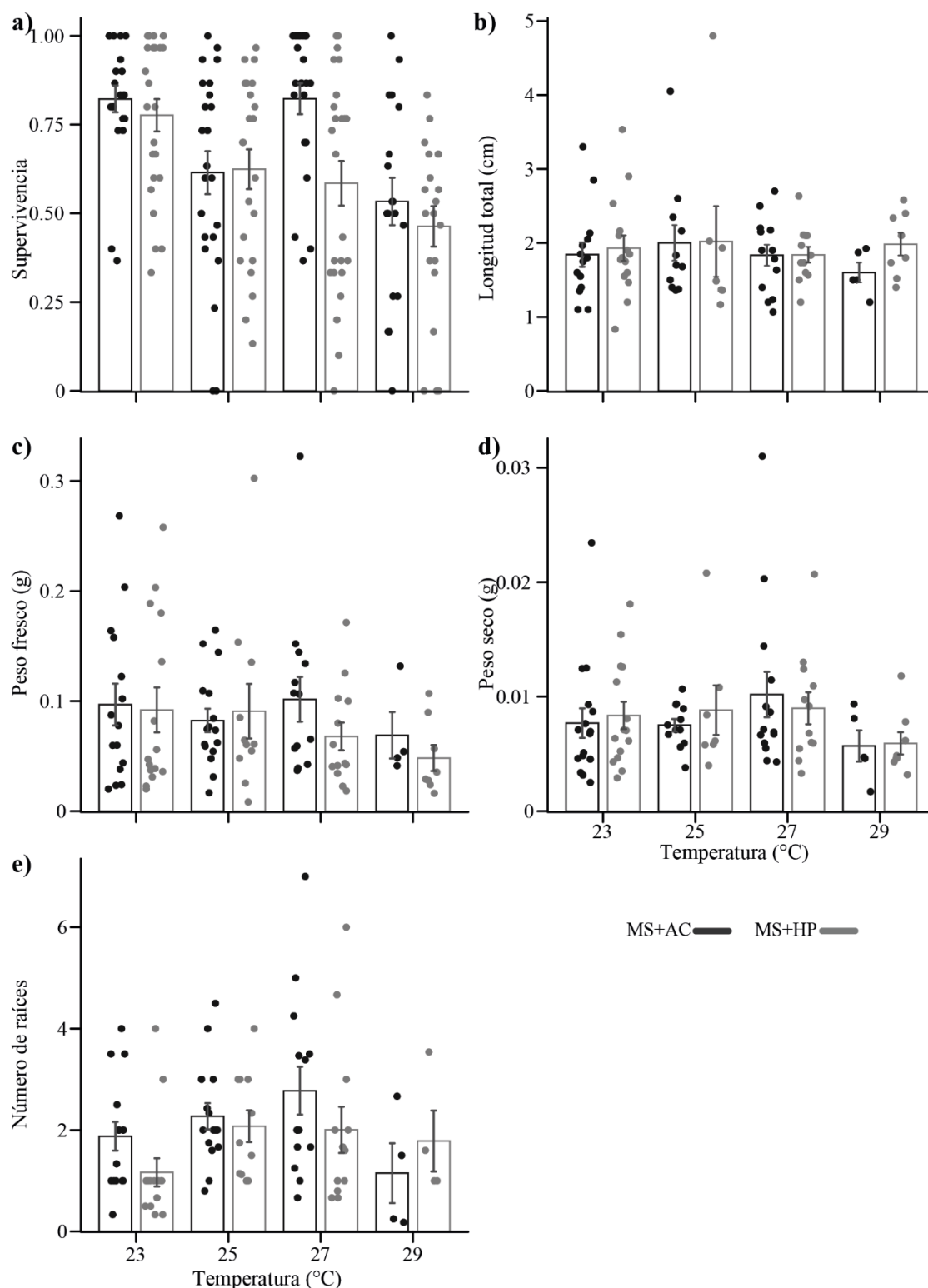


Figura 6. Diagrama de barras donde se indica el promedio ($\pm$ el error estándar) de: a) supervivencia, b) longitud total del plantín, c) peso fresco, d) peso seco y e) número de raíces de los plantines de *Laelia autumnalis* durante la primera etapa experimental en los tratamientos de medio de cultivo MS adicionado con agua de coco (MS+AC) y adicionado con homogeneizado de plátano (MS+HP), y de temperatura (23 °C, 25 °C, 27 °C y 29 °C).

(b) **Longitud total:** debido a que los intervalos de confianza del efecto aleatorio fueron igual a cero (IC inferior = 0; IC superior = 0.24) en los LMM, por lo que se realizaron LM descartando el efecto aleatorio. El nulo fue el mejor, con el menor valor de AIC (Tabla 2). Por lo tanto, no se detectó efecto alguno del medio de cultivo, ni de la temperatura, sobre la longitud total de los plantines de *Laelia autumnalis*. Así mismo, el posible efecto de la cápsula de procedencia no difirió del azar (Figura 6b).

Tabla 2. Valores de AIC y Δ AIC para los modelos lineales realizados para las variables: longitud total, peso seco y peso fresco de los plantines de *Laelia autumnalis* en la primera etapa experimental. En negritas se indica el mejor modelo y en cursivas se indica aquellos modelos que no difieren del mejor modelo por estar dentro de las dos unidades de Δ AIC.

Modelo	g.l.	Variable					
		Longitud total		Peso fresco		Peso seco	
		AIC	Δ AIC	AIC	Δ AIC	AIC	Δ AIC
Nulo (1)	2	40.48	0.00	217.79	<i>1.01</i>	140.06	0.00
Temperatura	3	42.48	<i>2.00</i>	218.35	<i>1.57</i>	141.77	<i>1.71</i>
Medio de cultivo	3	42.16	<i>1.68</i>	216.78	0.00	142.05	<i>1.99</i>
Temperatura + Medio de cultivo	4	44.15	3.67	217.60	<i>0.82</i>	143.75	3.69
Temperatura $\times$ Medio de cultivo	5	45.75	5.27	218.46	<i>1.68</i>	145.34	5.28

(c) **Peso fresco:** debido a que los intervalos de confianza del efecto aleatorio de esta variable fueron igual a cero (IC inferior = 0; IC superior = 0.55), se realizaron LM descartando el efecto aleatorio. Así, el mejor LM para el peso fresco fue el que contiene únicamente al medio de cultivo con una $r^2 = 0.02$ (Tabla 2). Los plantines que crecieron en el medio de cultivo adicionado con agua de coco tuvieron un crecimiento mayor que el medio con homogeneizado de plátano (Figura 7).

