



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Regeneración *in vitro* de *Encyclia adenocaula*
(La Llave & Lex.) Schltr.
(Orchidaceae)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

GUADALUPE LÓPEZ JIMÉNEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. GUTELE DALIA GOLDHABER PASILLAS
(2009)**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

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

Regeneración *in vitro* de Encyclia adenocaula (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae)

realizado por **López Jiménez Guadalupe** con número de cuenta **3-0117045-7** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Propietario M. en C. Estela Sandoval Zapotitla

Propietario M. en C. Guitele Dalia Goldhaber Pasillas
Tutora

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

Suplente Ing. Agr. María Teresa de Jesús Olivera Flores

FACULTAD DE CIENCIAS

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 13 de octubre de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

nlm.

A Lupita Jiménez Jiménez.

A Edgar López Carrillo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por haberme puesto en el lugar exacto y con la gente exacta.

Gracias mamá por ser increíblemente buena, la mejor que conozco, por ser el sol que me impulso a terminar el camino que elegí, por darte en cada uno de nosotros tus hijos, gracias por que todos los días te esfuerzas por darnos lo mejor de ti, gracias por confiar en mi, eres todo para mi mami.

Gracias papá por ser el pilar más fuerte que conozco, por enseñarme con tu comportamiento el timón de valores para navegar por la vida, gracias por enseñarme a dirigirme en este caminar, gracias por tus esfuerzos, gracias por levantarme cada día para ir a la escuela, gracias por que me das todo lo que está en tus manos para hacerme feliz.

Gracias Tía Rosi por tus consejos a lo largo de la carrera y por el apoyo recibido, gracias por tus exquisitos platillos que me hacen sentir en mi hogar, gracias por ayudar a esta familia a la que perteneces.

Gracias Chabe por ser mi amiga, por quererme, apoyarme y enseñarme que podemos estar juntas siempre.

Gracias Tehu por ser tan cariñoso conmigo, gracias por no defraudarme, gracias por estar para hacerme compañía.

Gracias Gale por ser mi hermano mayor y abrirnos el camino, gracias por que disfrutas la vida, por que haces lo que te gusta y por demostrarnos tu amor.

Gracias Dalia Goldhaber por ayudarme en la realización de este trabajo por tus esfuerzos extraordinarios, por tu paciencia infinita, por ser mi amiga y por enseñarme a hacer las cosas imprimiéndoles todo es esfuerzo posible.

Gracias Dr. Víctor Chávez por ser único en su especie extinta, por festejar los logros de cada uno por enseñarme cosas académicas y cosas de la vida y por hacer de los integrantes de su laboratorio una familia.

Gracias Estela Sandoval, Mayte Olivera y Aída Téllez, por darme un poquito de su tiempo para la realización de este trabajo, las admiro y respeto mucho.

Gracias Pau Heredia por que conocí una amistad única, por hacer de este último año en el laboratorio mi lugar favorito, por ayudarme todos los días, por estar siempre que necesito, gracias por ser especial.

Gracias Mary Yañez por enseñarme a levantarme con sus consejos inigualables, por tus comentarios, por ser tan linda, por hacerme sentir querida y especialmente porque gracias a ti soy más feliz que antes.

Gracias a Barbarita por compartir conmigo tus experiencias, por ser tan cariñosa y dar ese toque único al laboratorio.

Gracias amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por su apoyo y su ayuda: Sergio Adrian, Betzy, Ariana, Gerardo, German, Wendy, Joaquín, Rosa, Mary Carmen, Ale, Ale, Pablo, Jesús, Mariana, Mónica, Luis, Miguel, Laura, Laura, Nery, Rocío y Octavio.

Gracias a Itzel Ávila y su familia por ser unos grandes anfitriones en todo momento.

Gracias Nancy Cruz, por ser incondicional, por enseñarme a formar lazos de amistad irrompibles.
Gracias Tabita Ramírez por ser tan agradable, y enseñarme que las cosas buenas de la vida se comparten.

Gracias Paola Glenda por enseñarme con tu sentido del humor a ser mejor.

Gracias Prisma Nava por ser mi amiga a lo largo de mi vida y por que volviste a confiar en mi.

Gracias a Carmen Guerrero por su compañía inigualable, y por los consejos en los momentos felices y los tristes.

Gracias a mis amigos Alejandro Cantero y Mayra Montserrat por los mejores momentos de diversión.

Gracias a Edmundo Padilla, Scarlett Padilla, Leslie Jardines, José Miguel Calderón, Juan Carlos Vargas, Xochitl Serralde, Citlali Serralde, René Serralde y Romario por los momentos compartidos que son muchos y muy agradables.

Gracias Martín Cabello por los momentos únicos, por tu paciencia y por estar conmigo, gracias por hacerme sentir bien, por permitirme entrar en tu vida, gracias guapo.

Gracias a Isabel Montserrat López Delgado por demostrar que la amistad perdura y que el cariño se extiende por continentes.

Gracias tía Silvia por querernos y llenarnos de buenos momentos.

Gracias Tía Martha por que me reflejaste tranquilidad y paciencia.

Gracias a todos los integrantes de la familia López Guadarrama, los quiero mucho.

Gracias a mis primos y mis tíos pero en especial a Carmen, Irmita, Caro, Paco, Jesús, Luz, Paty y Arqueles Jiménez Molotla, a Pavel y Roberto Jiménez Alejaldre, a Noe Jiménez, Mary Martínez, a Ángel Vásquez por su apoyo de toda la vida.

Gracias Dr. José Antonio Mejias por que gracias a su ayuda comprendo mejor lo que me pasa día con día.

Gracias Nana Oli, por que desde el cielo perdura tu compañía, te quiero.

Gracias a Copilco, Luna y Pompis por su cariño incondicional.

	Páginas
Índice tablas	9
Índice de gráficas	10
Índice de figuras	11
Resumen	14
1) Introducción	15
2) Antecedentes	17
2.1) Biodiversidad	17
2.2) La familia Orchidaceae	20
2.3) El género <i>Encyclia</i>	25
2.4) Taxonomía de <i>Encyclia adenocaula</i>	26
2.5) Descripción botánica de <i>E. adenocaula</i>	26
2.6) Distribución geográfica de <i>E. adenocaula</i>	29
2.7) Conservación	33
2.8) Regeneración <i>in vitro</i>	36
2.9) Embriogénesis	37
2.10) Organogénesis	37
2.11) Reguladores de crecimiento	41
3) Justificación	50
4) Hipótesis	52
5) Objetivos	53
5.1) Objetivo general	53
5.2) Objetivos particulares	53

	Páginas
6) Materiales y Métodos	54
6.1) Material biológico	55
6.2) Elaboración de medio de cultivo	55
6.3) Subcultivo de <i>E. adenocaula</i> (Plantas no contaminadas)	56
6.3) Desinfección de las plantas contaminadas de <i>E. adenocaula</i>	56
7) Resultados y discusión	59
7.1) Uso del PPM y benomil para combatir la contaminación	59
7.2) Incremento de la longitud de hoja, raíz y tallo	61
7.3) Brotes obtenidos a partir de los explantes de hoja, raíz y tallo	68
7.4) Oxidación de brotes	74
7.5) Medio de cultivo	76
7.6) Porcentaje de sobrevivencia de los explantes	78
7.7) Obtención de PLB's	80
8) Conclusiones	85
9) Perspectivas	88
10) Apartado	90
11) Literatura citada	97

Índice de Tablas.

Tabla 1. Biodiversidad vegetal y animal en México y a nivel mundial con base en el número de especies	18
Tabla 2. Superficie Forestal Nacional	31
Tabla 3. Antecedentes del Cultivo de Tejidos en la familia Orchidaceae	38
Tabla 4. Tratamientos hormonales utilizados para la inducción morfogénica de explantes de <i>E. adenocaula</i>	58
Tabla 5 Incremento de la longitud de los explantes de hoja a los 30, 60,90 y 120 días del inicio de los tratamientos	90
Tabla 6 Incremento de la longitud de los explantes de raíz a los 30, 60,90 y 120 días del inicio de los tratamientos	91
Tabla 7 Incremento de la longitud de los explantes de tallo a los 30, 60,90 y 120 días del inicio de los tratamientos	92
Tabla 8 Total de brotes obtenidos de los explantes de hoja, raíz y tallo	93
Tabla 9 Supervivencia de hoja, raíz y tallo a 120 días del inicio del tratamiento	94
Tabla 10 Formación de PLB's a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio de los tratamientos	95
Tabla 11 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS; 1962)	96

Índice de gráficas.

	Páginas
Gráfica 1. Eficiencia del PPM (Plant preservative mixture)	61
Gráfica 2. Longitud de los explantes de hoja a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio del tratamiento	62
Gráfica 3. Longitud de los explantes de raíz a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio del tratamiento	65
Gráfica 4. Longitud de los explantes de tallo a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio del tratamiento	67
Gráfica 5. Brotes obtenidos a partir de los tres tipos de explantes de <i>E. adenocaula</i>	69
Gráfica 6. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de hoja, raíz y tallo a los 120 días del inicio de los tratamientos	79
Gráfica 7. PLB's obtenidos a partir de los explantes de tallo	82

Índice de Figuras.

	Páginas
Figura 1. Países considerados megadiversos	17
Figura 2. Estados mexicanos con mayor biodiversidad	19
Figura 3. Filogenia e interrelaciones entre ciertos órdenes de antófitos	21
Figura 4. Estructura de la flor en la familia Orchidaceae	21
Figura 5. <i>Encyclia adenocaula</i>	25
Figura 6. Distribución geográfica de <i>E. adenocaula</i>	29
Figura 7. Estructura química de ANA (Ácido naftalenacético)	45
Figura 8. Estructura química de la kinetina	47
Figura 9. Metodología para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>E. adenocaula</i>	54
Figura 10. Plantas iniciales de <i>E. adenocaula</i>	55
Figura 11. Materiales y cortes de los explantes de <i>E. adenocaula</i>	57
Figura 12. Explantes de <i>E. adenocaula</i>	57
Figura 13. Respuestas de los explantes de hoja	64
Figura 14. Respuestas de los explantes de raíz	71
Figura 15. Organogénesis a partir de tallo	67
Figura 16. Embriogénesis a partir de de tallo	76
Figura 17. PLB's obtenidos a partir de tallo	81

Abreviaturas.

AIA: Ácido 3-indolacético

ANA: Ácido Naftalenacético

°C: Grados Celsius.

cm: Centímetros

cm³: Centímetros cuadrados

g: Gramos

h: Horas

Kin: Kinetina (6-furfurilaminopurina)

Benomil: Fungicida de amplio espectro perteneciente al grupo de los bencimidazoles

HCl: Ácido clorhídrico

L: Litros

mg: Miligramos

ml: Mililitros

min: Minutos

MS: Medio nutritivo creado por Murashige & Skoog (1962)

N: Normal

NaOH: Hidróxido de sodio

nM: Nanomolar

pH: Potencial de hidrógeno

PLB's: Cuerpos parecidos a protocormos (Protocorm like bodies)

PPM: Biocida y fungicida de amplio espectro (Plant preservative mixture)

SM: Supra molar

r.p.m: Revoluciones por minuto

μg: Microgramos

RESUMEN

Encyclia adenocaula es una especie endémica de México que se encuentra catalogada como amenazada por la NOM -059-ECOL-2001, debido a su extracción masiva y a la destrucción de su hábitat. Se logró el establecimiento de plantas asépticas de *E. adenocaula* mediante el uso de PPM y benomil, los cuales al ser ensayados presentaron diferencias notorias en cuanto a su eficiencia, siendo más efectivo el primero que el segundo. Una vez obtenidos los cultivos asépticos se realizó un barrido hormonal que consistió en 20 tratamientos resultado de la combinación de diferentes concentraciones de 6-furfurilaminopurina (Kin) (0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L) y Ácido naftalenacético (ANA) (0.1, 0.5, 1 mg/L) adicionadas en el medio de cultivo Murashige y Skoog al 50%, en donde se colocaron tres tipos de explantes distintos (hoja, tallo y raíz). Los resultados obtenidos dependieron del tipo de explante utilizado. A partir de la raíz se obtuvieron 4 brotes totales, de la hoja se obtuvieron 18 y del tallo 419 brotes a lo largo de los 120 días del inicio de los tratamientos, siendo a los 60 días la mayor formación de brotes. Sólo en algunos tratamientos hubo proliferación de brotes a partir de raíz y hoja, los brotes de tallo se presentaron en los 20 tratamientos aplicados. Se originaron PLB's (Protocorm like bodies) a partir de los explantes de tallo con una concentración de 0.5 mg/L de ANA. El desarrollo de PLB's tuvo una mayor proliferación a los 90 días del inicio del tratamiento. También se midió la longitud de los tres diferentes explantes a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio del tratamiento. El tallo fue el explante que presentó mayor elongación en comparación con los explantes de hoja y raíz.

1) INTRODUCCIÓN.

México es un país megadiverso, el título se aplica a los países que contienen un porcentaje extraordinario de la biodiversidad del planeta. Aquellos que se encuentran situados, total o parcialmente, en los trópicos cuentan con una gran parte (entre 60 y 70%) de la diversidad biológica del planeta. México se encuentra en una categoría especial porque ocupa el primer lugar en el mundo en diversidad de reptiles, el segundo en mamíferos, el cuarto en anfibios y plantas (Sarukhán y Dirzo, 1992).

En cuanto a plantas se refiere, en México se encuentra representada una gran diversidad de comunidades y especies vegetales. Rzedowski calculó 36 000 especies para la República Mexicana (Sarukhán y Dirzo, 1992). La Familia Orchidaceae es una de las más ricas en especies familia de plantas con flores que conteniendo 800 géneros y más de 25 000 especies (Rojas, 2007), sin embargo también es una de las más vulnerables, por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha estado sujeta. En México se conocen más de 1 200 especies de orquídeas, de las cuales 181 están registradas en alguna categoría de riesgo en la norma oficial NOM-059- ECOL-2001 (Ávila y Salgado-Garciglia, 2006).

Encyclia adenocaula es una orquídea que se caracteriza por tener flores grandes, totalmente rosadas, con sépalos y pétalos angostos, columna alada y algo arqueada. El pedúnculo fuertemente verrugoso también permite su identificación, aún sin las flores (Dressler y Pollard, 1974). Esta especie se encuentra actualmente catalogada por la NOM-059-ECOL-2001 como amenazada (SEMARNAT, 2002). La crítica escasez de las especies o su extinción representan menos oportunidades para la humanidad de poder tener mejores recursos (medicinas, alimentos, materiales industriales), asimismo se pierden elementos necesarios para sostener la vida en el Planeta. Es por esto que el cuidado de la biodiversidad requiere hoy día el planteamiento de tres grandes líneas de acción:

conservar los recursos existentes, aprovecharlos de manera sustentable y restaurar aquellos ecosistemas que han sido severamente afectados (Ávila y Muñoz, 2003)

E. adenocaula es una especie silvestre que no se cultiva, además su forma de propagación natural tiene la característica de presentar ciclos de vida largos y pocas semillas llegan a germinar en su hábitat es por esto que es necesario adoptar una técnica que ayude a que su propagación sea más efectiva como por ejemplo el cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta importante dentro de las áreas básicas de la biología vegetal y bioquímica, además de que ha adquirido importancia en los estudios de biotecnología aplicada en la agricultura y la conservación de especies silvestres que representan recursos naturales. La base teórica del cultivo de tejidos es la totipotencialidad (Thorpe, 2007). En el cultivo de tejidos juegan un papel importante los reguladores de crecimiento, los cuales son responsables de la regulación del desarrollo de las plantas (Baltazar, 2004).

Finalmente el objetivo de este trabajo fue demostrar que cultivo de tejidos, es efectivo para la regenerar y propagar *E. adenocaula* mediante el uso de los explantes hoja, tallo y raíz adicionando diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento Kin y ANA mediante la obtención de brotes y la formación de PLB's para la multiplicación masiva *in vitro* de la especie.

2) ANTECEDENTES.

2.1 Biodiversidad.

El concepto de biodiversidad se refiere en general a la variabilidad de la vida; incluye los sistemas terrestres, acuáticos, los complejos ecológicos de los que forman parte, así como la diversidad entre las especies y dentro de cada especie. En el mundo existen más de 170 países, pero sólo 12 de ellos son considerados como megadiversos (Figura 1) ya que albergan en conjunto entre 60 y 70% de la biodiversidad total del planeta (CONABIO, 1998).

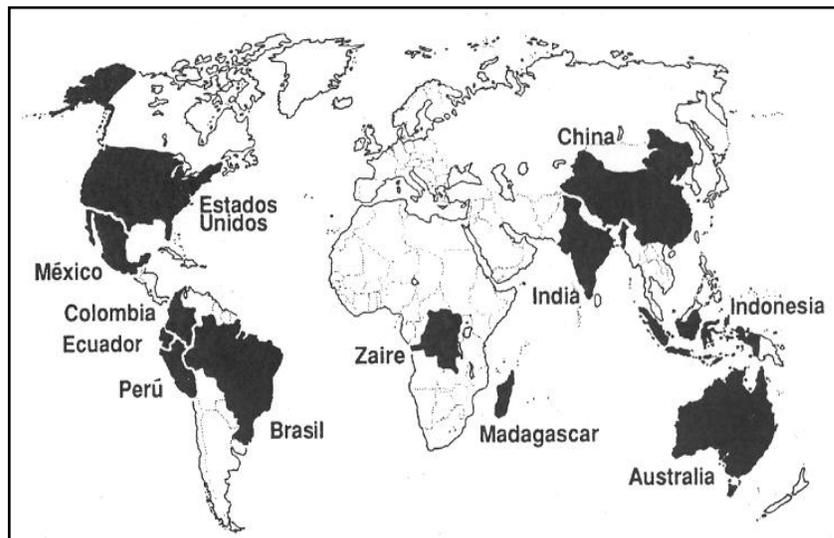


Figura 1. Países considerados megadiversos (Sarukhán y Dirzo, 1992).

Biodiversidad de México.

México es reconocido como uno de los territorios de mayor diversidad biológica en el planeta (Tabla 1). Esto se debe a que en el país se encuentran representados la mayoría de los principales tipos de ecosistemas que incluyen, por ejemplo, desiertos, bosques templados, bosques mesófilos, comunidades de vegetación alpina y exuberantes selvas tropicales del sureste. Esta variedad de ecosistemas

alberga una gran cantidad de plantas, animales y microorganismos. México no sólo se distingue por su biodiversidad, sino también por su alto índice de endemismo, es decir, de las especies que se encuentran dentro de sus límites geopolíticos y sólo se encuentran aquí de forma natural y no en otra parte del mundo (Sarukhán y Dirzo, 1992).

Tabla 1. Biodiversidad vegetal y animal en México y a nivel mundial con base en el número de especies (CONABIO, 1998).

Especies	México	Mundial	Porcentaje
Aves	1 041	9 040	11.5
Mamíferos	439	4 300	10.2
Anfibios y reptiles	989	10 817	9.1
Plantas	26 000	250 000	10.4

Entre las causas que hacen a México un país con megadiversidad se encuentran su topografía, la variedad de climas, y una compleja historia tanto geológica y biológica como cultural. El territorio mexicano es considerado por los biogeógrafos como zonas de transición entre dos grandes regiones: la neotropical (constituida por América del Sur, Centroamérica y el Caribe) y la neártica (que corresponde a Norteamérica), las cuales hicieron contacto hace seis millones de años (Figura 2). Debido a esto, México constituye una zona biogeográficamente compuesta, donde el contacto entre dos biotas ancestrales diferentes ha dado como resultado una rica mezcla de flora y fauna con diferentes historias biogeográficas (CONABIO, 1998).

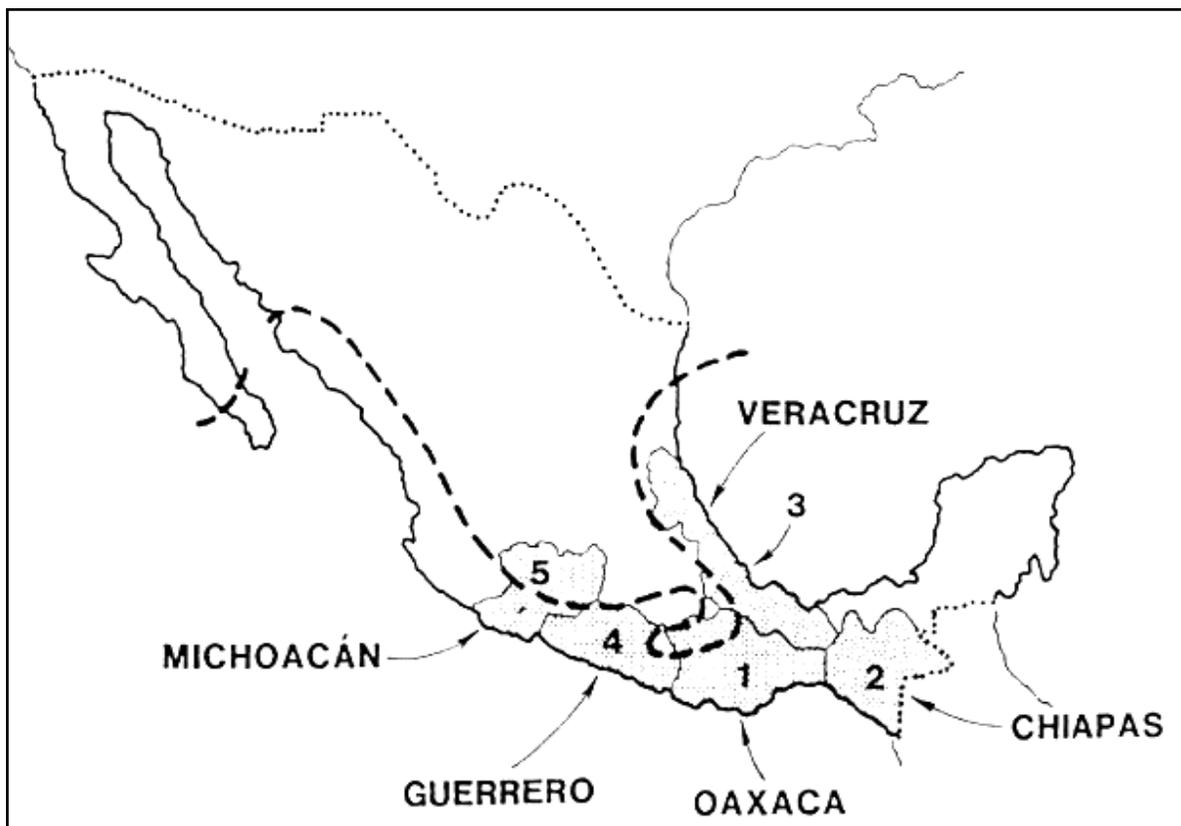


Figura 2. Estados mexicanos con mayor biodiversidad. La línea punteada indica la zona de México donde se entrelazan las dos principales regiones biogeográficas del planeta, la neártica y la neotropical (Sarukhán y Dirzo, 1992).

Es importante subrayar que no sólo los bosques tropicales son los responsables de la diversidad biológica de México. Los bosques de pino-encino de México son los más diversos de la Tierra, los desiertos también albergan, entre otras plantas, la mayor cantidad de cactáceas del planeta, muchas de las cuales son endémicas y se encuentran severamente amenazadas, además la gran diversidad de reptiles que se encuentra en el país se debe en gran parte a la variedad de desiertos, donde los reptiles son especialmente abundantes. De manera similar, los ecosistemas marinos, del Golfo de California y los arrecifes coralinos de la costa de Yucatán y Quintana Roo, contribuyen también a la gran diversidad biológica de México. En cuanto al número de plantas fanerógamas en la República Mexicana, existen 220 familias que incluyen 2 410 géneros y 26 000 especies, lo que sitúa a México en el cuarto lugar respecto a la biodiversidad (Sarukhán y Dirzo, 1992).

Problemas de la Biodiversidad.

La presión sobre los recursos naturales aumenta día con día y el efecto sobre los ecosistemas se manifiesta notablemente en la pérdida de especies y en la desaparición, fragmentación y degradación de los hábitats, paisajes y ecosistemas. Diariamente son deforestadas miles de hectáreas en el mundo y cientos de toneladas de basura y contaminantes son vertidos a las aguas, suelos y atmósfera. En este escenario, las especies silvestres, sin un lugar adecuado donde vivir, tienden en la mayoría de los casos a desaparecer, a extinguirse (Instituto Nacional de Ecología, 2009, www.ine.go.mx).

Sin embargo, hay actividades de impacto directo o amenaza a nivel de especies como el comercio de especies, la cacería, la introducción y la erradicación de especies. Esto genera en la mayoría de las veces, consecuencias adversas a la conservación de las especies (CONABIO, 1998). La biodiversidad del mundo está declinando en una tasa sin precedentes. Durante el periodo de 1996 a 2004, un total de 8 321 especies de plantas fueron incluidas en IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales); con el propósito de realizar listados de los taxa que están cerca de un riesgo de extinción global (Sarasán *et al.*, 2006). Entre las familias completas que han sido diezgadas se encuentran las orquídeas, y ahora son consideradas todas en un grado de amenaza que podría llevarlas a todas a la extinción.

2.2 La Familia Orchidaceae.

Las orquídeas representan a una de las familias más evolucionada entre las monocotiledóneas, (Figura 3) además de encontrarse entre las familias más grandes de plantas con flores, abarcan a nivel mundial más de 700 géneros y 20-25 mil especies (Scagel, 1980; Dressler, 1981).

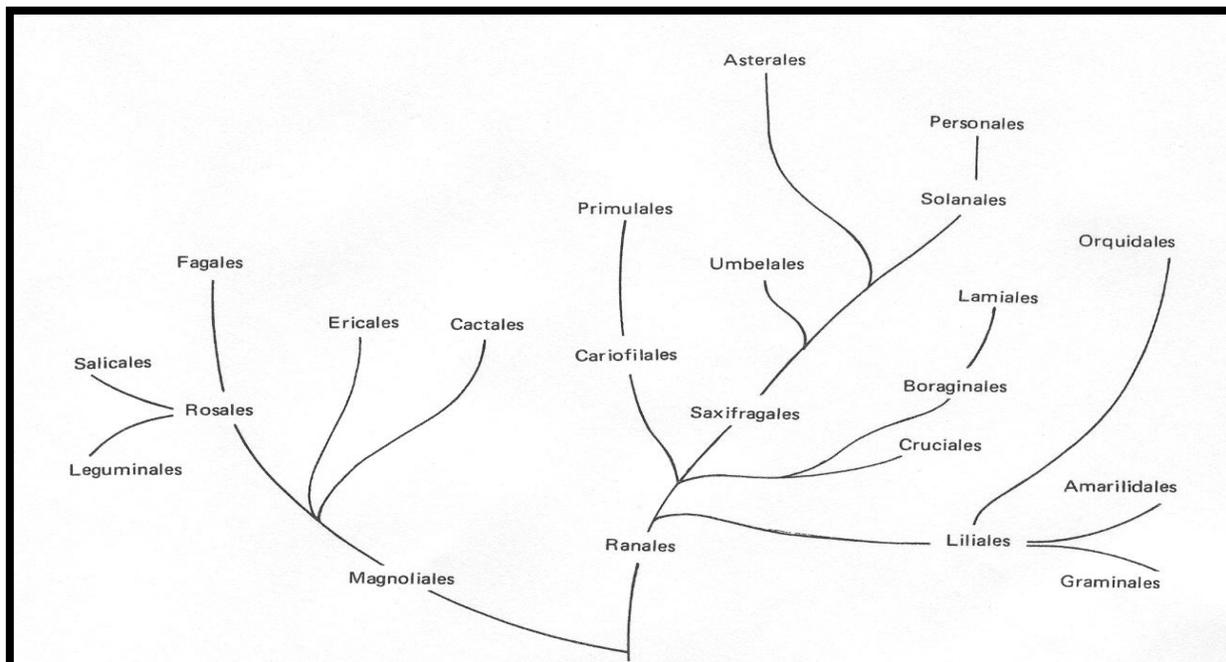


Figura 3. Filogenia e interrelaciones entre ciertos órdenes de antófitos (Scagel, 1980).

Las orquídeas son plantas herbáceas con una estructura básica similar a la de muchas otras monocotiledóneas. Están constituidas por vástagos organizados en uno de dos hábitos de crecimiento; en el primero de ellos el desarrollo se da mediante la extensión vegetativa a partir de un meristemo apical que da lugar a un solo eje principal y se le conoce como crecimiento monopodial. En el segundo el eje está formado por una serie de vástagos generados de manera consecutiva a partir de meristemos o yemas de renuevo situadas basal, lateral o apicalmente en el vástago anterior; el conjunto de vástagos forma un eje compuesto y el hábito es entonces llamado simpodial. La mayor parte de las orquídeas epífitas mexicanas y al parecer algunas terrestres son simpodiales (Hágsater *et al.*, 2005). Las orquídeas pueden ser terrestres (creciendo directamente sobre el suelo), las cuales por regla general provienen de zonas con poca lluvia o sequía dónde existe poca humedad ambiental o dónde se registran temperaturas inferiores a 0°C. Las orquídeas terrestres poseen órganos de reserva subterráneos como raíces engrosadas, rizomas, cormos o tubérculos; para almacenar agua y sustancias elaboradas que les permiten sobrevivir en periodos críticos. Clark (1977) cita que

también podemos encontrar orquídeas creciendo sobre otra planta, principalmente árboles a las cuales se les denomina epífitas o bien creciendo sobre rocas (rupícolas) o sobre hojas muertas del suelo (saprófitas), alimentándose de materia orgánica en descomposición depositada en el suelo (Suarez, 2006).

Las hojas son los apéndices, u órganos laterales, más importantes del tallo, normalmente cuentan con el tejido dérmico, el vascular y el fundamental (Essau, 1976). Además de tener la función de transpiración, el intercambio gaseoso y la producción de nutrientes mediante la fotosíntesis, las hojas en la familia Orchidaceae presentan algunas modificaciones. Muchas epífitas tienen hojas con grado variable de succulencia. En otras epífitas de la subtribu Pleurothallinidae posee una hipodermis consistente en un tejido traslúcido situado bajo la epidermis del haz de la hoja y cuya función es el almacenamiento de agua (Pridgeon, 1982). También algunas orquídeas del género *Trichocentrum*, tiene pseudobulbos diminutos pero con hojas grandes y carnosas este carácter se presenta en algunas especies del género *Brassavola* y *Kraenzlinella* en donde la hoja es casi cilíndrica. Las hojas succulentas representan una inversión importante de recursos para la planta y por lo general son funcionales durante varios años una estrategia alternativa es la producción de hojas delgadas relativamente poco costosas que mueren y caen al finalizar cada temporada de crecimiento (Hágsater *et al.*, 2005).

En cuanto a las raíces de las orquídeas son órganos sumamente importantes; en especies terrestres no existen diferencias significativas respecto a las demás monocotiledóneas (Navarro *et al.*, 2001). Las raíces de las orquídeas son simples o ramificadas, carnosas y con un diámetro aproximado de entre 1 y 10 mm, dependiendo de la especie. Son circulares en corte transversal, aunque en algunas epífitas, en raras ocasiones, son muy aplanadas. Su organización anatómica consiste en un cilindro vascular central rodeado de una endodermis, envuelta a su vez por la corteza (Hágsater., *et al* 2005). Para su vida sobre los árboles y las rocas, estas plantas han desarrollado una capa que envuelve a las raíces llamado velamen, parecido a un forro esponjoso que puede ser blanco o

verdoso; este color lo adquiere porque ahí se realiza la biosíntesis de compuestos producto de la fotosíntesis. La función general del velamen es facilitar la absorción y retención de agua, lo cual es de gran importancia si se vive sobre la rama de un árbol donde el agua no siempre está disponible, ya que sólo se obtiene cuando llueve; adicionalmente esta estructura peculiar contribuye con el establecimiento de una relación donde ambos actores reciben el beneficio de la asociación, por ejemplo, un hongo se asocia con una orquídea y ésta le proporciona azúcares y sustancias de reserva que el no puede biosintetizar y el hongo aporta humedad y nutrientes minerales a la planta que ella no puede acumular (Sarmiento y Romero, 2000).

La estructura básica del tallo de las orquídeas es comparable a una caña o carrizo y está formado por segmentos o entrenudos delimitados por nudos o anillos cicatrizales donde originalmente se insertaban hojas, vainas o escamas foliares. Los pseudobulbos son tallos aéreos notablemente engrosados. Están presentes en muchas orquídeas epífitas y algunas terrestres. Los tallos engrosados constituyen almacenes de agua y sustancias de reserva, como almidón, que son utilizados al menos en parte para sustentar la producción de flores y frutos y el desarrollo de nuevos vástagos (Hágsater *et al.*, 2005).

Las flores son sin duda la parte más conspicua y atractiva de las orquídeas, suelen estar agregadas en racimos o panículas, aunque en ocasiones son producidas de manera individual. Las inflorescencias pueden originarse casi a cualquier altura en el tallo o pseudobulbo, aunque en la mayor parte de los géneros aparecen ya sea en la base o en el ápice (Hágsater *et al.*, 2005).

Todas las flores poseen tres pétalos y tres sépalos, alrededor de los órganos sexuales (Figura 4A). Uno de los pétalos es llamado labelo, es distinto a los demás, puede ser más grande, más largo o pequeño con un color diferente o poseer una complicada gama de manchas y tonos que lo hace distinguirse

fácilmente (Figura 4B). La finalidad de esta estructura es servir de pista de aterrizaje para los polinizadores (Sarmiento y Romero, 2000; Dressler, 1993).

La vasta diversidad de formas, tamaños y estructuras florales desplegada por las orquídeas tiene como finalidad efectuar la polinización cruzada, es decir, la transferencia de polen entre la antera de una flor y el estigma de otra de la misma especie (Figura 4C-I). La polinización cruzada a partir de agentes polinizadores provoca variación genética sobre la cual actúa la selección natural. Se han registrado alrededor de 350 especies de orquídeas en las que al menos algunas poblaciones se autopolinizan, pero éstas representan una pequeña fracción del total de especies de orquídeas conocidas. Los mecanismos de polinización de las flores de orquídea, que generalmente involucran el depósito del polinario (Figura 4D, 4H y 4I) en sitios específicos del polinizador, así como la atracción más o menos selectiva de un solo o unos pocos tipos de animales mediante aromas, formas, texturas, colores y otras "guías", ayudan a evitar el cruzamiento entre especies (Hágsater *et al.*, 2005; Dressler, 1993).

Dentro de esta gran familia de plantas con flores se encuentra el género *Encyclia* el cual está muy bien representado en la República Mexicana, se conoce desde épocas prehispánicas y se le atribuyen algunos usos importantes dentro de la medicina tradicional (Chávez, 2008)

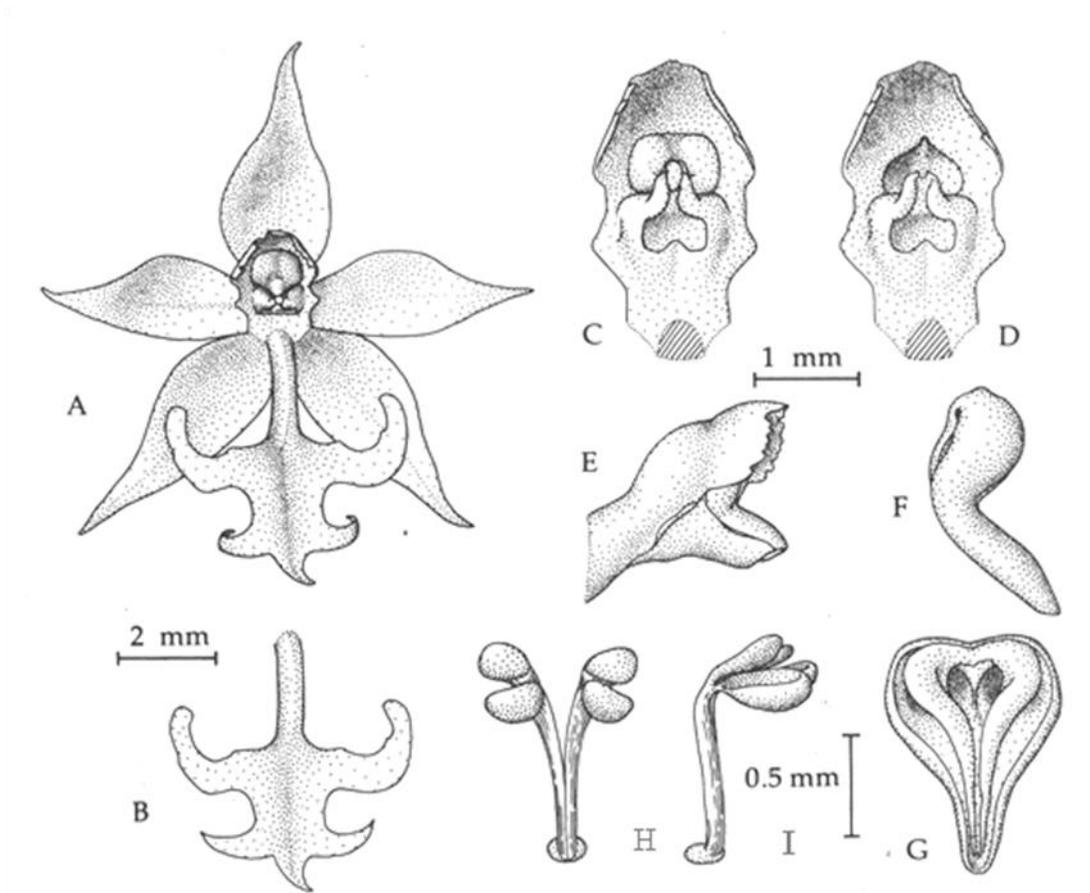


Figura 4. Estructura de la flor en la familia Orchidaceae (Dressler, 1993). (*Cryptarrhena guatemalensis*)

A) Flor vista frontal. B) Labelo aplanado. C) Columna vista ventral. D) Columna con anteras y polinios removidos. E) Columna vista de perfil F) Antera vista de perfil. G) antera vista ventral. H) Polinario vista superior. I) Polinario vista de perfil

2.3 El género *Encyclia*.

Las especies comprendidas dentro del género, son epífitas o terrestres, presentan pseudobulbos, ovoides o ligeramente aplanados, tienen de 1 a 4 hojas coriáceas, sus flores se presentan en inflorescencia terminales, en forma de racimos o panículas con flores de tamaño mediano o relativamente grandes, pétalos y sépalos semejantes entre sí. El labelo es trilobado, libre o adherido sólo en la base con la columna, por lo general los lóbulos laterales envuelven a la columna. Más de 100 especies del género *Encyclia* se encuentran representadas en América Tropical y más de dos terceras partes se encuentran en México (Rzedowski,

2001). Dentro de este género se encuentra la especie *E. adenocaula*, la cual crece silvestremente y actualmente se encuentra amenazada de extinción.