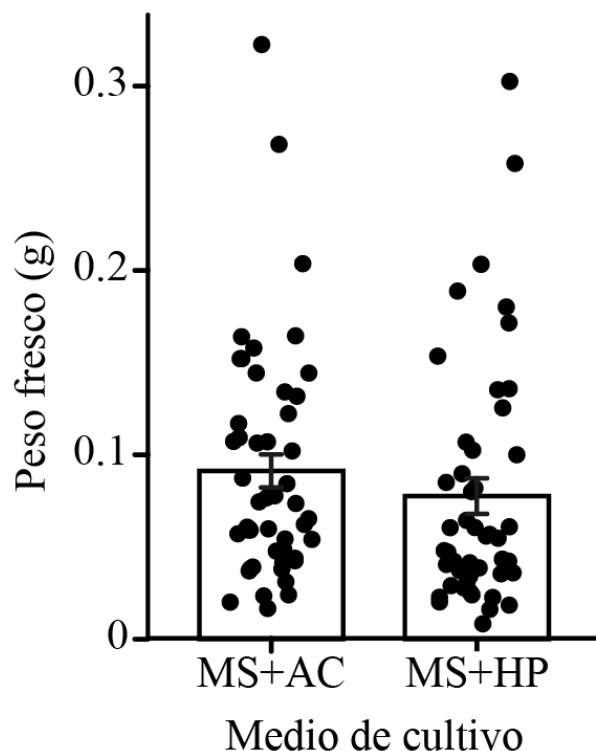


Figura 7. Diagrama de barras donde se indica el promedio ($\pm$ el error estándar) del peso fresco de los plantines de *Laelia autumnalis* que crecieron en medio MS adicionado con agua de coco (MS+AC) y adicionado con homogeneizado de plátano (MS+HP), durante la primera etapa experimental.

(d) **Peso seco:** los LMM para esta variable tampoco tuvieron intervalos de confianza significativos en el efecto aleatorio (IC inferior = 0; IC superior = 0.25), por lo que se realizaron LM; el modelo nulo fue el mejor (Tabla 2). Por lo tanto, se descarta un posible efecto tanto del medio de cultivo como de la temperatura en el peso seco, y así mismo el posible efecto de la cápsula (Figura 6d).

(e) **Número de raíces:** al realizarse GLMM, se encontró que los intervalos de confianza del efecto aleatorio eran igual a cero (IC inferior=0; IC superior= 0.35), por lo cual, se realizaron GLM descartando dicho efecto. De tal forma que, el mejor GLM, con menor valor de AIC, fue *Número de raíces* $\sim$ *medio de cultivo* con $r^2 = 0.02$ y pendiente = -0.27 (Tabla 3). En promedio se obtuvieron 2.20 raíces por planta en medio de cultivo adicionado con agua de coco, mientras que el adicionado con homogeneizado de plátano fue de 1.72 (Figura 6e).

Tabla 3. Valores de AIC y Δ AIC de los modelos lineales generalizados realizados para el número de raíces de los plantines de *Laelia autumnalis* en la primera etapa experimental. En negritas se indica el mejor modelo y en cursivas se indica aquellos modelos que no difieren del mejor modelo por estar dentro de las dos unidades de Δ AIC.

Modelo	<i>g.l.</i>	AIC	Δ AIC
Nulo (1)	2	200.86	1.23
Temperatura	3	202.08	2.45
Medio de cultivo	3	199.63	0.00
Temperatura + Medio de cultivo	4	200.78	1.15
Temperatura $\times$ Medio de cultivo	5	199.73	0.10

Segunda etapa experimental

(a) **Supervivencia:** el GLMM *Supervivencia* $\sim$ *temperatura* $\times$ *medio de cultivo* + (1|cápsula) fue el mejor modelo que explicó la probabilidad de supervivencia (Tabla 4), dado que tuvo el menor valor de AIC y los intervalos de confianza del efecto aleatorio no fueron igual a cero (IC inferior = 0.14; IC superior = 0.74). En este modelo se encontró que la supervivencia de los plantines cambia según la temperatura y el medio de cultivo, y la interacción entre éstos (Figura 8a). Para los plantines que se desarrollaron en medio MS+AC la supervivencia aumentó conforme la temperatura; es decir, a 27 °C hubo más sobrevivientes que a 23 °C. En contraste, los plantines cultivados en medio MS+HP tuvieron un comportamiento inverso; hubo una mayor supervivencia en las temperaturas más frescas (Figura 9a).

Tabla 4. Valores de AIC para los modelos lineales generalizados de probabilidad de supervivencia de los plantines de *Laelia autumnalis* para la segunda etapa experimental.

Modelo	<i>g.l.</i>	AIC	Δ AIC
Nulo (1 + (1 cápsula))	2	1430.95	18.41
Temperatura + (1 cápsula)	3	1432.73	20.19
Medio de cultivo + (1 cápsula)	3	1423.33	10.79
Temperatura + Medio de cultivo + (1 cápsula)	4	1424.48	11.94
Temperatura $\times$ Medio de cultivo + (1 cápsula)	5	1412.54	0.00