2.4 Taxonomía de *Encyclia adenocaula*.

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Liliopsidae.

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales.

Familia: Orchidaceae.

Subfamilia: Epidendroideae.

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laelinae

Género: *Encyclia* Hook

Especie: *E. adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr.

2.5 Descripción botánica de *E. adenocaula*.

E. adenocaula (Figura 5) presenta pseudobulbos agrupados, ovoides o cónico ovoides, de 5-8 cm de largo de 2-6 cm de ancho; hojas de 2 ó 3 en cada pseudobulbo, singulares, agudas y obtusas, 11-35 cm de largo, 0.6-2.8 cm de ancho, inflorescencia ramificada, generalmente de muchas flores, de 30 hasta más de 100 cm de largo, pedúnculo, raquis, pedicelo y ovarios todos completamente verrugosos (Figura 5B y 5D); color rosado pálido, el labelo con una o varias rayas oscuras en el lóbulo medio; sépalos linear-elípticos o elípticos-lanceolados, agudos, 26-52 mm de largo, 5-7 mm de ancho; pétalos estrechamente elípticos o elíptico-oblancoleados, agudos, 30-48 mm de largo, 4-8 mm de ancho; labelo

unido con la columna por un cuarto del largo de la columna, trilobado, largo total de 33-46 mm (Figura 5C); lóbulos laterales oblicuamente oblongo-lanceolados u oblongos, obtusos, 8-12 mm de largo, de 3-7 mm de ancho, separados del lóbulo medio por senos 2-2.5 mm de ancho; lóbulo medio soborbicular, oblongo u oblongo-ovado, mucronado, a cada lado del ápice, 21-30 mm de largo, 19-28 mm de ancho; callo elíptico profundamente surcado, el lóbulo medio con venas bajas; columna claviforme, 13-15 mm de largo, alada, las alas oblicuamente cuadrado-oblongas o triangular oblongas, aproximadamente de 1.5 mm de largo y ancho, el diente medio triangular obtuso, subigual a los laterales y separados por senos poco profundos (Figura 5I); cápsula, elipsoide, verrugosa, aproximadamente 40-45 mm de largo y 15 mm de ancho (Dressler y Pollard, 1974).

Las flores de *E. adenocaula*, comúnmente son llamadas “trompos (Figura 5B). Es considerada una planta ornamental, empleada con propósitos estéticos pero también para producir sombra, ayudar a la purificación del aire mediante la producción de oxígeno, filtrar el polvo y partículas contaminantes del aire, disminuir el ruido absorbiendo sonidos muy intensos, ocultar ciertas áreas de la vista del público y proporcionar privacidad, reducir el calor y resplandor de la luz solar o artificial, reducir olores desagradables en la atmósfera, construir barreras que rompen la fuerza de los vientos, creando microclimas, moderar el clima reduciendo las heladas por radiación (Corona y Chimal, 2006).

Es importante mencionar que las orquídeas que pertenecen al género *Encyclia* han sido usadas desde épocas prehispánicas para curar heridas, para la obtención de mucílagos, para la elaboración de adhesivos, como mordentes de pigmentos para el arte plumario (Chávez, 2008), además, recientemente se ha analizado sus componentes químicos en la especie *Encyclia michuacana* lo que ha reflejado la presencia de metabolitos secundarios (flavonas) y metabolitos con características relajantes y antiepasmódicas (Tovar *et al.*, 2006; Pérez y Vargas, 2009).

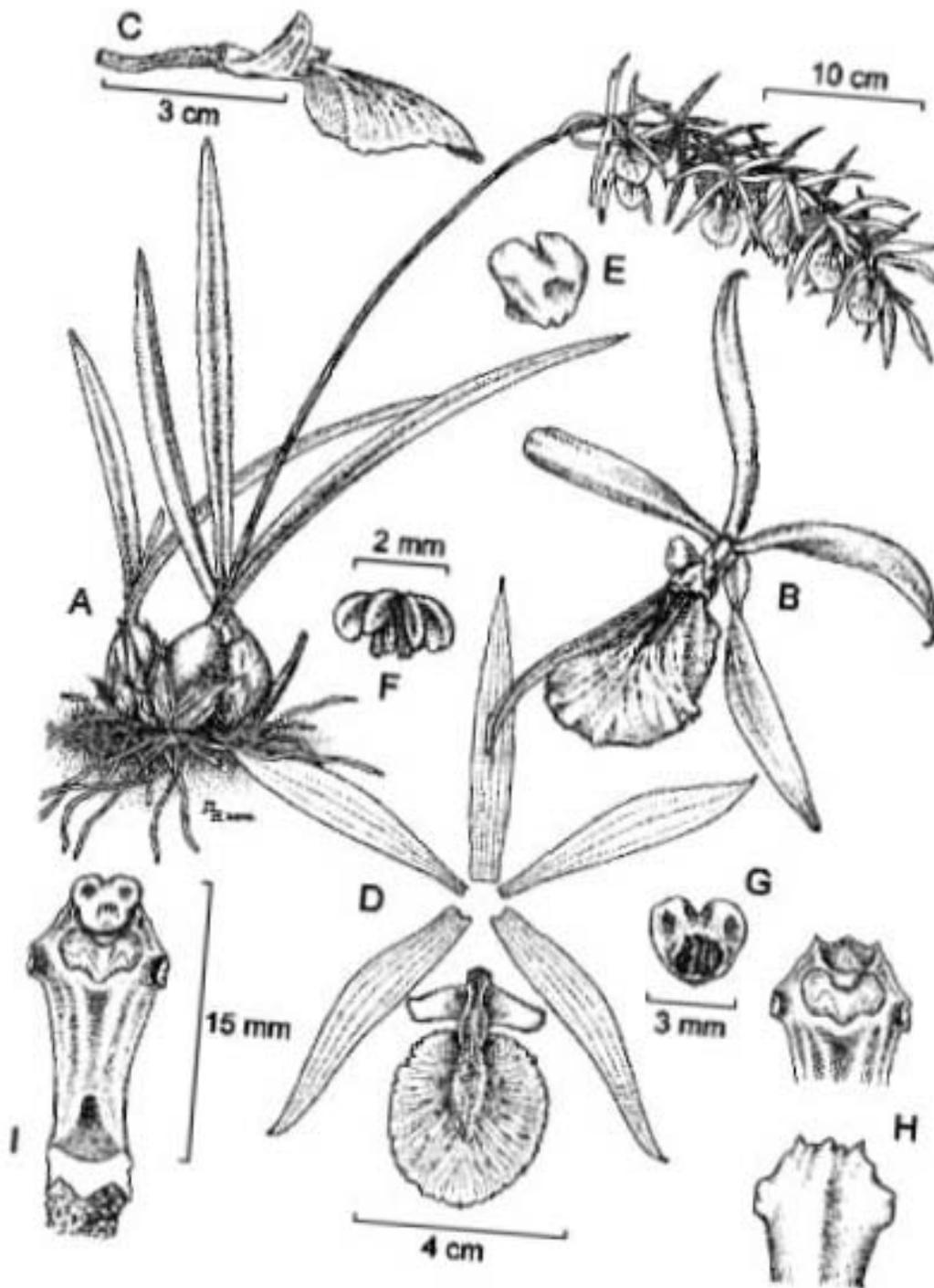


Figura 5. *Encyclia adenocaula*; A. Hábito; B. Flor vista de tres cuartos; C. Vista lateral de la columna y el labelo; D. Disección floral; E. Antera en vista dorsal; F. Polinios; G. Antera en vista ventral; H. Ápice de la columna en vistas dorsal y ventral; I. Columna en vista ventral (García, 2003; <http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/FLOBA.htm>).

2.6 Distribución geográfica de *E. adenocaula*.

E. adenocaula sólo se le conoce en la parte occidental de México en los Estados de Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit y Sinaloa (Figura 6), su distribución va desde los 1 000 a 2 000 m de altitud en bosques más bien secos de encino o pino y encino y su época de floración es de abril a junio (Dressler y Pollard, 1974).

E. adenocaula utiliza como huésped natural a los árboles de encino (*Quercus* spp.) (Ruíz et al., 2008). El clima en donde se encuentra *Quercus* varía de calientes o templados húmedos a secos dónde la temperatura media anual va 10-26 °C (www.ine.gob.mx).

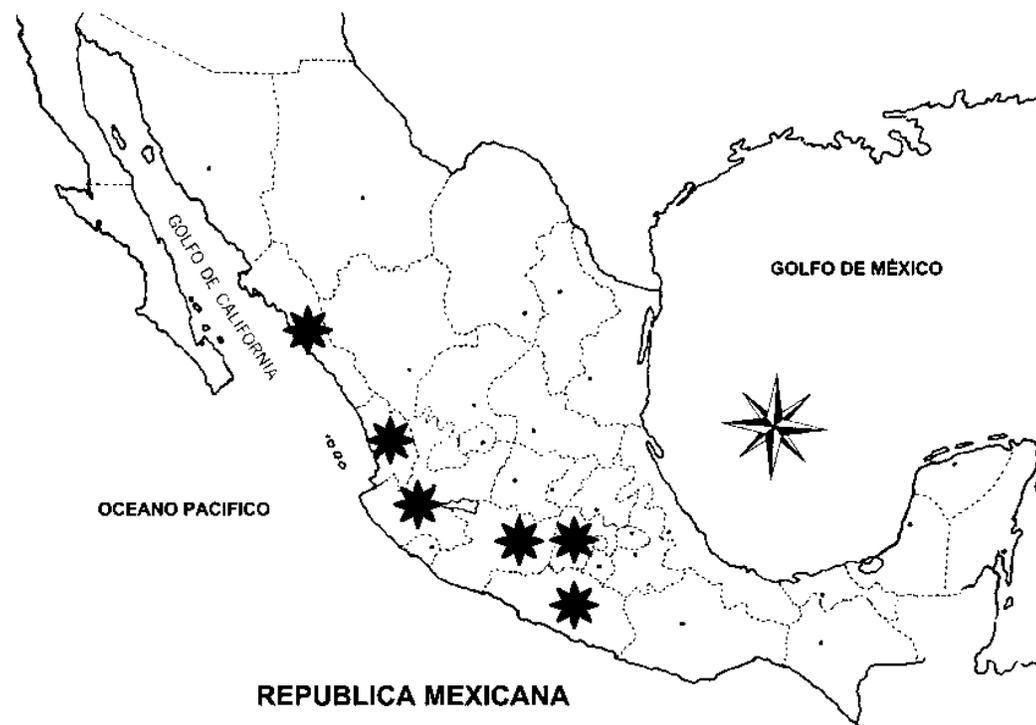


Figura 6. Distribución geográfica de *E. adenocaula* (Dressler y Pollard, 1974).

El bosque de pino encino.

En México los bosques ocupan el 15.47% del territorio Nacional (Tabla 2). La acumulación de biomasa como vegetación viviente, desechos, turba y carbono en los suelos, es una función importante de los bosques en la regulación del carbono atmosférico. La tasa de producción de biomasa es también una medida de la sanidad y vitalidad de los bosques. El manejo ecológico y sustentable de los bosques de producción y la durabilidad de los productos forestales, pueden ser un factor en el control de la cantidad de carbono que entra a la atmósfera terrestre. El valor de los servicios ambientales que producen las zonas arboladas forestales se estima en 13 mil millones de dólares anualmente, esto es 8.5 veces más el valor de la producción maderable actual (Flores, 2001; http://www.virtual.chapingo.mx/dona/sis.prod.forestal/Unidad_I.pdf)

México es el centro primario mundial de diversidad de pinos (*Pinus* spp.) y el centro de diversidad de los encinos (*Quercus* spp.). Los bosques de pinos se localizan dentro de la zona templada subhúmeda característica de las sierras montañosas del país como la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, la faja volcánica transmexicana, Sierra Madre del Sur y montañas aisladas del Altiplano. Uno de los estados con mayor distribución de bosque es Michoacán donde se distribuye *E. adenocaula*. Los bosques de pino-encino, son una zona biológica importante de México, notable por su alta abundancia de especies y endemismos de plantas vasculares. Rzedowski calcula 7 000 especies de plantas fanerógamas de las cuales 4 900 son endémicas de México (Baltazar, 2004).

Tabla 2. Superficie Forestal Nacional
 (Flores2001 http://www.virtual.chapingo.mx/dona/sis.prod.forestal/Unidad_I.pdf).

Ecosistema	Superficie (Mill. Has.)	Porcentaje Nacional	del Terreno (%)
Bosque	30.4		15.47
Selvas	26.4		13.44
Vegetación de zonas áridas	58.5		29.72
Áreas forestales perturbadas	22.2		11.30
Total forestal	141.7		72.05

En este contexto cabe mencionar que hay problemas en cuanto a la conservación del bosque de pino-encino como la disminución o exceso en las lluvias alrededor del mundo, ocasionadas por la aparición del fenómeno meteorológico conocido como El Niño que tiene impactos importantes en el clima del planeta. Los cambios ambientales en algunos casos pueden ser enormes, principalmente en regiones donde se presenta la sequía. Países como Australia, Indonesia, Brasil o México vivieron en 1997 y parte de 1998 uno de los periodos de sequía más severos en años recientes. Los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato reportaron para el mes de abril de 1998 disminución en la precipitación. Como resultado de ello se registró para ese año una disminución de la superficie de los cuerpos de agua y de los bosques (CONABIO, 2008).

Categoría de riesgo.

Muchas de las especies epífitas son importantes en el mercado internacional de la horticultura, especialmente las especies de Araceae, Bromeliaceae, Orchidaceae y Polypodiaceae. Específicamente las orquídeas, son plantas protegidas, tanto nacional como internacionalmente. En México, la lista nacional de plantas protegidas abarca 980 especies y al menos 19% de éstas pertenecen a la familia

Orchidaceae. Pero a pesar de esta protección legal, el tráfico de epífitas silvestres es común en los mercados y calles. Al igual que con otros grupos de plantas la extinción de especies es causada por una combinación de deforestación, fragmentación y recolección ilegal. Sin embargo, hay casos en los cuales la gente que comercializa con plantas depende en gran medida de éstas para su subsistencia (Flores y Valencia, 2007).

En la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002) aparece la especie *E. adenocaula* en la categoría de amenazada endémica, la cual se comercializa en mercados y tianguis de Veracruz, México por \$100.00 MN (Flores y Valencia, 2007). Actualmente 181 especies de orquídeas están incluidas dentro de esta norma, dentro de las cuales 15 especies están catalogadas en peligro de extinción, 58 como amenazadas, 1 como extinta y 107 están sujetas a protección especial (Suárez, 2006).

E. adenocaula se distribuye en pequeñas áreas de los Estados de Michoacán, Sinaloa, Estado de México, Nayarit, Guerrero y Jalisco y estas poblaciones están integradas de escasos individuos, las cuales son saqueadas para su venta como ornamentales y a pesar de existir un beneficio económico, no las cultivan en gran medida porque las personas saben que son de lento crecimiento, por ello si los procedimientos convencionales no son eficientes para abastecer la demanda que existe, deberán aplicarse alternativas como la propagación por cultivo de tejidos.

En este marco de protección al ambiente cabe mencionar que también hay organizaciones internacionales que llevan a cabo acciones en pro de la vida silvestre, tal es el caso de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) que es un acuerdo internacional concertado entre los gobiernos. Tiene por finalidad velar por que el comercio internacional de especímenes de animales y plantas silvestres no constituya una amenaza para su supervivencia. Se estima que anualmente el comercio internacional de vida silvestre se eleva a miles de millones de dólares y

afecta a cientos de millones de especímenes de animales y plantas. Los niveles de explotación de algunos animales y plantas son elevados y su comercio, junto con otros factores, como la destrucción del hábitat, es capaz de mermar considerablemente sus poblaciones e incluso hacer que algunas especies estén al borde de la extinción. Muchas de las especies objeto de comercio no están en peligro, pero la existencia de un acuerdo encaminado a garantizar la sostenibilidad del comercio es esencial con miras a preservar esos recursos para las generaciones venideras. Es sabido que el comercio de animales y plantas silvestres sobrepasa las fronteras entre los países, su reglamentación requiere la cooperación internacional a fin de proteger ciertas especies de la explotación excesiva. La CITES se concibió en el marco de ese espíritu de cooperación. Hoy en día, ofrece diversos grados de protección a más de 30 000 especies de animales y plantas, bien se comercialicen como especímenes vivos, como abrigos de piel o hierbas disecadas (CITES, 2009 <http://www.cites.org/esp/disc/what.shtml>).

2.7 Conservación.

La Ley General de la Vida Silvestre define a la conservación como protección, cuidado, manejo y mantenimiento de los ecosistemas, los hábitats, las especies y las poblaciones de vida silvestre, de manera que se salvaguarden las condiciones naturales para su permanencia a largo plazo (Zarco y Gómez, 2008 <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/546/cap24.pdf>).