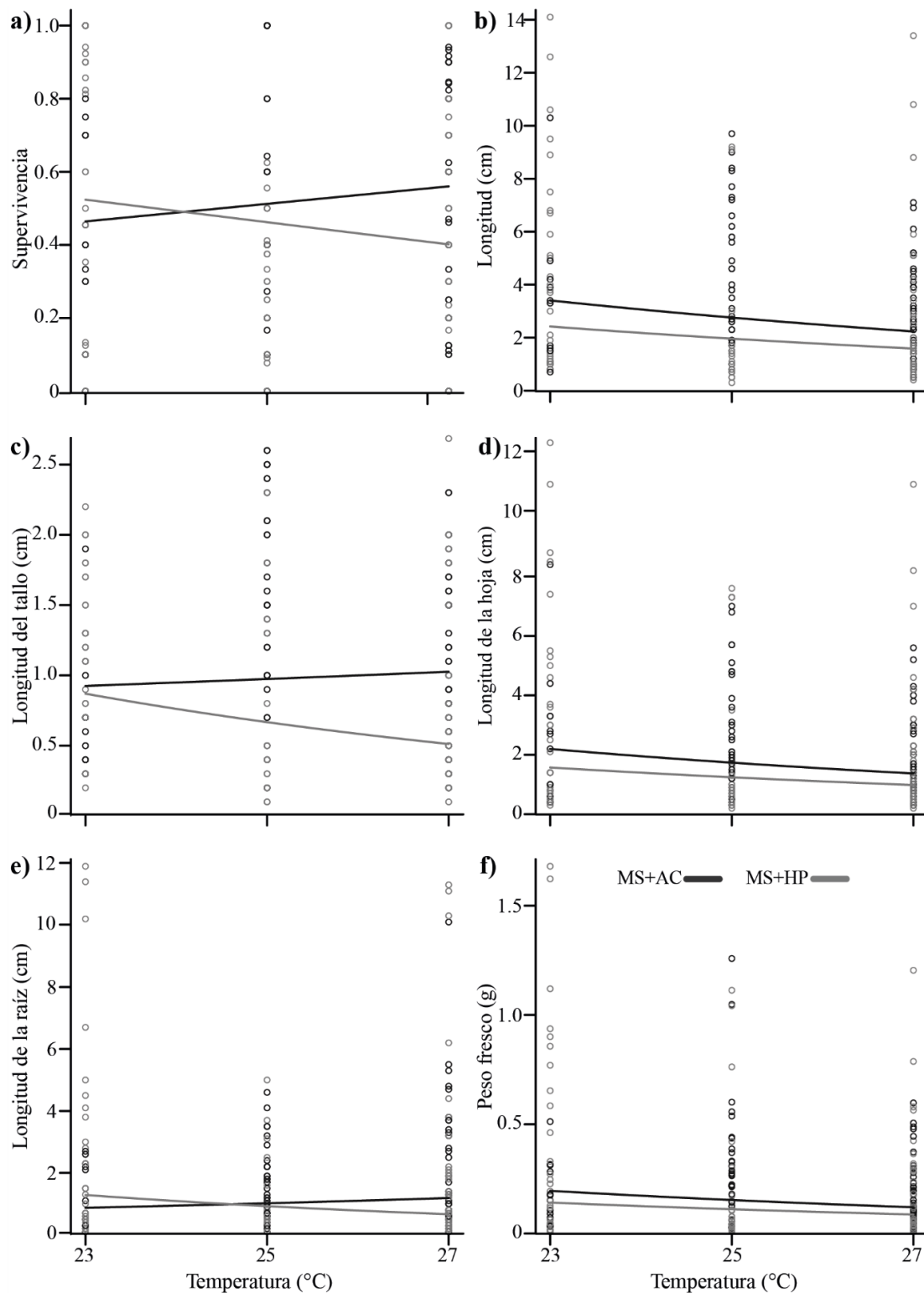


Figura 8. Modelos generados para: a) supervivencia (GLMM), b) longitud total del plantín (LM), c) longitud del tallo (LM), d) longitud de la hoja más larga (LM), e) longitud de la raíz más larga (LM), y f) peso fresco (LM) de los plantines de *Laelia autumnalis* durante la segunda etapa experimental en los tratamientos de temperatura (23 °C, 25 °C y 27°C) y medio de cultivo adicionado con agua de coco (MS+AC) y adicionado con homogeneizado de plátano (MS+HP).

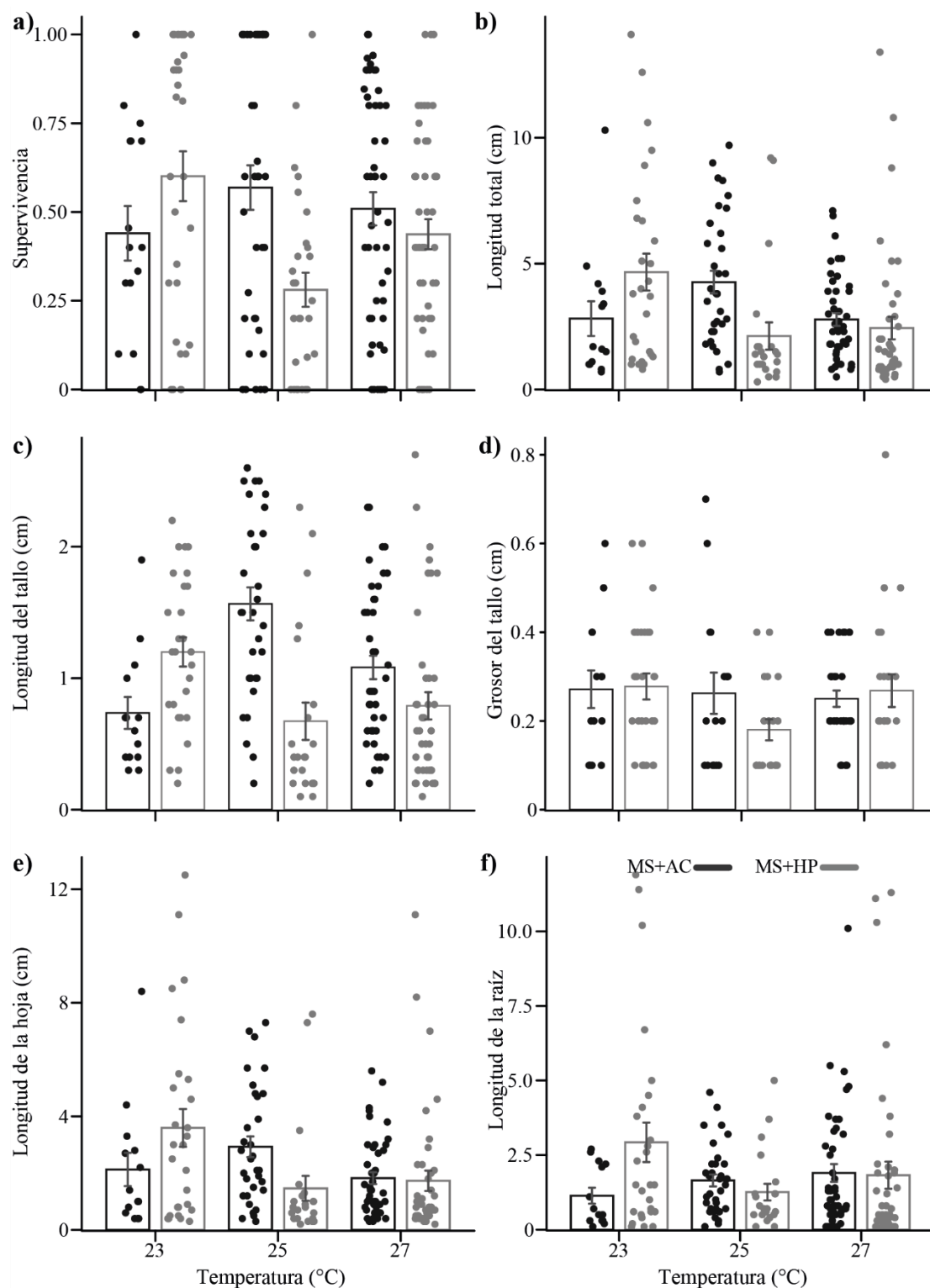


Figura 9. Diagrama de barras donde se indica el promedio ($\pm$ el error estándar) de: a) supervivencia, b) longitud total del plantín, c) longitud del tallo, d) grosor del tallo, e) longitud de la hoja más larga, f) longitud de la raíz más larga, g) peso fresco y h) peso seco de los plantines de *Laelia autumnalis* durante la segunda etapa experimental en los tratamientos de temperatura (23 °C, 25 °C y 27 °C) y medio de cultivo MS adicionado con agua de coco (MS+AC) y adicionado con homogeneizado de plátano (MS+HP).

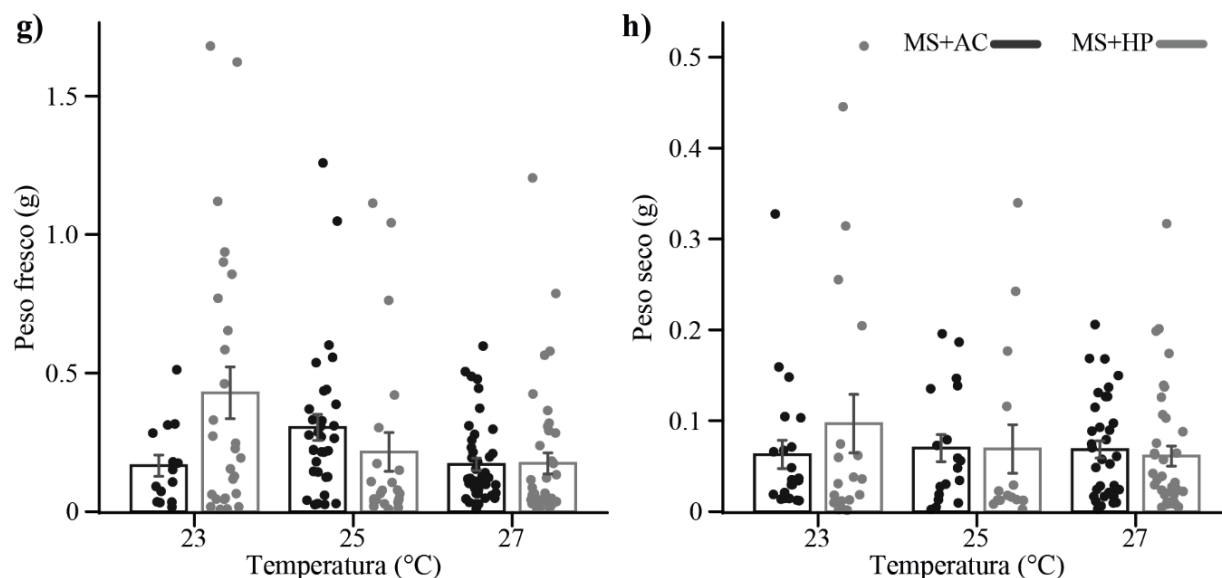


Figura 9 (continuación). Diagrama de barras donde se indica el promedio ($\pm$ el error estándar) de: a) supervivencia, b) longitud total del plantín, c) longitud del tallo, d) grosor del tallo, e) longitud de la hoja más larga, (f) longitud de la raíz más larga, g) peso fresco y h) peso seco de los plantines de *Laelia autumnalis* durante la segunda etapa experimental en los tratamientos de temperatura (23 °C, 25 °C y 27 °C) y medio de cultivo MS adicionado con agua de coco (MS+AC) y adicionado con homogeneizado de plátano (MS+HP).

(b) **Longitud total:** debido a que los intervalos de confianza del efecto aleatorio en los LMM fueron igual a cero (IC inferior = 0; IC superior = 0.32), se procedió a realizar LM descartando el efecto aleatorio. El mejor LM fue *Longitud total* $\sim$ *temperatura* $\times$ *medio de cultivo* ($r^2 = 0.51$) (Tabla 5). Se encontró que existe una interacción entre el medio de cultivo y la temperatura. Esto indica que, en un mismo medio de cultivo, la longitud total de los plantines varía dependiendo de la temperatura (Figura 8b). Por ejemplo, los plantines en medio con homogeneizado de plátano a temperatura de 25 °C fueron los que menos se desarrollaron de todos, pero también se encontró que en ese mismo medio se lograron los plantines más grandes, cuando la temperatura fue menor (23 °C). La tendencia de la longitud total de los plantines, tanto en medio MS adicionado con agua de coco (MS+AC) como en el MS adicionado con homogeneizado de plátano (MS+HP), es que se ven afectados por el incremento de la temperatura; los plantines más grandes se encontraban a 23 °C y los más chicos a 29 °C (Figura 9b).

Tabla 5. Valores de AIC y Δ AIC para los modelos lineales realizados para las variables: longitud total, peso seco y peso fresco de los plantines de *Laelia autumnalis* en la primera etapa experimental. En negritas se indica el mejor modelo y en cursivas se indica aquellos modelos que no difieren del mejor modelo por estar dentro de las dos unidades de Δ AIC.

Modelo	g.l.	Variable													
		Longitud total		Longitud del tallo		Grosor del tallo		Longitud de la hoja		Longitud de la raíz		Peso fresco		Peso seco	
		AIC	Δ AIC	AIC	Δ AIC	AIC	Δ AIC	AIC	Δ AIC	AIC	Δ AIC	AIC	Δ AIC	AIC	Δ AIC
Nulo (1)	2	459.86	11.35	430.72	16.64	229.53	0.00	511.33	6.65	583.69	0.99	585.09	3.22	498.65	0.38
Temperatura	3	456.02	7.51	430.89	16.81	231.52	1.99	507.97	3.29	584.74	2.04	583.16	1.29	500.15	1.88
Medio de cultivo	3	455.44	6.93	418.47	4.39	230.84	1.31	509.37	4.69	584.49	1.79	584.64	2.77	498.27	0.00
Temperatura + Medio de cultivo	4	449.81	1.30	417.05	2.97	232.78	3.25	504.68	0.00	585.27	2.57	581.87	0.00	499.69	1.42
Temperatura × Medio de cultivo	5	448.51	0.00	414.08	0.00	234.62	5.09	505.26	0.58	582.70	0.00	582.52	0.65	501.57	3.30

(c) **Longitud del tallo:** el mejor LMM fue *Longitud tallo ~ temperatura + medio de cultivo + (1|cápsula)* y, al igual que en la longitud total, los intervalos de confianza del efecto aleatorio fueron igual a cero, por lo que se procedió a realizar LM descartando el efecto aleatorio. El mejor de éstos fue *Longitud tallo ~ temperatura × medio de cultivo* ($r^2 = 0.16$, Tabla 6). Se volvió a encontrar que existe una interacción entre el medio de cultivo y la temperatura, aunque de forma distinta a la que se obtuvo para longitud total (Figura 9c). El mayor desarrollo fue a los 25 °C en medio con agua de coco, mientras que el menor desarrollo se encontró en el medio MS adicionado con homogeneizado de plátano a esa misma temperatura (Figura 8c). Para las temperaturas de 25 °C y 27 °C el mejor medio fue el adicionado con agua de coco, pero para la temperatura de 23 °C se obtuvo un mayor crecimiento en el medio con homogeneizado de plátano.

(d) **Grosor del tallo:** en los LMM, los intervalos de confianza del efecto aleatorio fueron igual a cero (IC inferior = 0; IC superior = 0.15) y, como el mejor LM fue el modelo nulo, se consideró que no se pudo detectar un efecto de los factores estudiados en esta variable (Figura 9d).

(e) **Longitud de la hoja:** para esta variable tampoco se detectó un efecto de la temperatura, ni del medio de cultivo sobre los plantines. Esto debido a que el modelo nulo de los LMM realizados fue el mejor y, como los intervalos de confianza del efecto aleatorio fueron igual a cero (IC inferior = 0; IC superior = 0.32), se procedió a realizar un LM en donde *Longitud hoja ~ temperatura + medio de cultivo* fue el mejor. El tamaño de las hojas de los plantines se vio influenciado tanto por la temperatura como por el medio de cultivo (Figura 8d), obteniendo las hojas más grandes a los 23 °C en medio MS adicionado con homogeneizado de plátano; en este mismo medio, se obtuvieron las hojas más pequeñas en las restantes temperaturas 25 °C y 27 °C (Figura 9e).

(f) **Longitud de la raíz:** dado que, de los LMM realizados, el nulo fue el mejor pero los intervalos de confianza del efecto aleatorio fueron igual a cero (IC inferior = 0; IC superior = 0.42), por lo que se procedió a realizar LM descartando el efecto aleatorio. El LM *Longitud raíz ~ temperatura × medio de cultivo* fue el que tuvo el menor valor de AIC, aunque en realidad es muy poco informativo (Tabla 5), y de hecho este modelo no es sustancialmente distinto del modelo nulo. De tal forma que la longitud de la raíz no se ve afectada ni por el medio de cultivo, ni por la temperatura. No obstante, es notorio que a los 23 °C los plantines presentaron las raíces más largas en el medio con homogeneizado de plátano (Figura 8e). En contraste, a esa misma temperatura se

encontraron los plantines con las raíces más pequeñas al cultivarse en agua de coco (Figura 9f). No obstante, el tamaño promedio de las raíces de los plantines con agua de coco a 23 °C no parecen diferir de los cultivados en medio con homogeneizado de plátano a 25 °C.