La conservación y el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales son una prioridad impostergable para las sociedades, que toman conciencia de las graves consecuencias del deterioro ecológico generado y lo que esto implica, tanto para la supervivencia de las especies vegetales y animales como para la suya propia. Más que una alternativa, la conservación es hoy una necesidad para

resguardar el entorno de la humanidad, los espacios naturales que hacen posible la vida. No obstante, a pesar de que a nivel internacional y particularmente en nuestro país existe una política oficial para la conservación de áreas naturales, su instrumentación y marco jurídico no siempre han servido para cumplir sus propósitos primarios. Incluso existen áreas naturales oficialmente protegidas que destacan por su creciente deterioro debido al abandono institucional. El problema se agudiza cuando en las áreas decretadas existen poblaciones establecidas o que se han ido asentando al paso del tiempo. Entonces la conservación y el aprovechamiento de los recursos naturales se convierten en dos procesos que muchas veces entran en contradicción, colocando en un extremo a la naturaleza y en el otro las necesidades humanas y los intereses económico-sociales (Anta *et al.*, 1999).

Conservación *in situ* y *ex situ*.

La forma más recomendable de conservar es por medio de establecimiento de reservas en la naturaleza *in situ*, es decir, conservar los ecosistemas y hábitats en su ambiente natural (López y Pulido, 2007). Se han establecido diferentes categorías y en el país se cuenta con: reservas de la biósfera (45), parques nacionales (67), monumentos naturales (4), áreas de protección de recursos naturales (2), áreas de protección de flora y fauna (28), santuarios (17) y otras categorías (1), constituyendo un total de 18 727.86 hectáreas (Comisión Nacional de las Áreas Naturales Protegidas, 2009; <http://www.conanp.gob.mx/>)

La otra vía de conservación es estableciendo colecciones fuera de su hábitat, es decir, *ex situ*, tales como bancos de semillas y colecciones de plantas vivas en los jardines botánicos; en ambos casos esta actividad se realiza en diferentes etapas, por ejemplo la adquisición del germoplasma que puede ser por colecta directa, por intercambio o donaciones y su finalidad es protegerlo o para

completar las colecciones existentes, posteriormente se realiza la multiplicación del material colectado, ya sea por vía sexual o asexual según sea el caso; posteriormente se almacenan muestras de este material formando un banco de semillas, una colección en campo y una colección *in vitro*, este germoplasma podrá manejarse adecuadamente para realizar intercambios o mantener la propia colección (López y Pulido, 2007).

Conservación *in vitro*.

Las técnicas *in vitro* han encontrado su uso en la conservación de plantas amenazadas en los últimos años y es probable que esta tendencia continúe a medida que más especies se enfrentan a riesgo de extinción, un ejemplo de ello es que en el Royal Botanic Garden, Kew están implicados en micropropagación y mantenimiento *in vitro* de más de 3 000 taxa de plantas de todo el mundo, además de que no es el único jardín botánico que realiza estas actividades, sino que hay también en muchos otros países como: Australia, E.U.A, Chile, India y México (Sarasan *et al.*, 2006).

La historia del cultivo *in vitro* inició cuando Schwan y Schleiden en 1837, lanzaron la denominada teoría de la totipotencialidad, la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa (Pierik, 1990). El cultivo de células, tejidos y órganos es un conjunto de técnicas diseñadas para el crecimiento y multiplicación de células en condiciones asépticas en un medio de composición químicamente definido y condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski, 1993).

Las aplicaciones de esta técnica son: modelos de estudio para aspectos fundamentales de la fisiología vegetal, genética y bioquímica; el incremento de la variabilidad genética, la generación de individuos fértiles modificados genéticamente; la obtención de plantas libres de patógenos; la micropropagación

de plantas; la conservación de germoplasma de especies amenazadas; la manipulación de rutas metabólicas de metabolitos secundarios y la bioconversión y manipulación de metabolitos secundarios (Goldhaber, 2008).

Desde la década de los 70's el cultivo de tejidos vegetales ha sido aplicado como una alternativa para la propagación de plantas amenazadas de las cuales existe escaso material biológico y con dificultades en su propagación por métodos tradicionales, tal es el caso de la familia Orchidaceae amenazada de extinción, por que a pesar de contar con millones de semillas sólo el 5% germinan y logran alcanzar el estado adulto por lo que es fundamental utilizar las técnicas de cultivo *in vitro*, para explorar su propagación (Martínez, 1991). En la Tabla 3 se presentan algunos de los trabajos realizados con algunos de los géneros de la familia Orchidaceae utilizando diversos explantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento para diferentes propósitos.

2.8 Regeneración *in vitro*.

En el cultivo *in vitro* de plantas existen dos vías por las que se puede alcanzar la regeneración de plantas, una de ellas es la embriogénesis somática, en donde estos embriones somáticos son semejantes a los embriones cigóticos, los tejidos vasculares están unidos al tejido del explante, son estructuras bipolares con dos meristemas uno de raíz y otro del brote. Otra vía es la organogénesis que se caracteriza por la formación y crecimiento de brotes y el subsecuente enraizamiento. El nuevo brote es una estructura unipolar y su tejido vascular está físicamente conectado al tejido de origen

2.9 Embriogénesis.

La embriogénesis somática (o asexual) es la producción de estructuras pseudoembrionarias a partir de células somáticas, las cuales se desarrollan para formar embriones completamente análogos a los embriones cigóticos. Los embriones somáticos pueden desarrollarse y germinar para formar plantas. La producción de embriones somáticos a partir de cultivos de células, tejidos u órganos puede tener lugar por os vías, por organogénesis directa (sin una fase intermedia de formación de callo) y por la embriogénesis indirecta tras la formación de callo (George y Sherrington, 1984; Ramos, 2006; Su, 2002).

En el año de 1960 se inició la historia de la propagación clonal por el cultivo de tejidos de plantas superiores por los estudios realizados por Morel (1974), al utilizar por primera vez tejidos meristemáticos del género *Cimbidium*. De esta forma se llegó a establecer un sistema de propagación masiva con la formación de masas celulares que denominó cuerpos en forma de protocormos (Protocorm Like Bodies, PLB's), donde cada protocormo asexual, al subcultivarse en medios frescos inductores, presentaba la capacidad de inducir nuevos PLB's por tiempo indefinido, o de regenerar una planta por protocormo en el medio basal adecuado. Es posible la obtención de un billón de plantas en sólo 9 meses de cultivo, ya que a partir de u protocormo asexual que se seccione en cuatro partes, cada fragmento genera 8 protocormos (George y Sherrington, 1984; Morel, 1974; Martínez, 1990; Rangel, 1995)

2.10 Organogénesis.

La organogénesis es una vía de desarrollo en la cuál brotes o raíces han sido inducidos por la diferenciación de una célula o un grupo de células. La

regeneración de plantas *in vitro* por organogénesis generalmente implica la inducción y desarrollo de brotes provenientes del tejido de un explante, seguido por la transferencia hacia un medio diferente para inducir la formación y desarrollo de raíces. Si el brote o raíz es inducido y desarrollado directamente del explante sin haber sufrido una fase de callo es llamado organogénesis directa u organogénesis adventicia. La organogénesis indirecta implica una fase inicial de proliferación de tejido de callo que contiene células competentes de las cuales se originan brotes en gran cantidad, los cuales tendrán que ser individualizados y transferidos a un nuevo medio para su desarrollo y establecimiento (Su, 2002; George y Sherrington, 1984; Ramos, 2006).

Tabla 3. Antecedentes del cultivo de tejidos en la familia Orchidaceae.

Especie	Explante	Medio de cultivo	Regulador de crecimiento/ Concentraciones	Respuesta	Referencia
<i>Bletia urbana</i>	Protocormos	MS y KC	ANA y BA	Formación de brotes	Martínez, 1985.
<i>Calopogon tuberosus</i> var. <i>tuberosus</i>	Semillas	MS y KC	Ausentes	Germinación de semillas	Kauth <i>et al.</i> , 2008.
<i>Catasetum fimbriatum</i>	Meristemo de raíz	Vacin y Went	Ausentes	Formación de PLB's	Peres y Kerbauy, 1999.
<i>Cattleya</i> spp.	Meristemo de raíz	Vacin y Went	2,4-D y ANA	Formación de PLB's	Kerbauy, 1991.
<i>C. aurantiaca</i> , <i>Encyclia chacaoensis</i>	Embriones inmaduros	Hunter, KC, Dalla Rosa y Laneri	Ausentes	Obtención de plántulas	Damon <i>et al.</i> , 2004.
<i>Clowesia warscewiczii</i>	Ápices de raíz	Vacin y Went	2iP	Formación de PLB's	Kerbauy y Maranhão, 1996.
<i>C. mossiae</i>	Tallo	MS	BA y TDZ	Formación de brotes	Torres y Mogollón, 2000.
<i>Cymbidium faberi</i>	Rizomas	MS modificado	ANA y BA	Formación de meristemos	Chen, Liu y Liu, 2004.

Especie	Explante	Medio de cultivo	Regulador de crecimiento/ Concentraciones	Respuesta	Referencia
<i>C. goeringii</i>	Protocormos	MS	BA y ANA	Formación de yemas florales	Zheng y Pang, 2006.
<i>Cypripedium flavum</i>	Embriones maduros	Harvais, 1973	BA y Kin	Formación de meristemos	Yan <i>et al.</i> , 2006.
<i>C. macranthon</i>	Embriones maduros	HP y MS	ANA y BA	Formación de PLB's	Shimura y Koda, 2004.
<i>Dendrobium candidum</i>	Protocormos	MS	BA y ANA	Formación de PLB's	Zhao <i>et al.</i> , 2008.
<i>D. candidum</i>	Semillas	MS	ANA y BA	Obtención de plántulas	Tang , Wang y Zhou, 2005.
<i>D. evaginatum</i>	Hoja	MS	2.4-D, AIA, AIB, ANA, 2iP, BA, Kin, TDZ y Zeatina	Obtención de plántulas	Hsiao <i>et al.</i> , 2005.
<i>D. macrostachyum</i>	Explantos nodales	MS	BA y Kin	Formación de brotes	Pyati <i>et al.</i> , 2002
<i>Disa</i> spp.	Embriones maduros	MS y KC	AIA, AIB, ANA, BA y Kin	Germinación	Thompson, Trevor y Staden, 2006.
<i>Encyclia adenocaula</i>, <i>Cattleya aurantiaca</i>, <i>Euchile citrina</i>, <i>Epidendrum radicans</i>	Embriones	MS	ANA, BA y GA₃	Formación de PLB's	Ávila y Salgado, 2006.
<i>E. adenocaula</i>	Embriones	MS, Vacin y Went, Dalla, Rosa y Laneri K07 y Phytamax	Ausentes	Obtención de plántulas	Ruíz <i>et al.</i>, 2008.
<i>Euchile mariae</i>	Protocormos	MS y KC	ANA y BA	Formación de PLB's	Suárez, 2006.
<i>Habenaria macroceratitis</i>	Embriones maduros	MS, Lucke, Vacin, Lindemann, Went, Malmgreen y KC	BA, Zeatina, Kin, 2-iP	Germinación de embriones y desarrollo de protocormos	Stewart y Kane, 2006.

Especie	Explante	Medio de cultivo	Regulador de crecimiento/ Concentraciones	Respuesta	Referencia
<i>Ipea malabarica</i>	Segmentos de rizomas	MS	BA, KIN, ANA, AIA y AIB	Formación de meristemos y bulbos	Martin, 2003.
<i>Laelia albida</i>	Yemas	KC	BA, ANA y agua de coco	Formación de PLB's	Santos <i>et al.</i> , 2005.
<i>L. anceps y Catasetum integerrimum</i>	Protocormos	MS y KC, Vacin y Went	BA y ANA	Formación de PLB's	Hernández <i>et al.</i> , 2001.
<i>L. autumnalis</i>	Embriones maduros	MS	Ausentes	Obtención de plántulas	Sierra, 2006.
<i>L. speciosa</i>	Hoja jóvenes	MS modificado	ANA y 2iP	Formación de brotes	Barrera, 2006.
<i>Malaxis khasiana</i>	PLB's	MS	Kin, AIA y BA	Obtención de plántulas	Temjensangba y Deb 2006.
<i>Oncidium</i> spp.	Meristemos	MS	2,4-D y TDZ	PLB's	Jheng <i>et al.</i> , 2006
<i>O. cavendishianum</i>	Nudos y entrenudos	MS modificado	ANA y BA	Obtención de plántulas	Cahuantzi, 1998.
<i>O. stramineum</i>	Ápices de tallo	KC	2,4-D y Kin	Formación de PLB's	Rangel, 1995.
<i>O. tigrinum</i>	Protocormos	MS y KC	BA y ANA	Obtención de plántulas	Baltazar, 2004.
<i>Phalaenopsis</i> spp.	Yemas laterales de inflorescencias	MS	Ausentes	Formación de PLB's	Ichihashi, 1992.
	Hoja	Vacin y Went	2,4-D y BA	Formación de PLB's	Ishii <i>et al.</i> , 1998.
<i>Ophrys opuneri</i>	Semillas maduras	CEM	Ausentes	Formación de protocormos	Kitsaki <i>et al.</i> , 2004.
<i>O. delphinensis</i>	Semillas inmaduras	CEM	Ausentes	Callo	Kitsaki <i>et al.</i> , 2004.
<i>Paphiopedilum</i> spp.	Protocormos	MS-50%	2,4-D y TDZ	Formación de PLB's	Lin <i>et al.</i> , 2000.
	Embriones maduros	MS	2-4,D, TDZ, ANA, AIA y Zeatina	Formación de brotes	Hong <i>et al.</i> , 2008.
<i>P. exstaminodium</i>	Embriones maduros	KC, MS, Heller y RE	Ausentes	Obtención de plántulas	Rodríguez, 2000.
<i>Pterostylis sanguinea</i>	Embriones maduros	OMA	Ácido jasmónico	Obtención de tubérculos	Delbeljak <i>et al.</i> , 2002.

Especie	Explante	Medio de cultivo	Regulador de crecimiento/ Concentraciones	Respuesta	Referencia
<i>Vanilla planifolia</i>	Meristemos de raíz y nudos	MS y KC	2,4-D, ANA, AIB, AIA y Kin	Formación de PLB's y Brotes	Philip y Ninar, 1986.
	Nudos	MS	ANA y BA	Obtención de plántulas de múltiple brotación	Rojas, 2007.

2.11 Reguladores de crecimiento.

Las plantas producen hormonas las cuales tienen efecto en el desarrollo y actúan como reguladores de crecimiento. Las hormonas son los mensajeros químicos que median la comunicación intercelular con proteínas celulares específicas llamadas receptores. Antiguamente se pensaba que el desarrollo de una planta se regía por sólo 5 tipos de hormonas: citocininas, auxinas, giberelinas, (hormonas promotoras del crecimiento) etileno y ácido abscísico (hormonas inhibitorias del crecimiento). Sin embargo, ahora hay pruebas de la existencia de otras moléculas señal como por ejemplo brasinosteroides, ácido jasmónico, ácido salicílico, sistemina y poliaminas que tienen una amplia gama de efectos morfológicos en el desarrollo de las plantas (Taiz y Zeiger, 2002).

Los reguladores de crecimiento tienen algunas características en común como (Vidalie, 1980):

- Actuar en dosis muy bajas (desde nM a pM),
- Interactuar con otros reguladores, porque el funcionamiento está determinado por el equilibrio establecido entre ellos e
- Intervienen en múltiples fenómenos fisiológicos, lo que implica varias modalidades de acción.

- Se sintetizan en diferentes lugares y ejercen su efecto en otros sitios distintos a los de síntesis.

Especialmente las auxinas y las citocininas son necesarias para la viabilidad de las plantas. Se ha encontrado que los mutantes que carecen de estas hormonas mueren pronto o no son viables (Taiz y Zeiger, 2002). El descubrimiento de citocininas y el hallazgo de que la combinación de éstas, con las auxinas que regulan la morfogénesis de brotes, fue una piedra angular en el desarrollo de técnicas para la regeneración de plantas a partir de células en cultivo (Martínez, 2003). Por lo la combinación de estas dos hormonas es la más utilizada en el cultivo de tejidos vegetales.

Auxinas.

Las auxinas se definen como sustancias orgánicas que promueven el crecimiento y alargamiento de las células cuando se aplica en bajas concentraciones a segmentos de tejidos vegetales. Además de la mayoría de los casos estudiados de la auxina AIA, hay varias auxinas que se producen en plantas, auxinas naturales en forma libre o conjugadas. El conocimiento de este grupo de auxinas (AIA) proviene de múltiples experimentos llevados a cabo por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales (Normanly *et al.*, 2004).

Durante mucho tiempo se ha estudiado al regulador de crecimiento AIA debido a que es un importante regulador de los procesos de desarrollo en las plantas con semillas. Por ejemplo, actúa como acoplador de señales intercelulares, estímulos ambientales para el crecimiento de las respuestas en fototropismo y gravitropismo (Cooke *et al.*, 2002).

Los niveles de auxinas varían dramáticamente en todo el cuerpo de la planta, el gradiente de formación es un componente central de su acción. En

consecuencia las plantas han evolucionado en intrincadas y cambiantes rutas resultado de la adaptación para mantener los niveles de auxina como respuesta a las condiciones ambientales y de desarrollo. Las rutas que regulan y mantienen los niveles de auxina se conoce como homeostasis de auxina, específicamente la biosíntesis, inactivación, transporte y conversión. El estudio de la homeostasis de auxina se dirige a la comprensión de los mecanismos mediante los cuales las plantas han de administrar la hormona disponible en un momento, lugar y forma en que el medio ambiente las induzcan (Normanly *et al.*, 2004)

La estructura química de las auxinas consiste de un núcleo indol, cuya fórmula condensada es $C_{10}H_9O_2$. Las auxinas intervienen en numerosos fenómenos fisiológicos, dependiendo de su concentración y de sus interacciones con otros reguladores de crecimiento. Los efectos observados son:

- 1) Una clara acción sobre el crecimiento celular. Este efecto se debe al aumento consecutivo en la plasticidad de la pared celular y a la penetración de agua en la célula; disminuyendo la resistencia de la pared y provocando el alargamiento de la célula.
- 2) La modificación de la permeabilidad de la membrana, que se expresa en un rechazo de iones y provoca una acidificación responsable de la disminución de la resistencia de la pared y la absorción de iones K^+ .
- 3) La acción general sobre el metabolismo, principalmente en la síntesis de RNA ribosómico.
- 4) La estimulación de la división celular, que conduce a la formación de callo.
- 5) La acción en la síntesis de etileno a partir de una cierta concentración; el etileno vuelve a intervenir para regular las concentraciones de auxina al menos a nivel de transporte.
- 6) La acción en las reacciones de crecimiento (tropismos) y en las correlaciones entre órganos, en especial en el fenómeno de dominancia apical.