(g) **Peso fresco:** de los LMM realizados, el modelo nulo fue el que tuvo menor valor de AIC para la variable de peso fresco y los intervalos de confianza del efecto aleatorio fueron iguales a cero (IC inferior = 0; IC superior = 0.31), por lo que se realizaron LM descartando el efecto aleatorio. Consecuentemente, el mejor LM fue *Peso fresco ~ temperatura + medio de cultivo* con $r^2 = 0.03$ (Tabla 5), con tendencia a disminuir el peso mientras la temperatura es alta si se encuentran en medio MS adicionado con homogeneizado de plátano (Figura 8f).

(h) **Peso seco:** el modelo nulo (*Peso seco ~ 1 + (1|cápsula)*) fue el que tuvo menor valor de AIC para el peso seco, y los intervalos de confianza del efecto aleatorio fueron igual a cero (IC inferior = 0; IC superior = 0.65), por lo que se realizaron LM descartando el efecto aleatorio. El mejor LM fue *Peso seco ~ Medio de cultivo*, pero en realidad este modelo no difiere del modelo nulo (Tabla 5).

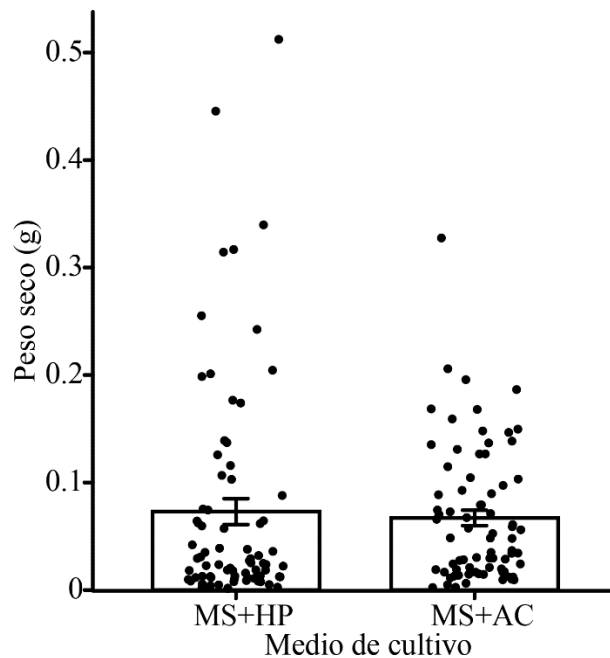


Figura 10. Diagrama de barras donde se indica el promedio ($\pm$ el error estándar) del peso seco de los plantines de *Laelia autumnalis* que crecieron en medio MS adicionado con homogeneizado de plátano (MS+HP) y en medio MS adicionado con agua de coco (MS+AC), durante la segunda etapa experimental.

DISCUSIÓN

Efecto de la temperatura

Los estudios acerca del impacto de la temperatura en el cultivo *in vitro* de orquídeas se han centrado en su influencia sobre la germinación y no tanto en el desarrollo de los plantines (Jolman *et al.*, 2022). Dado que se ha encontrado que la temperatura puede afectar la tasa de germinación a lo largo del tiempo (Parlak, 2022), resulta lógico suponer que su efecto también varíe con respecto al crecimiento de los plantines en comparación con la germinación en condiciones naturales. Por esta razón, no es sencillo usar la literatura en relación al efecto de la temperatura en la germinación de semillas con el propósito de predecir el efecto de ésta en el crecimiento *in vitro* de los plantines, y aún más su influencia en el desarrollo de las plantas *ex vitro*. En particular, se complica prever cómo la temperatura afectará el comportamiento de los plantines en su hábitat natural. Gran parte de los trabajos que exploran la relación del efecto de la temperatura y el cultivo *in vitro* han sido realizados a una temperatura constante (Lavrentyeva y Ivannikov, 2007; Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012; Castillo-Pérez *et al.*, 2019). Se ha argumentado que la isoterminia podría no ser tan relevante en orquídeas de climas tropicales respecto a las de regiones extra tropicales (templadas), donde las variaciones estacionales en este factor ambiental tienen un papel destacado (Jolman *et al.*, 2022). No obstante, en orquídeas de alta montaña como *Laelia autumnalis*, las fluctuaciones diarias de temperatura pueden resultar cruciales para su desarrollo. Dadas las limitaciones metodológicas, no se pudo abordar la variabilidad diaria de temperatura en este estudio, lo cual restringe de manera significativa las posibles inferencias del impacto de esta variable en el desarrollo de los plantines en su hábitat natural, más aún si se considera que tampoco se ha tomado en cuenta su interacción con hongos micorrícicos y otros organismos.

A pesar de las limitaciones de emplear una temperatura constante para esta orquídea, el presente trabajo logró evaluar el efecto de varias temperaturas contrastantes en el desarrollo de los plantines. Se evidenció que una temperatura elevada (29 °C) resultó ser perjudicial para la supervivencia de los plantines, lo que llevó a eliminar este tratamiento en la segunda etapa experimental. Gudiño *et al.* (2015) demostraron que individuos maduros de una población silvestre de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. tuvieron una mayor tolerancia a las altas temperaturas en comparación con individuos *in vitro* de un año de edad aclimatados en invernadero. Es probable que la baja supervivencia de los plantines de *L. autumnalis* a 29 °C se deba a su temprano desarrollo, dado que tenían alrededor de 6 meses de edad.

Cabe señalar que las temperaturas elevadas en condiciones naturales pueden tener un efecto más fuerte sobre la supervivencia de los plantines ya que la humedad ambiental *in vitro* es considerablemente mayor que la presente en el hábitat natural de esta especie. En la primera etapa experimental de este estudio se observó que la temperatura más baja (23 °C) se produjo la mayor supervivencia, independientemente del medio de cultivo utilizado. Esto sugiere que esta temperatura podría ser óptima para la supervivencia de los plantines de *L. autumnalis* en las primeras etapas de su desarrollo. Es importante tener en cuenta que cada etapa del ciclo de vida de una especie, tiene una temperatura mínima en la que no crecerá, una temperatura óptima en la que crecerá a máxima velocidad y una temperatura máxima en la que no crecerá e inclusive podría morir (Salisbury y Ross, 2000).

En la segunda etapa experimental, se encontró que la supervivencia aumentó ligeramente con el aumento de la temperatura cuando se utilizó agua de coco, y el caso opuesto para los plantines cultivados en homogeneizado de plátano. Este punto es importante porque en la mayoría de los estudios de cultivo *in vitro* de orquídeas se usa una temperatura alrededor de los 25 °C, sin considerar los requerimientos térmicos de la especie, ni del medio de cultivo.