- 7) El efecto que retarda la caída de las hojas o los frutos.
- 8) Promueve la diferenciación vascular.
- 9) Promueve el desarrollo de fruto.
- 10) Induce la formación de raíces.

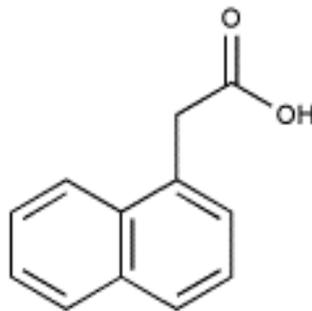
Estos efectos pueden deberse a la acción únicamente de la auxina. Las concentraciones óptimas son diferentes para cada tipo de acción; este valor óptimo puede ser desplazado en función de las concentraciones de otros reguladores (Vidalie, 1980).

Se sabe que las auxinas participan en casi todos los aspectos de crecimiento y el desarrollo de las plantas y por lo tanto son las hormonas vegetales más estudiadas. Los sitios de síntesis son los meristemos apicales, frutos en desarrollo y hojas. Hay al menos dos rutas de biosíntesis, una es dependiente del precursor de L-triptófano (PTR) y la segunda es independiente de éste. El citocromo p450 se expresa en hojas jóvenes, el cual es uno de los sitios sugeridos de síntesis de la auxina. El gen *YUCCA* que codifica a una flavina monooxigenasa, participa en la ruta de la biosíntesis de auxinas en la ruta dependiente de L-triptófano, donde convierte la triptamina en N-hidroxitriptamina. Los genes *YUCCA* se expresan generalmente en meristemos, primordios jóvenes, tejido vascular y órganos reproductivos, sugiriendo que son sitios de síntesis de las auxinas. La aldehído oxidasa es probable que participe en el último paso de la producción de auxinas donde el indolacetaldehído se convertirá en AIA. La auxina sintetizada es transportada a los tejidos en donde se desencadena una cascada de señalización para las respuestas de desarrollo (Woodward y Bartel, 2005; Benjamins y Scheres, 2008).

Las auxinas más utilizadas en la propagación de orquídeas a partir de las técnicas de cultivo de tejidos son: el ácido indolacético (AIA) y productos sintéticos tales como el del ácido naftalenacético (ANA) (Figura 7), el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D). Por lo general, el

tipo de auxina y su concentración son resultado de ensayo y error, es decir, que las auxinas pueden diferir entre sí tanto cualitativa como cuantitativamente. Esto significa que los efectos de una auxina en una determinada especie pueden ser diferentes de los de otras auxinas. También significa que las auxinas pueden tener efectos diferentes por ejemplo en el caso de los géneros *Cattleya*, *Cimbidium*, *Dendrobium*, *Encyclia*, *Euquile*, *Laelia*, entre otros, en la germinación de semillas, en la formación de PLB's, en la formación de plántulas, etc. (Arditti y Ernst, 1993).

Por otra parte, debido a que existen auxinas sintéticas y naturales su respuesta y acción es diferente, cabe resaltar que las sintéticas por lo general son más estables y permanecen activas durante más tiempo que las de origen natural. La mayoría de las auxinas no son destruidas por el autoclave de 110 a 120 °C por 50-60 minutos, sobre todo si el pH no es ácido sin embargo, si son destruidas por la luz (Arditti y Ernst, 1993).



**Figura 7. Estructura química de ANA
(Ácido naftalenacético)
(Vidalie, 1980).**

Citocininas.

Las citocininas desempeñan un papel importante en diversos procesos de regulación de crecimiento y desarrollo de las plantas, como el desarrollo floral, el desarrollo y diferenciación de los cloroplastos, el metabolismo autotrófico, la expansión de hojas y cotiledones, la interrupción de dominancia de yemas, la promoción de la división celular, retardar la senescencia, regular la dominancia apical y la transmisión de señales para la nutrición (Goldhaber, 2008). La kinetina

(Figura 8) fue la primera sustancia identificada como citocinina, pero no se ha encontrado naturalmente en las plantas (Sakakibara, 2004)

El descubrimiento de la kinetina es importante porque ha demostrado que la división celular puede ser inducida por una simple sustancia química. Además sugirió que las moléculas de origen natural con estructuras similares a las de la kinetina, regulan la actividad de división celular dentro de la planta. El sitio de síntesis de las citocininas son: los meristemos de la raíz aunque también se han encontrado en hojas jóvenes y en embriones inmaduros (Taiz y Zeiger, 2002).

Las citocininas son adeninas sustituidas, de las que se conocen dos compuestos endógenos: la zeatina y la iso-penteniladenina (2iP) y compuestos de síntesis de los cuales los dos más utilizados son: kinetina (6 furfuryl-aminopurina) y benciladenina (BA). Las citocininas son muy activas y presentan numerosas acciones como por ejemplo:

- Un efecto en la división celular. En este proceso son indispensables pero ineficaces en ausencia de auxinas; las dos se complementan, las auxinas favorecen la duplicación de ADN y la citocinina hace posible la separación de los cromosomas, un papel muy claro en la organogénesis en la que brindan estimulación considerable en la formación de yemas,
- En contraste, son antagónicas en la rizogénesis, favoreciendo por una parte la síntesis de proteínas (se han observado citocininas en la composición de los RNA de transferencia que participan en estas síntesis) y
- Protegen a los metabolitos de las acciones de las enzimas hidrolíticas (Vidalie, 1980).
- Promueven la expansión celular.

- Estimula el crecimiento de yemas laterales y rompe dominancia apical.
- Algunas promueven la apertura de estomas.
- Promueven la movilización de nutrientes.

Al igual que las auxinas, la elección de las citocininas y su concentración se basa en los resultados empíricos. Los cambios deben evitarse. Los efectos de diferentes citocininas y sus concentraciones varían al igual que las de las auxinas. Experimentos con soluciones acuosas de kinetina, zeatina, e isopentenil adenosina han demostrado que no se encuentran afectados cuando se usa la autoclave a 120° C por una hora a un pH bajo (Arditti y Ernst, 1993).

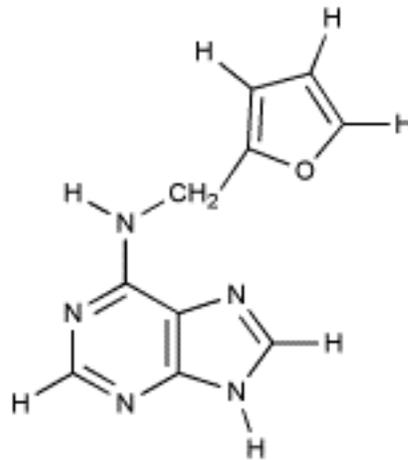


Figura 8. Estructura química de la kinetina (Vidalie, 1980).

Auxinas y citocininas en el ciclo celular.

Tanto las auxinas como las citocininas intervienen en la regulación del ciclo celular. La auxina aumenta la expresión de una proteína clase *cdc2* (ciclina dependiente de quinasa). Aunque la auxina es suficiente para inducir su expresión, la actividad catalítica de *cdc2* como la de la quinasa se incrementa cuando los explantes son tratados con citocininas. Este es el primer ejemplo de una sinergia de un mecanismo de interacción de auxina-citocinina en el que la citocinina es necesaria para activar una proteína expresada en respuesta a la auxina. En protoplastos de hoja de tabaco la expresión del gen (*GUS*) que codifica para *cdc2*, revela que el promotor de éste es inducible por auxinas en una mayor proporción que las citocininas. Ambos reguladores de crecimiento pueden influir en la transcripción de manera sinérgica del gen *cdc2-quinasa* (Coenen y Lomax, 1997).

La transducción de señales en las que intervienen las citocininas (hormona-planta) se lleva a cabo en forma similar a la de otros seres vivos. El primer paso consiste en su unión de esta hormona a una proteína de alta afinidad por el receptor, que resulta en la cambio conformacional. Esto entonces pone en marcha una transducción de señales en cascada, ya sea a través de una cadena de fosforilación y de desfosforilación, por la unión de nucleótidos de guanina o por la hidrólisis, que finalmente llevan a cambios en la transcripción de un conjunto específico de genes (Mok y Mok, 2001).

Respecto a la acción molecular de las citocininas, se ha encontrado que hay receptores putativos receptor-señal en la transducción de genes como *CKI1*, *ARR*, y *GCR1*, los cuales se encuentran involucrados en el ciclo celular y en la formación de meristemos. Los genes candidatos relacionados con el ciclo celular son *CycD3* y *cdc2*. Algunos estudios han demostrado que la ciclina $\delta 3$ es altamente dependiente de citocininas además de que la sacarosa es necesaria

para la división del protoplasto y al parecer es sinérgica al potenciar el efecto de las citocininas en la expresión de la ciclina $\delta 3$. Se ha concluido que esta ciclina es un factor necesario para activar a *cdc2 quinasa*. Así, una vez que las células se han convertido en competentes para dividirse a causa de la auxina inducida por la expresión de una quinasa parecida a *cdc2*, la expresión de la citocininas inducidas por la ciclina $\delta 3$, podrá permitir la entrada al ciclo mitótico (Coenen y Lomax, 1997).

3) JUSTIFICACIÓN.

La destrucción de los diferentes hábitats es la causa principal de la desaparición de especies en todo el planeta, en un caso muy particular el deterioro del bosque de pino encino en México es, entre otros, motivo de que la especie *E. adenocaula* se encuentre catalogada como amenazada por la NOM-059-ECOL-2001. Además el hecho de que las orquídeas posean flores hermosas es causa de saqueos constantes, lo cual entre otras causas contribuye a reducir su población afectando su sobrevivencia.

Por otra parte, las especies del género *Encyclia* tienen diferentes características favorables para el hombre, por ejemplo es usada desde épocas prehispánicas para curar heridas, para obtener mucílagos para la elaboración de adhesivos, mordentes de pigmentos para el arte plumario y recientemente hay estudios realizados sobre *E. michuacana* donde se han encontrado metabolitos secundarios con características relajantes y antiespasmódicas.

Es importante resaltar que en el género *Encyclia* existen metabolitos secundarios con actividad biológica, para lo cual se tiene que iniciar un plan de recuperación para *E. adenocaula* que incluya trabajos de exploración fitoquímica, farmacológica, ecológica y etnobotánica, por mencionar algunos.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que se está usando como un medio para lograr la multiplicación rápida y aséptica de individuos que se encuentran en poblaciones amenazadas, a fin de iniciar su conservación. Además, se ha demostrado que esta técnica ha sido efectiva en algunas especies de la familia Orchidaceae, debido a que la propagación tradicional lleva más tiempo, por que generalmente los ciclos de vida tan largos resultan una problemática debido a la baja germinación de sus semillas y sobrevivencia de las plántulas. Cabe resaltar que existen pocos trabajos reportados sobre *E. adenocaula* que describan su propagación *in vitro* y *ex vitro* a partir de semillas, flores, raíces y hojas.

En general, es importante el rescate de especies que se encuentran en todas las categorías de riesgo debido a que su desaparición lleva consigo la desaparición de otras especies vegetales y animales.

4) HIPÓTESIS.

Si se ha demostrado que el cultivo de tejidos vegetales es una herramienta efectiva al emplearla conjuntamente con reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) en la recuperación de especies que pertenecen a la familia Orchidaceae, entonces será igualmente eficaz para la regeneración de *Encyclia adenocaula*, evaluando diferentes concentraciones de ANA y Kin.

5) OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL.

- Lograr la regeneración *in vitro* de *Encyclia adenocaula* a partir de explantes de tejidos somáticos, como primer paso para su conservación

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Establecer las condiciones de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Encyclia adenocaula*.
- Inducir la morfogénesis de *Encyclia adenocaula* a partir de explantes de hoja, tallo y raíz.
- Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en las combinaciones: Kin/ANA (Kin: 0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L; ANA: 0.1, 0.5, 1 mg/L) en la formación de PLB'S para el crecimiento de *Encyclia adenocaula in vitro*.

6) MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología, bajo la asesoría técnica del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila. Para el cumplimiento de los objetivos se siguió la ruta crítica presentada en la figura 9.

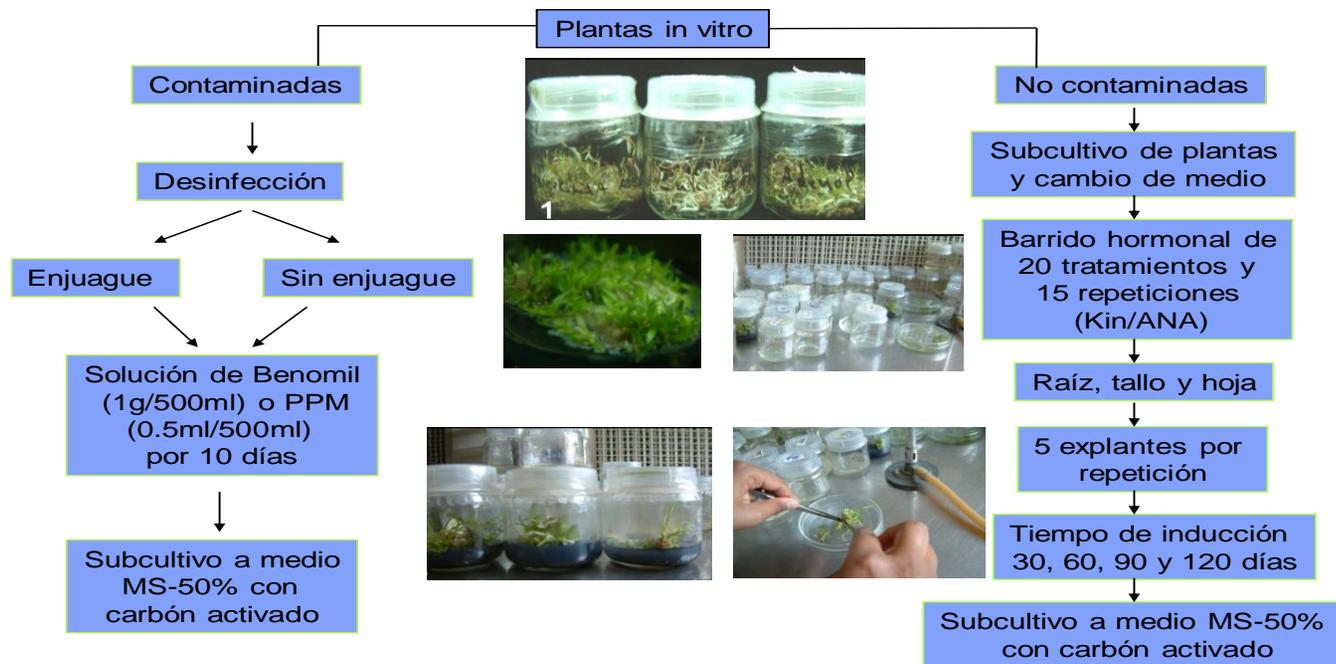


Figura 9. Metodología para la regeneración *in vitro* de *E. adenocaula*

6.1 Material biológico.

El material biológico a partir del cuál se llevó a cabo el presente estudio consistió en un lote de plantas *in vitro* de *E. adenocaula* (Figura 10.A-B) los cuales fueron obtenidos de semillas (de frutos maduros) germinadas *in vitro* y conservadas en el laboratorio por medio de subcultivos periódicos, aproximadamente cada seis meses durante aproximadamente dos años en medios de cultivo MS-50% que no incluyeron reguladores de crecimiento. Del lote anterior el 50% de las plantas se encontraban contaminadas con hongos y bacterias. (Figura 10.C).

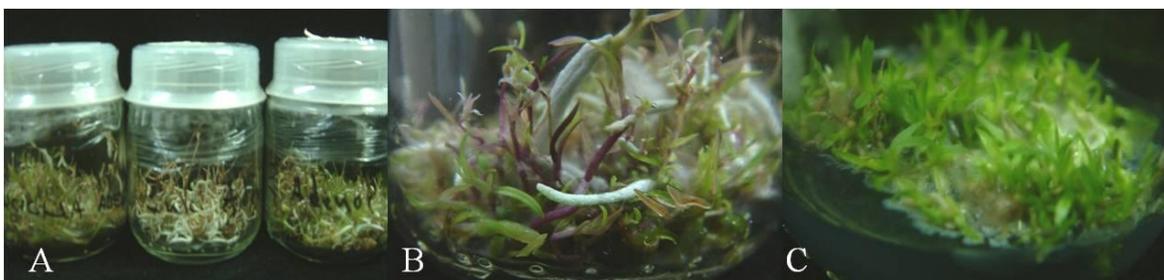


Figura 10. Plantas iniciales de *E. adenocaula*. A) Acercamiento cultivo inicial de *E. adenocaula*. B) Cultivo inicial de *E. adenocaula* contaminado por hongos. C) Cultivo de *E. adenocaula* contaminada por bacterias.

6.2 Elaboración del Medio de cultivo.

Para el barrido hormonal de *E. adenocaula* se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), modificado al 50% de sales minerales y 3% de sacarosa (Apartado 1). El pH del medio se ajustó a 5.7 mediante el uso de soluciones de NaOH y HCl al 0.5 y 0.1 N. Se agregó el gelificante (Gelrite 3 g/L). Por último, se procedió a la esterilización del medio en un autoclave a 121°C y 1.5 Kg/cm² durante 17 minutos. Se realizaron 20 tratamientos y 15 repeticiones utilizando los reguladores de crecimiento Kin y ANA (Tabla 4). Se sembraron 5 repeticiones de cada explante (a partir de las plantas subcultivadas) por cada frasco en 20 tratamientos, lo cual se llevó a cabo cortando cada explante con un tamaño aproximado de 0.5-1 cm² (Figura 11.B-D y Figura 12) colocándolos sobre el medio

de cultivo. Se realizaron mediciones de todos los explantes sembrados a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio de los tratamientos.

En un cuarto de incubación con una temperatura de 21°C y un fotoperiodo de 16 h luz (fluorescente 1000-2000 luxes) y 8 h de oscuridad.

6.3 Subcultivo de *E. adenocaula* (plantas no contaminadas).

Se subcultivó el material vegetal a medio MS al 50% con carbón activado (1 g/L) en frascos con capacidad de 100 ml colocando 25 ml de solución por cada uno (Figura 9).