Una fuerte limitación metodológica de este estudio es que no se pudo tener réplicas verdaderas del efecto de la temperatura. Esto se debió a que sólo se contaba con una cámara de ambientes controlados para cada temperatura (4 en total). Estas cámaras de ambientes controlados no eran del mismo modelo, por lo que posiblemente existieron algunas variaciones adicionales al efecto de la temperatura, como la calidad de luz, aunque todos tenían el mismo fotoperiodo. Las incubadoras de los tratamientos de temperatura tenían diferentes longitudes de onda de la luz. Para el caso de la incubadora de 23 °C, las lámparas eran de LEDs blancos, mientras que las demás incubadoras (25 °C, 27 °C y 29 °C) tenían lámparas fluorescentes blancas, por lo que podría haber afectado los resultados debido al espectro de iluminación emitido por las lámparas, ya que una buena calidad e intensidad de luz permiten que el proceso de fotosíntesis se acelere (Casierra-Posada *et al.*, 2011). Murillo-Talavera *et al.* (2016) reportaron que la luz de lámparas LED blancas en plántulas de *L. autumnalis* permitieron un desarrollo más favorable que en las lámparas blancas fluorescentes, ya que tienen más contenido de pigmentos fotosintéticos, además de promover el enraizamiento. Las temperaturas de las cámaras de germinación estaban predeterminadas por experimentos simultáneos, de tal forma que para nosotros el uso de cada cámara no fue sesgada hacia algún sentido. Aunado a ello, tres de las cuatro cámaras tenían el mismo tipo de luz (lámparas

fluorescentes) y aún entre ellas se pudo observar el efecto de la temperatura. En menor medida, se puede argumentar que el uso de medios de cultivo ricos en azúcares quizá podría atenuar un poco el efecto de las variaciones en las calidades lumínicas, permitiendo que el efecto de la temperatura pueda considerarse como el más importante entre cámaras de germinación. En ese sentido lo ideal sería contar con muchas cámaras del mismo modelo, pero eso es difícil de tener. Una posibilidad para evitar el efecto de la cámara es mover los tratamientos periódicamente entre las distintas cámaras, ajustando cada vez a la temperatura experimental de los plantines.

Efecto del medio de cultivo

Debido a que el uso de los suplementos orgánicos puede estimular el desarrollo diferencial de las partes vegetativas de las plantas, es posible que los resultados contrastantes en las respuestas de los plantines ante el efecto de la temperatura sean deban a este fenómeno. En la literatura se ha reportado que diferentes concentraciones de homogeneizado de plátano pueden generar diferencias en la producción de raíces (Vyas *et al.*, 2009; Utami y Hariyanto, 2020). Si bien en la naturaleza se podría esperar que, ante el estrés hídrico provocado por las altas temperaturas, las plantas con un sistema radical más robusto sobrevivieran más. Sin embargo, en condiciones *in vitro* esto pudiera no ser tan cierto ya que la humedad es constantemente alta debido a que el sustrato es básicamente agua gelificada y el intercambio gaseoso con el exterior es muy bajo. Por ello, aunque el homogeneizado de plátano pudiera estimular el crecimiento radical, esto no generó mayor supervivencia en las temperaturas altas. Cabe señalar, que en un estudio se encontró que altas concentraciones de homogeneizado de plátano, generaban menor crecimiento vegetativo que cuando se adicionaban menores concentraciones (Vyas *et al.*, 2009). Es probable que la concentración de homogeneizado de plátano empleado en este trabajo, junto con el uso de extracto de levadura pudieran haber generado un efecto negativo sobre los plantines, y magnificarse por el efecto de la temperatura.

Se puede observar que los plantines de *Laelia autumnalis* que se cultivaron a 23 °C en la segunda etapa tuvieron un mejor desempeño cuando se utilizó el medio con homogeneizado de plátano (Figura 9). No obstante, a 25 °C el desempeño fue prácticamente inverso, es decir el desarrollo de los plantines fue mejor en el medio con agua de coco (Figura 9). La interpretación de los resultados se complica porque se puede observar un repunte en el crecimiento para los plantines cultivados en homogenizado de plátano a 27 °C (Figura 9). Así mismo, se podría

recomendar el agua de coco cuando se cultivan los plantines a temperatura intermedia (25 °C) (Figura 9). En general, el crecimiento de los plantines es menor conforme se aumenta la temperatura (Figura 9). Este decremento en el crecimiento es más marcado para los plantines cultivados con homogenizado de plátano. En este sentido, se puede recomendar el uso de homogenizado de plátano para los plantines con un desarrollo avanzado y no para la germinación de semillas. Sólo cuando se tienen bajas temperaturas, y en caso de que no se tenga un control sobre la temperatura lo más recomendable es utilizar agua de coco (Wu *et al.*, 2014). Esto debido a que el crecimiento de las plantas no se ve tan afectado por las temperaturas altas con medio de cultivo con agua de coco, incluso en algunas variables les favorece; por ejemplo, en la supervivencia y en la longitud del tallo.

Los plantines con tallos más largos (segunda etapa experimental) fueron los que estaban en medio MS adicionado con agua de coco (MS+AC); este resultado es coincidente con lo encontrado por Giap *et al.* (2018), quienes encontraron que el agua de coco incrementó linealmente la talla en *Anoectochilus formosanus* Lindl. El agua de coco es un buen compuesto orgánico impulsor de procesos de crecimiento ya que contiene 94% de agua, aminoácidos, compuestos nitrogenados, inorgánicos, ácidos orgánicos, fuentes de carbono, vitaminas y fitohormonas como citocininas y auxinas (Yong *et al.*, 2009; George *et al.*, 2008).

A pesar de las variaciones en las variables de respuesta del crecimiento, cuando se analizó el peso seco no se encontraron diferencias importantes entre los tratamientos. Esto significa que, aunque hay diferencias en la talla, la biomasa es la misma, de tal forma que las variaciones estarían dadas por el contenido de agua en los tejidos. Estas distintas conformaciones en los plantines pueden tener ventajas y desventajas. Por un lado, plantas más compactas podrían ser más resistentes a la desecación al momento de sacarlas de los frascos. Pero plantas con mayores dimensiones, podrían tener mayor superficie fotosintética y ser más tolerantes a la herbivoría (Mello *et al.*, 2020).

Efecto de cápsula

Un hallazgo inesperado de este estudio fue el descubrimiento del efecto importante de la cápsula de procedencia de las semillas en la supervivencia de los plantines en ambas etapas experimentales. Este efecto de cápsula no parece estar relacionado con variaciones en el proceso de desinfección de las semillas ni con alguna otra cuestión metodológica, dado que se siguió el mismo protocolo y

las cápsulas se cosecharon al mismo tiempo. Aunado a ello, se trabajó con un número uniforme de plantines, de tal manera que las posibles diferencias en número de semillas germinadas no afectaran al experimento. Por lo tanto, se interpreta este efecto de la cápsula como posibles diferencias en la composición genética de los plantines. Se trató de usar a los mismos padres, para evitar tener mucha variación en ese sentido, y aun así se encontró que la fuente de procedencia de los propágulos es una variable muy importante para ser considerada en futuros experimentos.

En este sentido, se recomendaría que en futuros experimentos se utilicen varias cápsulas para obtener una representación más completa de la especie. Además, si se tiene el origen exacto de la crusa de la cápsula, se recomienda mantener su identidad a lo largo del estudio. En caso de que no se conozca el origen de la crusa (por ejemplo, de cápsulas de polinización natural), o que existan limitaciones metodológicas, se podría considerar mezclar semillas de distintas cápsulas para tener un mejor estimado de cómo se podría comportar un individuo promedio de la especie estudiada.

CONCLUSIONES

Al cultivar plantines de *Laelia autumnalis* de forma *in vitro*, tanto la temperatura como el medio de cultivo son factores importantes a considerar, al igual que la cápsula de procedencia de las semillas, debido a su impacto significativo en la supervivencia y el crecimiento. Estos resultados pueden ser valiosos para la propagación de plantas, particularmente para la adecuada selección de condiciones de crecimiento.