6.4 Desinfección de las plantas contaminadas de *E. adenocaula*.

En la campana de flujo laminar, con ayuda de unas pinzas de disección, se sacaron las plantas de los frascos y se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente, la mitad de las plantas se sumergieron en una solución de PPM (0.5 ml/49 ml de agua destilada estéril) y la otra mitad en una solución con benomil (1 g /500 ml). Por último, se colocaron en una plataforma de agitación orbital a 90 r.p.m. por 10 días a 21°C, con un fotoperiodo de 16 h luz (fluorescente 1000-2000 luxes) y 8 h de oscuridad.

Una vez transcurridos los 10 días las plantas se colocaron en medio MS-50% con carbón activado (25 ml por cada frasco con capacidad de 100 ml) en condiciones estériles. Las plantas se incubaron en las condiciones ya mencionadas (Figura 9).



Figura 11. Materiales y cortes de los explantes *E. adenocaula*. A) Material de siembra de *E. adenocaula in vitro*. B) Material vegetal de donde se tomaron los explantes de hoja. C) Cortes de los explantes de raíz en *E. adenocaula*. D) Cortes de explante de hoja de *E. adenocaula*.

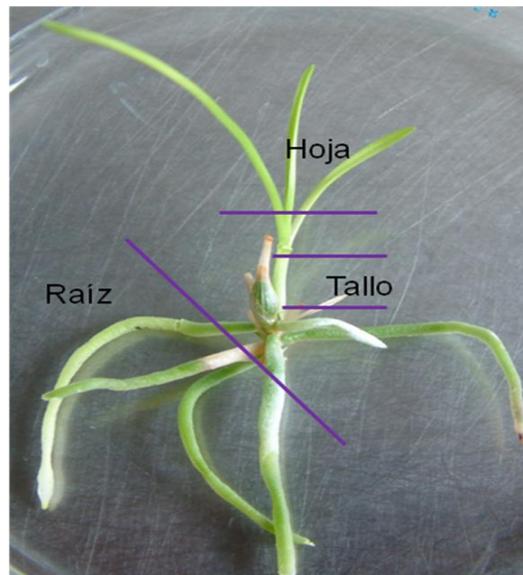


Figura 12. Explantes de *E. adenocaula*.

Tabla 4. Tratamientos hormonales utilizados para la inducción morfogénica de explantes de *E. adenocaula*

ANA \ Kin	0	0.5	1	2	3 mg/L
0	1	2	3	4	5
0.1	6	7	8	9	10
0.5	11	12	13	14	15
1 mg/L	16	17	18	19	20

7) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Uso de PPM y Benomil para combatir la contaminación.

En los estudios de cultivo de tejidos vegetales debido a que el medio de cultivo está adicionado con sacarosa y nutrientes hacen un medio rico y propicio para que sea colonizado por microorganismos, es por ello que la contaminación por hongos y bacterias representa un problema mayor si no se logra controlar a tiempo. Para lo cuál se han llevado a cabo diferentes estudios probándose productos comerciales que son eficientes para combatir la contaminación y fitotoxicidad (Paul et al., 2001; Tynan et al., 1993).

En este trabajo se utilizaron benomil y PPM para eliminar la contaminación fúngica y bacteriana del material vegetal. Realizando un enjuague con agua destilada estéril antes de colocarlos en dichas soluciones para retirar colonias evidentes de microorganismos (en la mitad del lote contaminado a tratar) lo cual resultó en una mayor contaminación, que es posible que se haya debido a causas de manipulación de los explantes, es decir que se debió al un descuido en la asepsia.

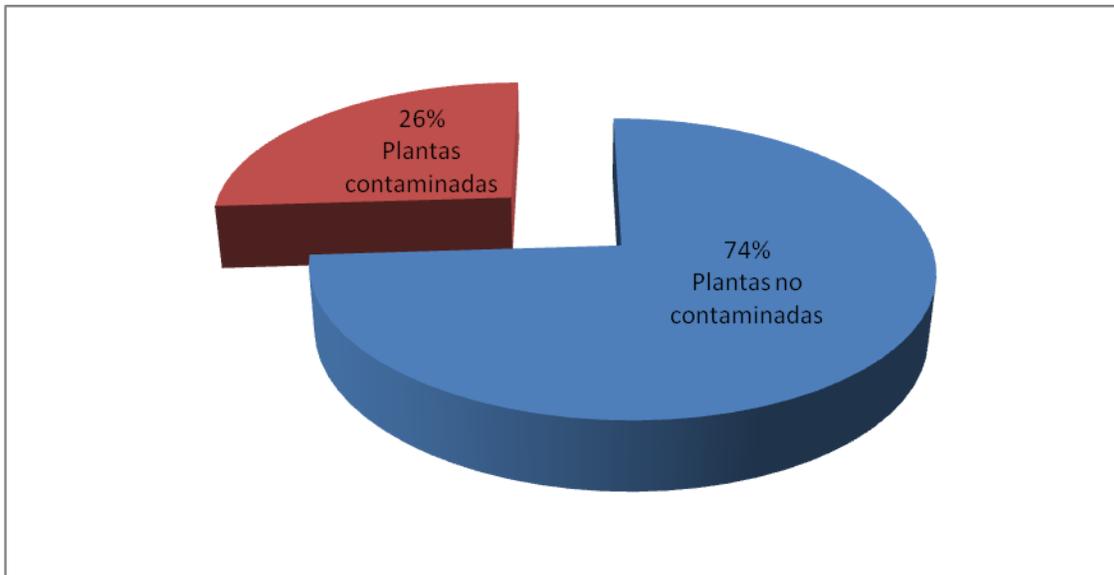
El benomil pertenece al grupo de los bencimidazoles y es un fungicida de amplio espectro sistémico, esto es, que es traslocado por el sistema vascular de la planta desde el punto de penetración a áreas de alta transpiración como hojas en desarrollo. El movimiento acropétalo tiende a concentrar el fungicida en las puntas y márgenes de las hojas, sitios de mayor susceptibilidad por el ataque de los hongos. Inhibe la mitosis al unirse a la tubulina, de esta manera impide la división celular evitando el crecimiento y desarrollo del hongo, actúa interfiriendo en la síntesis del ADN y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del ADN al ARN. Es un fungicida de amplio espectro para el control de Ascomicetos, Deuteromicetos y Basidiomicetos (McCarroll *et al.*, 2002; Ramos, 2006).

Ramos (2006) reportó que mediante el uso de benomil en una solución de 1g/L (por 20 min.) pudo combatir la contaminación por hongos en semillas de melón (*Cucumis melo* L.). Sin embargo, en el presente trabajo se hizo uso de una solución de benomil dos veces más concentrada (2 g/L) que la de Ramos (2006) y la exposición de plantas en este tratamiento tuvo una duración de 10 días, lo cuál puede ser la causa de que el benomil haya sido letal al 100%.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Shields y cols. (1984) y Hauptmann y cols. (1985) quienes utilizaron benomil (6.25-50 mg/L), para inhibir el crecimiento de *Penicillium* spp. en cultivos celulares en suspensión y protoplastos de *Nicotiana tabacum*, *Datura innoxia*, *Daucus carota*, *Glycine canescens* y *Solanum tuberosum*. Éste también ha sido evaluado en diferentes tejidos de *N. plumbaginifolia* (en cultivos de raíces, protoplastos, callo y en la germinación de semillas) contra diversas especies de hongos. Se ha reportado que el benomil a concentraciones mayores de 100 µg/ml tiene una buena actividad antifúngica (Shields *et al.*, 1984). Sin embargo, la concentración de benomil y/o el tiempo utilizados en el presente estudio fue más alta, lo cual pudo ser la causa de que un 100% de las plantas tratadas hayan muerto. Además de que el uso de benomil no evitó la contaminación ya que no se obtuvieron plantas asépticas después de su uso. A partir del uso del PPM se logró desinfectar 76% de plantas contaminadas de las cuales se usó 20% para la regeneración de *E. adenocaula* a partir de explantes de tallo.

El PPM es un biocida y fungicida de amplio espectro utilizado para el cultivo de tejidos vegetales ya que previene la germinación de esporas y en concentraciones mayores elimina contaminantes endógenos de explantes. El PPM tiene como blanco ciertas enzimas esenciales en el ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones (www.ppm4plant-tc.com). El PPM se ha recomendado como un buen desinfectante, ya que evita la contaminación en los tejidos vegetales, y no reduce el crecimiento celular, como fue observado en cultivos de *Taxus* (Michael y Roberts, 2005). El uso del PPM en este trabajo dio como resultado que un 74% de las plantas tratadas se lograran establecer asépticamente (Gráfica 1). Se ha reportado el uso de concentraciones más altas

de benomil que de PPM. Sin embargo, el PPM tiene un alto porcentaje de toxicidad (0.025%) (Paul *et al.*, 2001). Sin embargo, estos resultados son contrarios a los que se observaron en el presente trabajo debido a que el benomil resulto ser altamente tóxico y los resultados a partir del uso de PPM sí permitieron el establecimiento de plantas asépticas sin presentar oxidación ó muerte celular.



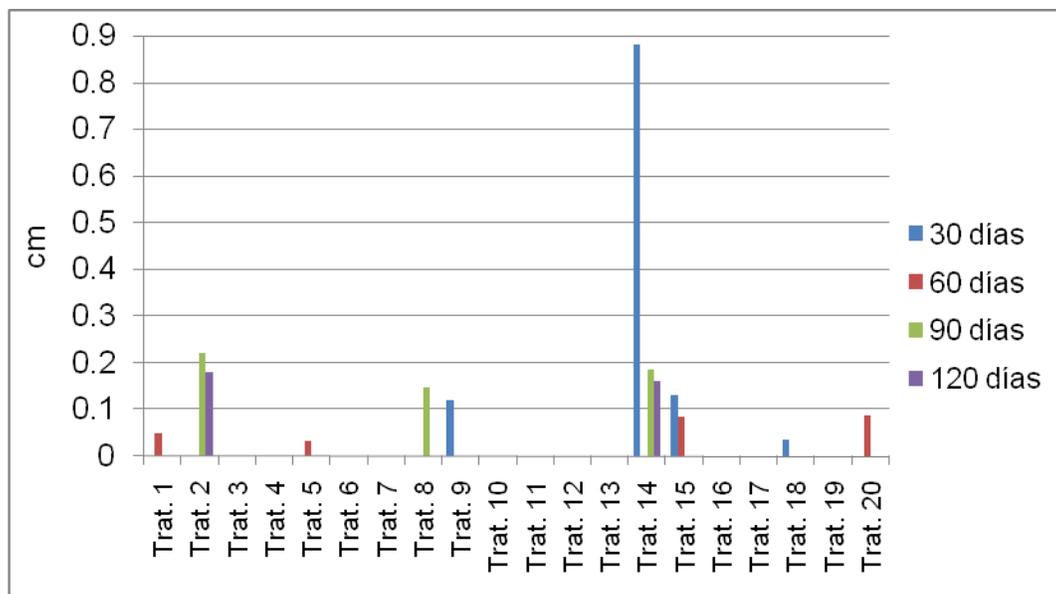
Gráfica 1. Eficiencia del PPM (Plant preservative mixture).

7.2 Incremento de la longitud de los explantes de hoja, raíz y tallo.

Los valores del incremento de la longitud se obtuvieron al medir cada explante sembrado en cada tratamiento con fines de reportar la capacidad de respuesta evidente del incremento en cm.

El incremento en la longitud en los explantes de hoja fue mínimo al compararse con los explantes de tallo y raíz. El mayor incremento en promedio para el explante de hoja se observó a los 30 días del inicio del tratamiento (Gráfica 2) y correspondió al tratamiento 14 (Kin/ANA 2:0.5 mg/L). A los 60 días del inicio de los cultivos, los tratamientos 15 (Kin/ANA 3:0.5 mg/L) y 20 (Kin/ANA 3:1 mg/L) son los

que tuvieron un mayor incremento, a los 90 días los tratamientos 2 (Kin 0.5 mg/L) y 14 (Kin/ANA 2:0.5 mg/L) obtuvieron la mayor longitud. Sin embargo, a los 120 días hubo una reducción en el incremento de longitud en casi todos los tratamientos del explante de hoja, solamente en los tratamientos 2 (Kin 0.5 mg/L) y el 14 (Kin/ANA 2:0.5 mg/L) hubo un incremento mínimo (Apartado 1, tabla 5). Tal vez este decremento en el tamaño de los explantes al paso del tiempo se debe al agotamiento de algún componente del medio de cultivo ya que no se realizaron subcultivos a lo largo de los 120 días de duración de los tratamientos, incluso las hormonas tienden a ser destruidas en la presencia de luz. En el trabajo de Martínez (1985) se observó también un decremento del tamaño de los explantes y fue atribuido a la oxidación que produce el corte en los tejidos antes de ser colocados en un medio de cultivo.



Gráfica 2. Longitud de los explantes de hoja a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio del tratamiento.

En el caso de la raíz, a los 30 días del inicio del tratamiento (Gráfica 3) se observó que el mayor incremento en longitud (Apartado 1, Tabla 6) se obtuvo en los tratamientos 1 (control) y 12 (Kin/ANA 0.5:0.5 mg/L). A los 60 días del inicio del tratamiento hubo un incremento mayor a 1 cm en los tratamientos 3 (Kin 1 mg/L) y 12 (Kin/Ana 0.5:0.5 mg/L) y a los 90 días se obtuvo el mayor incremento en

longitud en los tratamientos 3 (Kin/Ana 1:1 mg/L) y 8 (Kin/Ana 1:0.1 mg/L). Finalmente a los 120 días del inicio de los tratamientos nuevamente el tratamiento 2 (Kin 0.5 mg/L) y 14 (Kin/ANA 2:0.5 mg/L) fue dónde se mostró el mayor incremento en la longitud. Es notorio que este incremento no sólo se presenta en un determinado tratamiento, por lo que quizás esto se debió a que se trata de distintos explantes y a una concentración distinta, lo cual les favoreció de manera distinta (Taiz y Zeiger, 2002). Las citocininas son un factor esencial para la división celular, y tienen un fuerte efecto sobre la diferenciación celular. Se ha reportado ampliamente en plantas de tabaco que la división celular las citocininas mantenían una relación con una auxina. Al mismo tiempo Skoog (1971) mostro que cada fenómeno puede ser inducido únicamente con un balance apropiado de cada uno de los reguladores (Baltazar, 2004). En la Figura 12.C se puede observar claramente el incremento de la longitud de la raíz en el tratamiento 2. Este incremento de 5 cm aproximadamente, también se observó en el tratamiento 17 (Figura 13.C, 13.F-H, 15.G-H y 15.J).

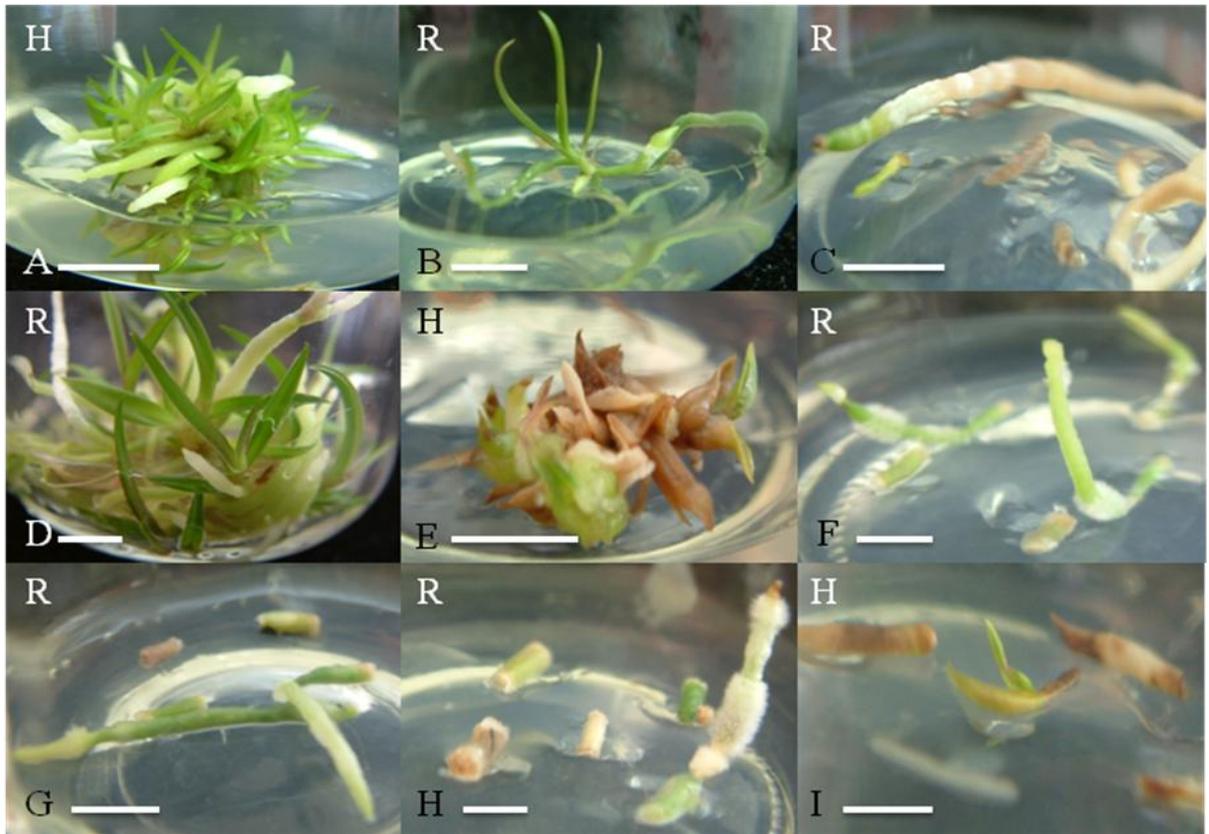
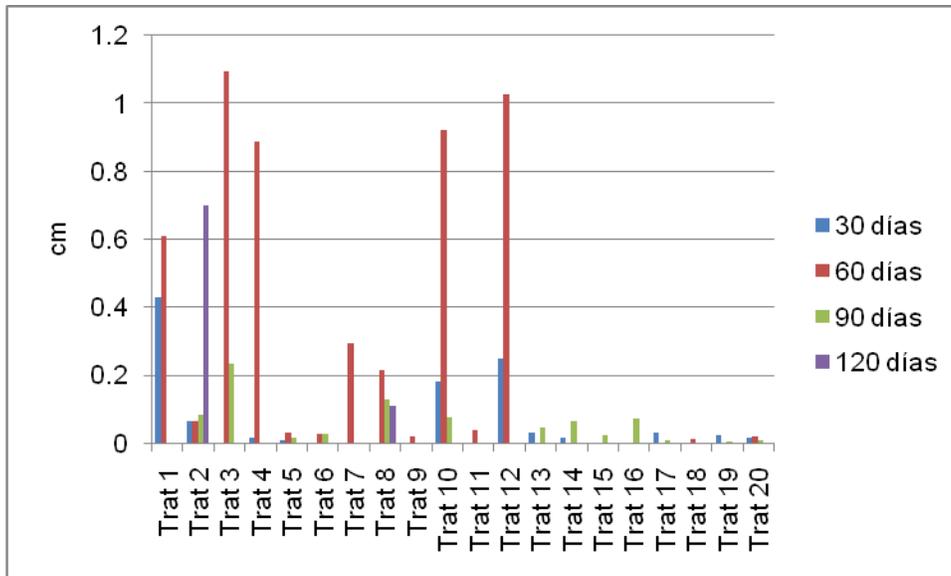


Figura 13. Respuesta de los explantes de raíz y hoja.

A) Explante de hoja del tratamiento 2 a los 90 días del inicio del tratamiento. B) Explante de raíz del tratamiento 2 a los 90 días del inicio del tratamiento. C) Explante de raíz del tratamiento 2 a los 90 días del inicio del tratamiento. D) Explante de raíz del tratamiento 1 a los 90 días del inicio del tratamiento. E) Explante de hoja del tratamiento 15 a los 60 días del inicio del tratamiento. F) Explante de raíz del tratamiento 17 a los 60 días del inicio del tratamiento. G) Explante de raíz del tratamiento 17 a los 60 días del inicio de tratamiento. H) Explante de raíz del tratamiento 19 a los 60 días del inicio del tratamiento. I) Explante de hoja del tratamiento 5 a los 60 días del inicio del tratamiento. Barra = 1 cm. H = Hoja. R = Raíz (esquinas superiores izquierdas)



Gráfica 3. Longitud de los explantes de raíz a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio del tratamiento.

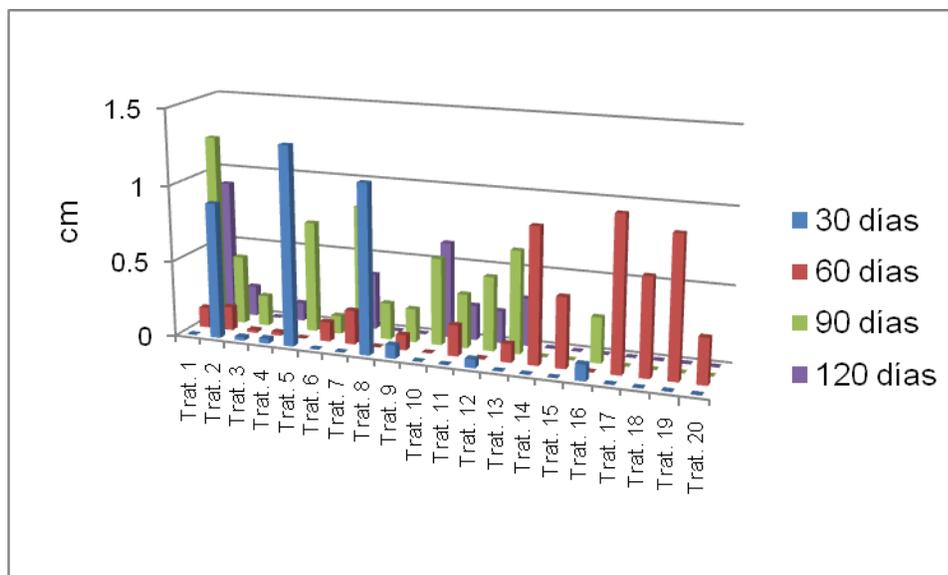
En cuanto al tallo (Gráfica 4) se pudo observar que a los 30 días del inicio del tratamiento el mayor incremento se presentó en los tratamientos 5 (Kin 3 mg/L) y 8 (Kin/ANA 1:0.1 mg/L) (Apartado 1, tabla 7), mientras que a los 60 días del inicio del tratamiento, los tratamientos en donde hubo mayor incremento fue en el 17 (Kin/ANA 0.5:1 mg/L) y el 19 (Kin/ANA 2:1 mg/L). A los 90 días, el tratamiento 1 (control) y el 7 (Kin/ANA 0.5:0.1 mg/L) también presentaron un incremento considerable y a los 120 días el mayor incremento se presentó en los tratamientos 1 (control) y 10 (Kin/ANA 3:0.1 mg/L). De esta manera, se puede decir que el tallo fue el explante que tuvo el mayor incremento en longitud en distintos tratamientos hormonales, seguido de la raíz y la hoja. Cada uno de los explantes anteriores posee características específicas que dependen de sus funciones, el tallo tiene la función (entre otras) de producir nuevos tejidos lo cual tiene que ver con que haya tenido un incremento mayor al registrado en la raíz y la hoja.

En las Gráficas 2-4 se observó que conforme va pasando el tiempo hubo una disminución de los incrementos de la longitud de los explantes, la cual es inversamente proporcional al tiempo. Esto puede deberse a que las hormonas

tienen un efecto de acción que ocurre en un determinado tiempo. Además de que al no haberse realizado subcultivos a lo largo de los 120 días de inducción es muy posible que se hayan agotado los nutrientes del medio de cultivo así como la fuente de carbono (sacarosa).

Así mismo se pudo observar en las gráficas mencionadas anteriormente, que hubo un aumento en la longitud del explante de hoja en el tratamiento 14 (Kin/ANA 2:0.5 mg/L) a lo largo de los 120 días de duración de los tratamientos. Por otro lado para los explantes de raíz los tratamientos 10 (Kin/ANA 3:0.1 mg/L) y 12 (Kin/ANA 0.5:0.5 mg/L) a lo largo de los 120 días de duración de los tratamientos. Éstos presentaron una combinación de ambos reguladores de crecimiento (Kin/ANA) excepto el 3 que sólo contenía Kin. Lo que se explica por las acciones estimuladoras de la división celular tanto de ANA (Strasburger *et al.*, 2004) como la función de regular la división celular de Kin (Goldhaber, 2008).

Sin embargo, en el caso del explante de tallo, el incremento de su longitud sucedió en más tratamientos los cuales podían contener o no la combinación de ambas hormonas, esto quizás porque el tallo contiene varios segmentos nodales, lo que indica la presencia de zonas meristemáticas al igual que las hojas y las raíces sin embargo, al realizar el corte de tallo se retiraron la hojas y raíces para asegurar que se encontraran presentes las zonas de constante división celular (Jacques, 1988) y contaba por lo anterior con un mayor volumen lo que se puede interpretarse en una mayor cantidad de zonas meristemáticas. Además, Vieira y Fernandes (2007) reportaron que con la especie *Cattleya x mesquithae* la ausencia de luz fue determinante para el alargamiento de tallo en ausencia de reguladores de crecimiento. La acción de la citocinina en el tallo es específica dado que éstas estimulan la elongación del tallo en respuesta a los días largos (Olivera, comunicación personal)



Gráfica 4. Longitud de los explantes de tallo a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio del tratamiento.

Está comprobado que las citocininas promueven la formación de meristemas, las altas concentraciones, inhiben la elongación de zonas meristemáticas. Las plantas de *Dictamus albus* tratadas con BA en altas concentraciones, no presentaron formación de meristemas apicales, mientras que las plantas tratadas con bajas concentraciones se caracterizaron por ser más grandes y presentaron hojas saludables de color verde intenso (Hartmann *et al.*, 2002).

Respecto a lo anterior, es importante resaltar que sucedió un evento similar en el presente estudio, ya que en los tratamientos con las concentraciones de citocinina más altas (3 mg/L) hubo poco o nulo incremento de longitud; por ejemplo, para la hoja hubo nulo o poco crecimiento en tanto en el tratamiento 5 (3:0 mg/L Kin/ANA), como en el 10 (3:0.1 mg/L Kin/ANA. Fue común observar que a concentraciones elevadas de auxinas y citocininas hayan efectos desfavorables, sin embargo la información acerca de los efectos de las interacciones hormonales varían de acuerdo a los reguladores de crecimiento utilizados sus concentraciones y las especies bajo estudio (Arditti y Ernst, 1984 citado por Baltazar, 2004)

7.3 Brotes obtenidos a partir de los explantes de hoja, raíz y tallo.

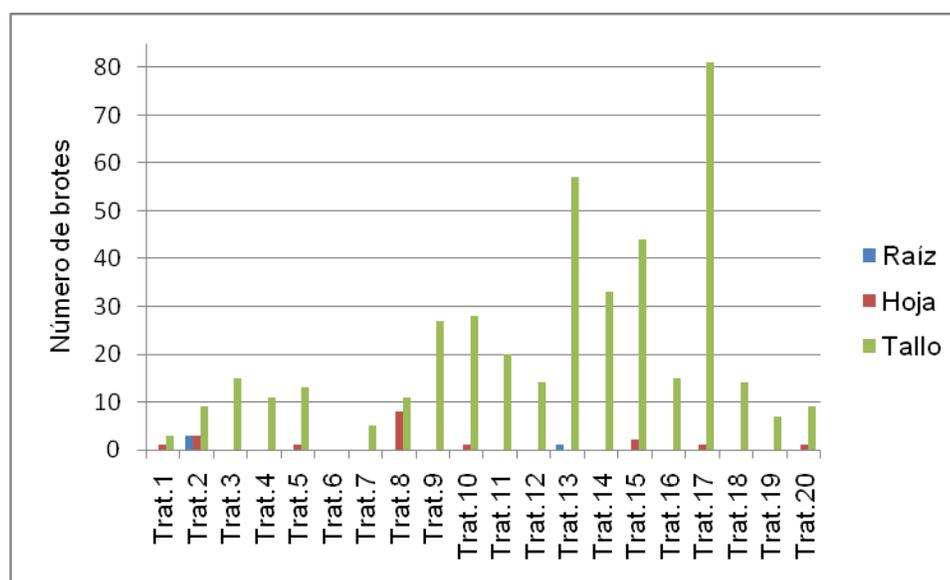
En cuanto a los resultados a partir de los explantes de hoja, los mejores tratamientos para la formación de brotes fueron el tratamiento 2 (0.5 mg/L Kin) y el 8 (1:0.1 mg/L Kin/ANA). El explante de hoja dio mejores resultados en comparación con el de raíz ya que el total de brotes obtenidos a partir de organogénesis directa fue de 18 (Apartado 1, Tabla 8), los cuales se pueden observar en las Figuras 13.A, 13.E, 13.I, 14.B-C, 14.F, 14.I y 14.L explantes saludables con formación de raíces abundantes, hojas con un color verde brillante y un mayor tamaño (Figura 14.C). En la Figura 14.B no hay presencia de explantes grandes y abundantes pero hay mayor proliferación de brotes que en el caso anterior. Además, en la Figura 12. E se puede observar la presencia de oxidación del explante.

La hoja es una parte fundamental en las plantas ya que es gracias a esta estructura que se realiza la fotosíntesis. Existe una diferencia notable entre los meristemas que dan origen a las hojas y los que dan origen a los tallos y a las raíces, que estriba en que las hojas poseen un meristemo foliar, con funcionamiento simultáneo o secuencial que permite la morfogénesis de ésta, con un funcionamiento limitado y cesa cuando alcanza su forma y dimensiones definidas (Ramos, 2006), mientras que el crecimiento de los meristemas de tallo y raíces es indeterminado debido a que pueden mantener su crecimiento por un tiempo indefinido (Pimienta *et al.*, 2006).

Por otro lado, Fu (1978; 1979) reportó que explantes de hoja de *Dendrobium tokai* x *Dendrobium undulatum*, cultivados en un medio sin reguladores de crecimiento fueron lentos en la formación de nuevas plantas, ya que cada segmento dio lugar a la formación de una planta solamente.

La formación de los brotes generados a partir del explante de raíz (Gráfica 5) se presentaron en los tratamientos 2 (0.5 mg/L de Kin) y 13 (Kin/ANA 1:0.5 mg/L) por organogénesis directa. La raíz fue el explante con menos brotes totales (4) a lo largo de los 120 días de duración de los tratamientos (Apartado 1, Tabla 8).

Los brotes a partir de raíz (plántulas) (Figuras 13.B, 13.D, 14.D y 14.E) presentaban raíces bien desarrolladas que al ser cortadas transversalmente se caracterizan por ser cilíndricas, su color es verde en un tono más claro que las hojas abundantes que se originaron también de este mismo explante de raíz. Esto pudo deberse a las características del tratamiento 2 (0.5 mg/L de Kin) y 13 (Kin/ANA 1:0.5 mg/L), debido a que las citocininas han sido utilizadas ampliamente para inducir la formación de brotes en el cultivo de orquídeas a una alta concentración y en ausencia de auxinas, además de que la presencia de ANA en el tratamiento 13 nos muestra el efecto de esta auxina en la formación de raíces (Suárez, 2006).



Gráfica 5. Brotes obtenidos a partir de los tres tipos de explantes de *E. adenocaula*.

Hay reportes en los que los explantes de raíz han dado diversos resultados favorables para la formación de PLB's con la especie *Cymbidium goeringii* (Arditti y Ernst, 1993). Sin embargo, adicionaron al medio una alta concentración de Kin (10 mg/L), una concentración tres veces mayor a la empleada en este trabajo (Kin 3 mg/L). Vajrabhaya y Vajrabhaya (1976) retiraron el velamen de los explantes de raíz para obtener mejores resultados a partir de este explante y este procedimiento les favoreció en formación masas de callos en *Arachnis hookeriana* x *Arachnis flos-aëris* con 2,4-D (0.5 mg/L) debido a que expusieron el cortex para una mejor respuesta.

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

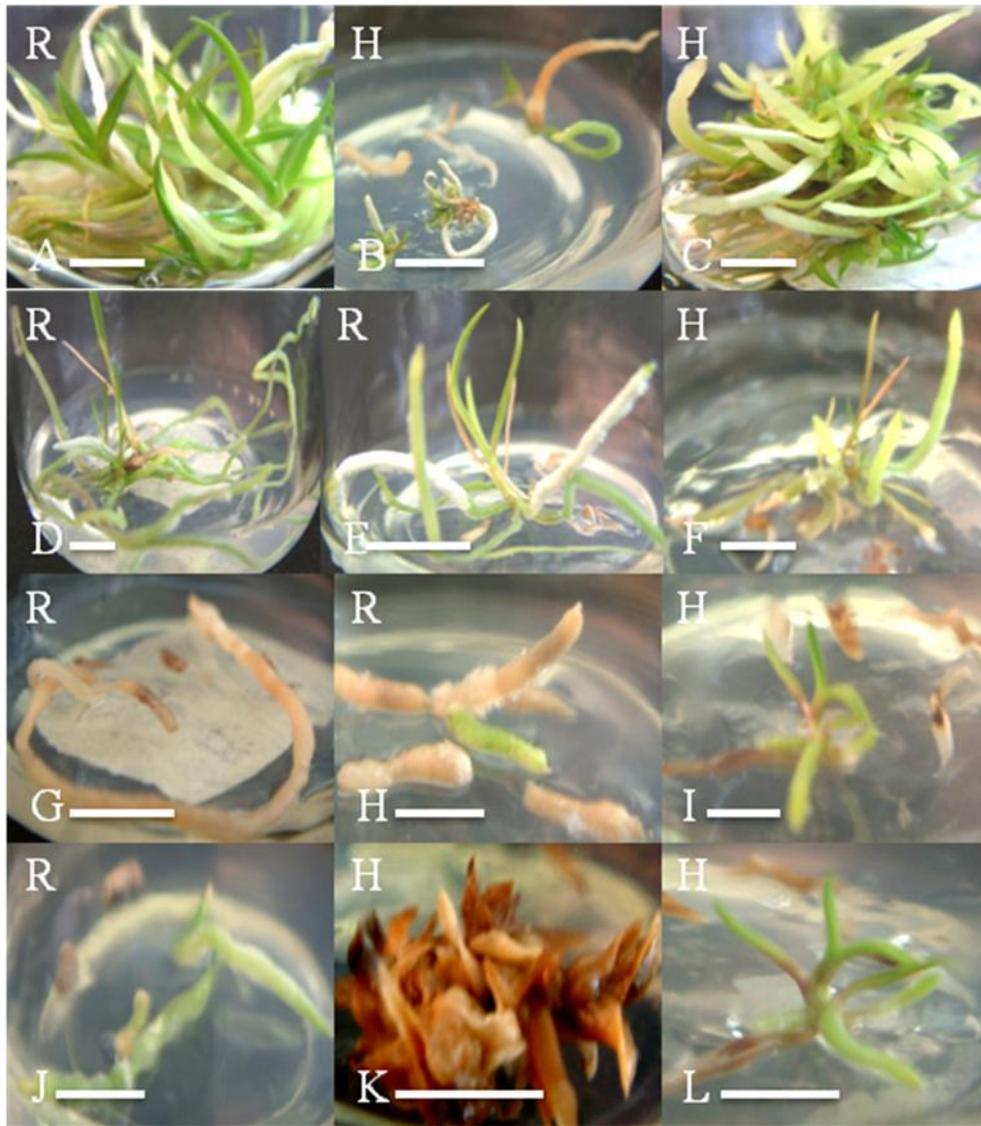


Figura 14. Respuesta de los explantes de raíz y hoja.

A) Explante de raíz del tratamiento 2 a los 120 días del inicio del tratamiento. B) Explante de hoja del tratamiento 2 a los 120 días del inicio del tratamiento. C) Explante de hoja del tratamiento 2 a los 120 días del inicio del tratamiento. D) Explante de raíz del tratamiento 2 a los 120 días del inicio del tratamiento. E) Explante de raíz del tratamiento 2 a los 120 días del inicio del tratamiento. F) Explante de hoja del tratamiento 20 a los 90 días del inicio del tratamiento. G) Explante de raíz del tratamiento 2 a los 120 días del inicio del tratamiento. H) Explante de raíz del tratamiento 17 a los 120 días del inicio del tratamiento. I) Explante de hoja del tratamiento 15 a los 90 días del inicio del tratamiento. J) Explante raíz del tratamiento 2 a los 120 del inicio del tratamiento. K) Explante de hoja del tratamiento 15 a los 90 días del inicio del tratamiento. L) Explante de hoja del tratamiento 15 a los 90 días del inicio del tratamiento. Barra = 1 cm. H = Hoja. R = Raíz (esquinas superiores izquierdas)

George y Sherrington (1984) señalan que se requiere de bajas concentraciones de auxinas en combinación con altas concentraciones de citocininas para inducir la formación de brotes, aunque en algunos casos únicamente el empleo de citocininas es suficiente para inducir esta respuesta (Suárez, 2006). En el caso de este trabajo se observó una respuesta similar a la obtenida con los tratamientos 2 (0.5 mg/L Kin) y el 8 (1:0.1 mg/L Kin/ANA). Así mismo Rojas (2007) reportó que el mejor tratamiento en nudos de *Vanilla planifolia* fue aquel en el que se encontraba solamente la presencia de BA (1 mg/L) para la obtención de brotes. Existen algunas ocasiones en las que los tratamientos con concentraciones muy bajas de reguladores de crecimiento o incluso en la ausencia de éstos, inducen una brotación múltiple, como en el caso de *Encyclia vitellina* (Ramírez, 1990).