Los plantines de *L. autumnalis* respondieron de formas muy variadas, ya que tanto el medio de cultivo adicionado con agua de coco, como el homogeneizado de plátano generaron resultados distintos en los plantines, influenciados además por la temperatura.

Los resultados obtenidos no se comportaron completamente con la hipótesis planteada. No hubo un claro efecto del homogeneizado de plátano en la formación y crecimiento de las raíces de los plantines de *L. autumnalis* en comparación con el medio adicionado con agua de coco. En cuanto al efecto de la temperatura, la hipótesis se cumplió para la primera experimental, donde se registró una mayor mortalidad de plantines a temperaturas más altas. Sin embargo, debido a la alta mortalidad de plantines observada, se decidió suspender ese tratamiento para la siguiente etapa. No obstante, no se detectó un decremento en el crecimiento o un aumento en la mortalidad conforme aumentaba la temperatura en la segunda parte experimental.

Se sugiere el uso de agua de coco en lugar del homogeneizado de plátano para obtener plantines de *L. autumnalis* con un mayor desarrollo, particularmente si hay condiciones de temperaturas elevadas.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Crespo F, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Estrada-Soto S (2005) Vasorelaxant effect of Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Pharm Biol*, 43:540–546
- Ahamed NS, Senthil TK, Rao MV (2016) In vitro regeneration by callus culture of *Anoectochilus elatus* Lindley, an endangered terrestrial jewel orchid. *In Vitro Cell Dev Biol*, 52:72–80
- Almanza-Álvarez J, Garibay-Orijel R, Salgado-Garciglia R, Fernández-Pavía SP, Lappe-Oliveras P, Arellano-Torres E, Ávila-Díaz I (2017) Identification and control of pathogenic fungi in neotropical valued orchids (*Laelia* spp.). *Trop Plant Pathol*, 42:339–351
- Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 122:299–308
- Anjum S, Abbasi BH, Doussot J, Favre-Réguillon A, y Hano C (2017) Effects of photoperiod regimes and ultraviolet-C radiations on biosynthesis of industrially important lignans and neolignans in cell cultures of *Linum usitatissimum* L. (Flax). *J. Photochem Photobiol B: Biol*, 167:216–227
- Arditti J, Ernst R, (1993) Micropropagation of Orchids. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, pp 37–38, 55–57
- Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchids seeds. *Bot Rev*, 33:1–97
- Ávila-Díaz I, Oyama K, Gómez-Alonso C, Salgado-Garciglia R (2009) *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 99:335–343
- Balme J (1946) *Laelias mexicanas*. *Bot Sci*, 4:2–9
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw*, 67:1–48
- Benzing DH (1990) Epiphytism: a preliminary overview. En: *Vascular epiphytes: General biology and related biota*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–43
- Blanchard MG, Runkle ES (2008) Temperature and pseudobulb size influence flowering of *Odontioda* orchids. *HortScience*, 43:1404–1409
- Casierra-Posada F, Peña-Olmos JE, Ulrichs C (2011) Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Rev UDCA Act & Div Cient*, 14:43–53

- Castillo-Pérez LJ, Maldonado-Miranda JJ, Alonso-Castro Ángel J, Carranza-Álvarez C (2019) Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación in vitro de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). *Biotecnia*, 22:32–38
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, Van den Berg C, Schuiteman A (2015) An updated classification of Orchidaceae. *Bot J Linn Soc*, 177:151–174
- Cleland EE, Chuine I, Menzel A, Mooney HA, Schwartz MD (2007) Shifting plant phenology in response to global change. *Trends Ecol Evol*, 22:357–365
- De la Rosa EM, Andrade JL, Torres JA (2018) Las orquídeas epífitas: ¿cómo viven y sobreviven sobre los árboles? *Biodiversitas*, 138:2–6
- Dearnaley J, Perotto S, Selosse MA (2016) Structure and development of orchid mycorrhizas. En: Martin F (ed) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. John Wiley & Sons, Hoboken, pp 63–86
- Decruse SW, Gangaprasad A, Seeni S, Menon VS (2003) Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 72:199–202
- Dias MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira IC (2016) Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Ind Crop Prod*, 82:9–22
- Driesen E, Van den Ende W, De Proft M, Saeys W (2020) Influence of environmental factors light, CO₂, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review. *Agronomy*, 10:1975–2002
- Duran-Vila N, Gogorcena Y, Ortega V, Ortiz J, Navarro L (1992) Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.): effect of temperature and photosynthetic radiation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 29:11–18
- Estrella N, Menzel A (2006) Responses of leaf colouring in four deciduous tree species to climate and weather in Germany. *Climate Res*, 32:253–267
- Fahad S, Hussain S, Saud S, Khan F, Hassan S, Amanullah, Nasim W, Arif M, Wang F, Huang J (2016). Exogenously applied plant growth regulators affect heat-stressed rice pollens. *J Agron Crop Sci*, 202:139–150
- Fay MF (2018) Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Bot Stud*, 59:16–22
- Free A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. *Plant Cell. Tiss Organ Cult*, 74:202–228

- George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008) The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. En: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) Plant propagation by tissue culture. Springer, The Neth, pp 115–173
- Giap DD, Thai TD, Thang DD, Trang NTH, Tuan TT, Xuyen NT, Hieu DD (2018) Effects of several organic extracts on the growth, yield and quality of *Anoectochilus formosanus* biomass. Intl J Agric Technol, 14:171–182
- Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, Clements MA, Arroyo MTK, LeebensMack J, Endara L, Kriebel R, Neubig KM, Whitten WM, Williams NH, Cameron KM (2015) Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. Proc Biol Sci, 282:171–180
- Gonçalves LM, Prizão EC, Milaneze Gutierre MA, Mangolin CA, Machado, MFPS (2012) Use of complex supplements and light-differential effects for micropropagation of *Hadrolaelia purpurata* (= *Laelia purpurata*) and *Encyclia randii* orchids. Acta Sci Agron, 34:459–463
- Gravendeel B, Smithson A, Slik FJ, Schuiteman A (2004) Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? Philos Trans R Soc B, 359:1523–1535
- Gudiño W, Ávila-Díaz I, Oyama K, de la Barrera E (2015) High-temperature tolerance by the endangered Mexican Mayflower orchid, *Laelia speciosa*. Trop Conserv Sci, 8:983–991
- Häder DP, Barnes PW (2019) Comparing the impacts of climate change on the responses and linkages between terrestrial and aquatic ecosystems. Sci Total Environ, 682: 239–246
- Hágsater E, y Arenas M (1998) Orchid Conservation in Mexico. Selbyana, 19: 5–19
- Hágsater E, Soto MA, Salazar GC, Jiménez RM, López MR, Dressler RL (2005) Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, Ciudad de México, pp 304
- Halbinger F, Soto MA (1997) Laelias of Mexico. Orquídeas, Ciudad de México, pp 82–95
- Hatfield JL, Prueger JH (2015) Temperature extremes: Effect on plant growth and development. Weather Clim Extrem, 10:4–10
- Hu G, Dong Y, Zhang Z, Fan X, Ren F, Zhou J (2015) Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. Plant Cell Tiss Organ Cult, 121:435–443
- Hua J (2009) From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants. Curr Opin Plant Biol, 12:568–573
- Hughes KW (1981) In vitro ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. Environ Exp Bot, 21:281–288

- Islam MT, Dembele DP, Keller EJ (2005) Influence of explant, temperature, and different culture vessels on in vitro culture for germplasm maintenance of four mint accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 81:123–130
- Jolman D, Batalla MI, Hungerford A, Norwood P, Tait N, Wallace LE (2022) The challenges of growing orchids from seeds for conservation: An assessment of asymbiotic techniques. *Appl Plant Sci*, 10:e11496
- Johnson T, Kane M (2007) Asymbiotic germination of ornamental Vanda: in vitro germination and development of three hybrids. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 91:251–261
- Kindlmann P, Kull T, McCormick M (2023) The Distribution and Diversity of Orchids. *Diversity*, 15:810
- Körner C, Hiltbrunner E (2018) The 90 ways to describe plant temperature. *Perspect Plant Ecol Evol Syst*, 30:16–21
- Kubota S, Yamamoto J, Takazawa Y, Sakasai H, Watanabe K, Yoneda K, Matsui N (2005) Effects of light intensity and temperature on growth, flowering, and single-leaf CO₂ assimilation in *Odontioda* orchid. *J Jpn Soc Hort Sci*, 74:330–336
- Lavrentyeva AM, Ivannikov RV (2007) In vitro propagation of *Cattleya* Lindl. and *Laelia* Lindl. species. *Lankesteriana Int J Orchidol*, 7:147–149
- Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (2018) An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. En: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant cell culture protocols*. Springer, Nueva York, pp 3–13
- Mason K, Raven P (2017) Plant form and function. En: Raven P, Johnson G, Mason K, Losos J (eds) *Biology*. Mc Graw-Hill Education, Estados Unidos, pp 732–256
- Mello FN, Estrada-Villegas S, DeFilippis DM, Schnitzer SA (2020) Can functional traits explain plant coexistence? A case study with tropical lianas and trees. *Diversity*, 12:397
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15:473–497
- Murillo-Talavera MM, Pedraza-Santos ME, Gutiérrez-Rangel N, Rodríguez-Mendoza N, Lobit P, Martínez-Palacios A (2016) Calidad de luz led y desarrollo in vitro de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (ORCHIDACEAE). *Agrociencia*, 50:1065–1080
- Nadkarni NM, Solano R (2002) Potential effects of climate change on canopy communities in a tropical cloud forest: an experimental approach. *Oecologia*, 131:580–586

- Neyland MR (1995) The molecular and morphological systematics of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, pp 4–11
- Olaya-Arenas P, Meléndez-Ackerman EJ, Pérez ME, Tremblay R (2011) Demographic response by a small epiphytic orchid. *Am J Bot*, 98:2040–2048
- Parlak, S (2022) Effects of temperature on asymbiotic seed germination of *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P.Delforge. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 22:227–235
- Parmesan C, Hanley ME (2015) Plants and climate change: complexities and surprises. *Ann Bot*, 116:849–864
- Pérez-García, EA, Meave, JA (2004) Heterogeneity of xerophytic vegetation of limestone outcrops in a tropical deciduous forest region in southern México. *Plant Ecol*, 175:147–163
- R Core Team (2022) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Rasmussen HN (1995) Properties of “dust” seeds. En: Rasmussen HN (ed) *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 7–16
- Román-Torres RL, Gutiérrez-Zepeda N, Gutiérrez-Ramos A, Trujillo-Huazo E (2014) El inicio de la recuperación del mucílago de orquídea como material de restauración para textiles a través del estudio del Cristo Salvador del Mundo. Disponible en: Publicaciones digitales ENCRyM <http://www.revistas.inah.gob.mx/index.php/digitales/article/view/4624>
- Salazar GA, Jiménez Machorro R, Ortega Larrocea MaP (2016) Orquídeas (Orchidaceae). En CONABIO/SEDEMA. *La Biodiversidad en la Ciudad de México*. Vol. II. Ciudad de México, pp 169–178
- Salazar SA, Amaya A, Barrientos F (2013) Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Rev Colomb Biotecnol*, 15:97–105
- Salazar SA, Cancino G (2012) Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Rev Colomb Biotecnol*, 14:53–59
- Salazar-Mercado SA (2012) Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agron*, 61:69–78

- Salisbury F, Ross C (2000) Fisiología vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Thomson editores Paraninfo, España, pp 573–574
- Shao SC, Burgess KS, Cruse-Sanders JM, Liu Q, Fan XL, Huang H, Gao JY (2017) Using in situ symbiotic seed germination to restore over-collected medicinal orchids in Southwest China. *Front Plant Sci*, 8:888
- Sherif NA, Kumar TS, Rao MV (2016) In vitro regeneration by callus culture of *Anoectochilus elatus* Lindley, an endangered terrestrial jewel orchid. *In Vitro Cell Dev Biol–Plant*, 52:72–80
- Soto-Arenas M, Gómez RS, Hágsater E (2007) Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana Int J Orchidol*, 7:114–121
- Swarts ND, Dixon KW (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Ann Bot*, 104:543–556
- Timsina B, Rokaya MB, Münzbergová Z, Kindlmann P, Shrestha B, Bhattarai B, Raskoti BB (2016) Diversity, distribution and host-species associations of epiphytic orchids in Nepal. *Biodivers Conserv*, 25:2803–2819
- Utami ESW, Hariyanto S (2020) Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. *Int J Agron*, 2020:1–12
- Valencia-Díaz S, Ventura-Zapata Z, Jiménez-Aparicio A, Flores-Palacios A (2007) Factores ambientales que influyen en la germinación de semillas de orquídeas y bromelias epífitas. *Biótica*, 4:15–26
- Villaseñor JL (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *B Soc Bot Mex* 75:105–135
- Vyas S, Guha S, Bhattacharya M, Rao IU (2009) Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. *Sci Hortic*, 121:32–37
- Wolkovich EM, Cook BI, Allen JM, Crimmins TM, Betancourt JL, Travers SE, Pau S, Regetz J, Davies TJ, Kraft NJB, Ault TR, Bolmgren K, Mazer SJ, McCabe GJ, McGill BJ, Parmesan C, Salamin N, Schwartz MD, Cleland EE (2012) Warming experiments underpredict plant phenological responses to climate change. *Nature*, 485:494–497
- Wright NP (1958) Orquídeas de México. Editorial Fournier. Ciudad de México, pp 24

- Wu K, Zeng S, Lin D, Teixeira da Silva JA, Bu Z, Zhang J, Duan J (2014) In vitro propagation and reintroduction of the endangered *Renanthera imschootiana* Rolfe. PloS one, 9: e110033
- Yong JWH, Ge L, Ng YF, Tan NS (2009) The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Molecules, 14:5144–5164
- Zeng S, Zhang Y, Teixeira JAS, Wu K, Zhang J, Duan J (2014) Seed biology and in vitro seed germination of *Cypripedium*. Crit Rev Biotechnol, 34:358–371
- Zoltán M, Emese V, Vince Ö (2011) Natural substances in tissue culture media of higher plants. Acta Biol Szeged, 55:123–127
- Zotz G (2016) Plants on Plants – The Biology of Vascular Epiphytes. Springer International Publishing, Switzerland, pp 1–12