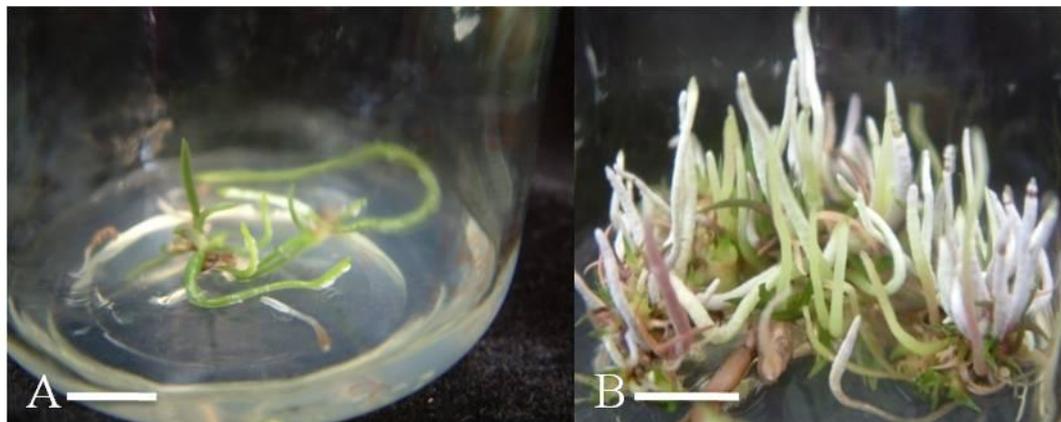


Figura 15. Organogénesis a partir de tallo. A) Tratamiento 20 a los 90 días del inicio del tratamiento. B) Tratamiento 15 a los 210 días del inicio del tratamiento. Barra= 1 cm.

A partir de los explantes de tallo se obtuvo la formación de 419 brotes totales, lo cual representa una diferencia importante en comparación con los brotes originados a partir de la raíz (4) y hoja (18) (Apartado 1, Tabla 8). La formación de los brotes obtenidos en el presente estudio fue por organogénesis directa, esta se caracteriza por la formación y crecimiento de brotes sin haber sufrido una fase de callo (Chávez, 1993; Ramos, 2006).

Los tratamientos en los que hubo mayor número de brotes en el presente trabajo fueron el tratamiento 8 (Kin/ANA 1:0.1 mg/L) para el explante de hoja, el

tratamiento 2 (Kin 0.5 mg/L) para el explante de raíz y el tratamiento 17 (Kin/ANA 0.5:1 mg/L) para el explante de tallo y como se puede observar en los tres tratamientos se encuentra presente la citocinina en combinación o no con la auxina; lo cual concuerda con los trabajos que reportan que el ratio de auxina-citocinina en concentraciones bajas o nulas de auxinas (0-1 mg/L) y concentraciones más elevadas de citocininas (1-10 mg/L) incrementan la formación de brotes y la formación de PLB's (Martínez, 1985; Baltazar, 2004).

Si se observan las Figuras 15. A-B podemos ver que la formación de las raíces de los brotes de *E. adenocaula* es evidente y ésta es más abundante que las hojas; esta cantidad de raíces se debe al estímulo provocado por la presencia de la auxina (1:0.5 mg/L Kin/ANA). Se han reportado experimentos en los que se ha demostrado que la adición de auxinas (AIA) estimula el enraizamiento adventicio en plantas de frijol (Strasburger, *et al* 2004). Además, en trabajos realizados con el género *Cymbidium*, la adición de reguladores de crecimiento como ANA, AIA y 2,4-D promovió la formación de raíces adventicias (Arditti y Pridgeon, 1997). Se ha reportado que el empleo de ANA (1-5 mg/L) incrementa el número de brotes formados (Suárez, 2006), sin embargo, en este estudio no se observó lo mismo dado que la auxina se encuentra no dentro del rango establecido para la formación de brotes antes planteado, lo cual se debe a que se trata de especies diferentes y les favorece de manera distinta.

Los tallos son los mejores explantes para la formación de brotes en la familia Orchidaceae (Jacques, 1988), debido a que posee meristemos marginales, meristemos intercalares, meristemos de engrosamiento primario y meristemos de elongación (Ramos, 2006). El tallo fue el explante con mayor número de brotes debido a que es una estructura con la presencia de nudos, entrenudos y de órganos laterales: las hojas y las yemas axilares asociadas, lo cual los hace más complejos en estructura en comparación a la raíz. El meristemo apical del tallo, además de dar lugar a dicho órgano, también da origen a los nudos, a las yemas laterales reproductivas (que origina a las hojas o ramas laterales) y a las yemas

laterales reproductivas (que dan origen a las flores). La división celular continua y la diferenciación de tejidos tiene como consecuencia el crecimiento del tallo (Pimienta *et al.*, 2006). Es importante aclarar que al realizar los cortes de tallo se buscó que estuvieran presentes las yemas laterales en donde se insertan las hojas, por lo que se cortó una porción del tallo a partir de donde se insertaban las hojas hasta donde iniciaba la raíz, ya que se pretendía asegurar la presencia de las zonas meristemáticas.

Hay reportes en los que se utilizó BA para la inducción de brotes, pero tuvo un efecto inhibitorio en *Geodorum densiflorum* (Sheelavantmath *et al.*, 2000). Además, el tamaño de los explantes de tipo meristemático tiene diferentes efectos en el crecimiento lo cual fue observado en *Cymbidium* spp. (Arditti y Pridgeon, 1997).

7.4 Oxidación de brotes.

La oxidación de explantes se presentó desde los primeros 30 días de iniciados los tratamientos, este fenómeno se observó de manera más notable en los explantes de hoja (Figuras 13.I y 13.E) y tallo (16 A-C) lo cual se hacía notar cuando éstos se tornaban a una coloración café o blanquecina, (Figura 14 G-I) este suceso no fue tan evidente en raíz (13.H y 14.G). La oxidación de los tejidos o necrosamiento ocurre a través de la acción de las enzimas tipo oxidasas que contienen cobre, las cuales son liberadas o sintetizadas con las condiciones de oxidación cuando los tejidos se encuentran dañados. Los sustratos de estas enzimas varían según el tejido de la planta. Las enzimas y los sustratos, comúnmente tirosina o O-hidroxifenoles como el ácido clorogénico. Las enzimas y los sustratos se encuentran en distintos compartimentos celulares cuando las células están dañadas o senescentes (George y Sherrington, 1984). En el presente trabajo el medio de cultivo en los que se encontraban expuestos dichos explantes oxidados

no presentaban señales de producción de fenoles (manchas oscuras en el medio de cultivo), por lo que la oxidación se debió a muerte celular.

Además, Ramírez (1990) reportó que para la especie *Encyclia vitelina* y *Habenaria rosilloana* la disección provoca una severa oxidación y posteriormente la muerte de explantes donde se utilizaron secciones de masas de protocormos. Baltazar (2004) reportó que explantes de protocormos fraccionados tienden a oxidarse más debido al estrés provocado por el corte que aquellos protocormos que no fueron seccionados.

Los daños ocasionados por oxidación fueron irreversibles y se perdieron dichos cultivos, ya que a pesar de ser cambiados a un medio con carbón activado no se pudieron recuperarse. Una respuesta similar la reportó Cahuantzi (1998), quien utilizó explantes de inflorescencia de *Oncidium cavendishianum* incorporando carbón activado.

En las Figuras 13.E y 14.K se muestra que el brote del tratamiento 15 (3:0.5 Kin/ANA mg/L), presenta características desfavorables. Se observa que las hojas y raíces presentaban un color verde intenso, y al paso de 30 días se oxidaron completamente tornándose de un color café oscuro. Un caso parecido ocurrió en el tratamiento 20 (3:1 mg/L Kin/ANA) en donde los brotes comenzaron a tener coloración café en algunas de sus hojas. Esto podría deberse a que una alta concentración de reguladores de crecimiento, puede inducir otra respuesta no deseada, por ejemplo, hay reportes en los que se ha demostrado que los reguladores de crecimiento en lugar de favorecer la germinación la redujeron (Martínez, 1991) o también retardan el crecimiento (Ávila, 2006).

Además, Rangel (1995) menciona que en los tratamientos en los que las concentraciones de auxina fueron mayores a las de citocinina los explantes de *Oncidium stramineum* no presentaron respuestas morfogenéticas al ser comparados con los demás.

Por otra parte cabe mencionar que las respuestas de oxidación pudieron deberse a que los cultivos no se encontraban en las mismas condiciones de luz ya que por falta de espacio se acomodaron unos sobre otros y por lo tanto no les favorecía a todos los explantes por igual. Sin embargo, Hsiao (2005) reportó que los explantes de *Dendrobium* spp. presentaron necrosis tanto aquellos que se colocaron en la luz como los que se colocaron en la oscuridad en ausencia de auxinas.



Figura 16. Respuestas de los explantes de tallo. A) Tratamiento 11 a los 90 días del inicio del tratamiento presentando la formación de PLB's y explantes oxidados. B) Tratamiento 15 a los 120 días del inicio del tratamiento presentando brotación múltiple. C) Tratamiento 11 a los 90 días del inicio del tratamiento observando brotes, formación de PLB's y explantes oxidados. Barra = 1 cm.

7.5 Medio de cultivo.

El medio MS-50% utilizado en el presente trabajo en combinación con auxinas y citocininas no fue cambiado a los explantes hasta una vez que terminó la fase de inducción (120 días). Sin embargo este hecho tuvo una influencia en la respuesta de los explantes tratados debido a que al transcurrir el tiempo el agua, los nutrientes y la fuente principal de carbono (sacarosa) se agota. El agua en el medio de cultivo es importante ya que ejerce influencia en casi todas las actividades fisiológicas en el cultivo de tejidos incluyendo la absorción de nutrientes (Adelberg *et al.*, 1997).

Martínez (1991) concluyó que el medio MS al 100% es uno de los medios de cultivo con las concentraciones más altas de nutrimentos minerales actuando probablemente de una forma inhibitoria en la germinación de las semillas de *Laelia squinnersi* var. *squinnersi*, llegando incluso a necrosar al 100% de los protocormos a los 4 meses después de la germinación. Sin embargo, cuando redujo la concentración de sales a la mitad se observaron cambios notorios. En el presente trabajo, la concentración de sales fue al 50% y aún así los explantes y algunos brotes presentaron oxidación, tal vez debido a que se trata de especies distintas o bien que fue otra la causa de la oxidación de los mismos como el agotamiento de los nutrientes del medio o la falta de agua debido a que no hubo un subcultivo de brotes mientras estuvieron en la fase de inducción. Si se tratara de una carencia o deficiencia de muchos elementos, puede reconocerse en el aspecto de la planta, por ejemplo la falta de potasio puede parecer necrótica y la falta de fierro, manganeso o magnesio puede aparecer clorosis. También algunos elementos aún siendo esenciales son tóxicos cuando se observen en exceso (Rojas, 1972).

La sacarosa en general se usa en un porcentaje de 2% a 2.9% posiblemente una concentración mayor presente efectos tóxicos debido al estrés osmótico al que se someten las células (Ramírez, 1990). Sin embargo, es recomendable utilizar 3% de sacarosa en cultivos que permanecerán en el medio de cultivo por más de 8 semanas como fue el caso del presente trabajo. Por otro lado se ha observado en *Cattleya aurantiaca*, que una vez que la primera hoja ha aparecido, los carbohidratos adicionados exógenamente no se requieren para su crecimiento y desarrollo (Ramírez, 1990).

Es común en los estudios de cultivo de tejidos vegetales el uso del carbón activado, se utiliza a menudo para mejorar el crecimiento celular y el desarrollo, lo cual representa un papel fundamental en la micropropagación, la germinación de semillas de orquídeas, embriogénesis somática, cultivo de anteras, enraizamiento, elongación, por mencionar algunos. Éste tiene un efecto de absorción debido a

que se conforma de pequeñas partículas, que lo hace benéfico por eliminar la presencia de productos químicos como el 5-hidroximetilfurfural producido en la autoclave por la descomposición de la sacarosa a causa de la deshidratación (Pan, 1998).

El carbón activado en este trabajo no fue utilizado en conjunto con los 20 tratamientos pero sí se utilizó para el subcultivo de plantas y para los brotes en una etapa posterior a los 120 días de inducción, dando como resultado una apariencia saludable y vigorosa a las plantas lo cual se observó en el color, abundancia y crecimiento de las mismas (Figura 16.C). Quizás el impacto más importante al adicionar carbón activado al medio de cultivo desencadena una drástica caída en la concentración en los reguladores de crecimiento y otros suplementos orgánicos (Dennis, 2008), es por esto que se evitó en el presente trabajo combinar en un mismo medio de cultivo reguladores de crecimiento y carbón activado. Además, Temjensangba y Deb (2005) reportó que el uso de carbón activado (0.1%) en el medio de cultivo MS estimuló la formación de PLB's en la especie *Cleisostoma racemiferum*.

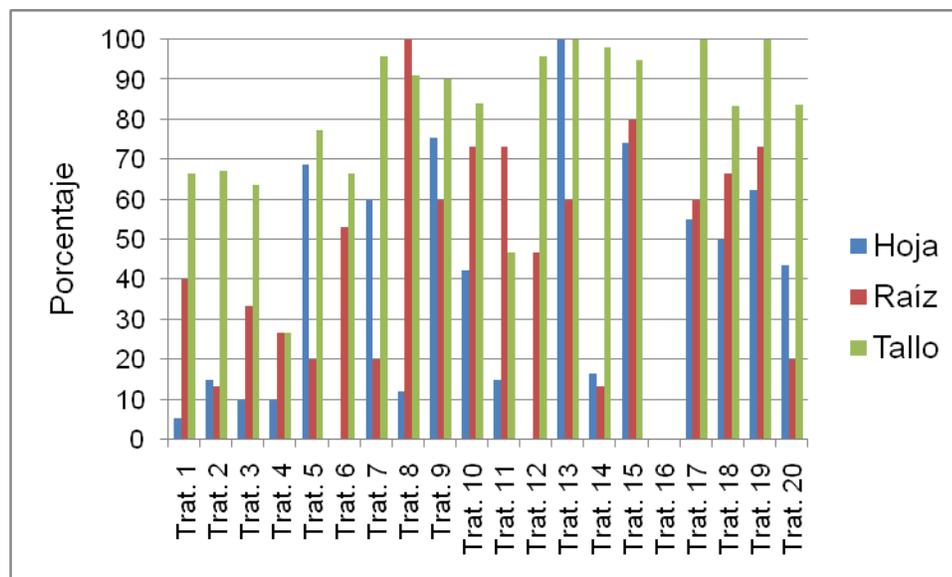
7.6 Porcentaje de sobrevivencia de los explantes.

De acuerdo a lo que se puede observar en la Gráfica 6, que corresponde al porcentaje de sobrevivencia de explantes de hoja (35.80%), raíz (46.66%) y tallo (76.57%), después de haber transcurrido 120 días del inicio del tratamiento, es evidente que la hoja fue el explante que tuvo menor porcentaje de sobrevivencia seguido de la raíz y el tallo.

La raíz fue el explante en donde hubo menor oxidación y por lo tanto el que tuvo mayor sobrevivencia a lo largo de los 120 días de tratamiento, pero también fue el explante en el que se presentó el menor número de brotes. Respecto a lo

anterior es pertinente mencionar que las especies epífitas, como el caso de *E. adenocaula* obtuvieron modificaciones morfológicas que le permitieran sobrevivir en su hábitat, por lo que sus raíces se encuentran adaptadas a condiciones extremas para retener humedad lo cuál es importante en los resultados reflejados en el presente estudio.

Es posible que la hoja, por su morfología aplanada y a que no es una estructura de almacenamiento, haya tenido un menor porcentaje de sobrevivencia en comparación a la raíz. Los explantes grandes poseen un potencial regenerador considerablemente mayor, por el contrario la capacidad regenerativa de explantes pequeños tiende a ser baja, además, estos explantes tienden a ser dañados más fácilmente (Litz y Jarret, 1993). Por otra, parte la coloración de los tejidos ya sea café o negra refleja el estado de oxidación de los explantes (generalmente cuando son demasiado cortos) y en la mayoría de los casos mueren. Es por esto que se recomienda llevar a cabo medidas preventivas para evitar la oxidación como remover sustancias fenólicas así como modificar el potencial redox (George y Sherrington, 1984).



Gráfica 6. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de hoja, raíz y tallo a 120 días del inicio del tratamiento.

7.7 Obtención de PLB's.

La formación de PLB's comenzó a ser evidente en los primeros 30 días del inicio del tratamiento, además la formación de estas estructuras sólo se observó en el explante de tallo (Figura 17. A-D). A lo largo de las observaciones se obtuvo un total de 34 explantes que dieron lugar a la formación de PLB's. En distintas investigaciones realizadas con *Phalaenopsis* y *Stanhopea tigrina*, los cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) son obtenidos a partir de diferentes medios de cultivo con o sin reguladores de crecimiento (Kuo *et al.*, 2005; Chávez, 2008). Además, Temjensangba y Deb (2005) obtuvo 80% de formaciones de PLB's a partir de explantes de hoja de cultivos *in vitro* de 15 semanas de edad. Sin embargo, en el presente trabajo las plantas *in vitro* de *E. adenocaula* a partir de las cuales se obtuvieron los explantes sobrepasaban las 15 semanas del cultivo dado que el medio estaba agotado, razón por lo que los explantes de hojas no resultaron ser un buen explante en la formación de PLB's en medio MS con reguladores de crecimiento (ANA/BA 2:2 mg/L).

Es importante señalar que a pesar de que sólo un explante de tallo dio lugar a la formación de PLB's este se encontraba en presencia del tratamiento 20 el cuál presentaba la mayor concentración de reguladores de crecimiento (Kin/ANA 3:1 mg/L) por lo tanto a una mayor concentración el tallo formó PLB's en un intervalo de tiempo menor; lo cual resulta contrario al lo reportado por Baltazar (2004) quien obtuvo la mayor formación de PLB's a partir de bajas concentraciones de reguladores de crecimiento (ANA/BA 0.1:0.5 mg/L)

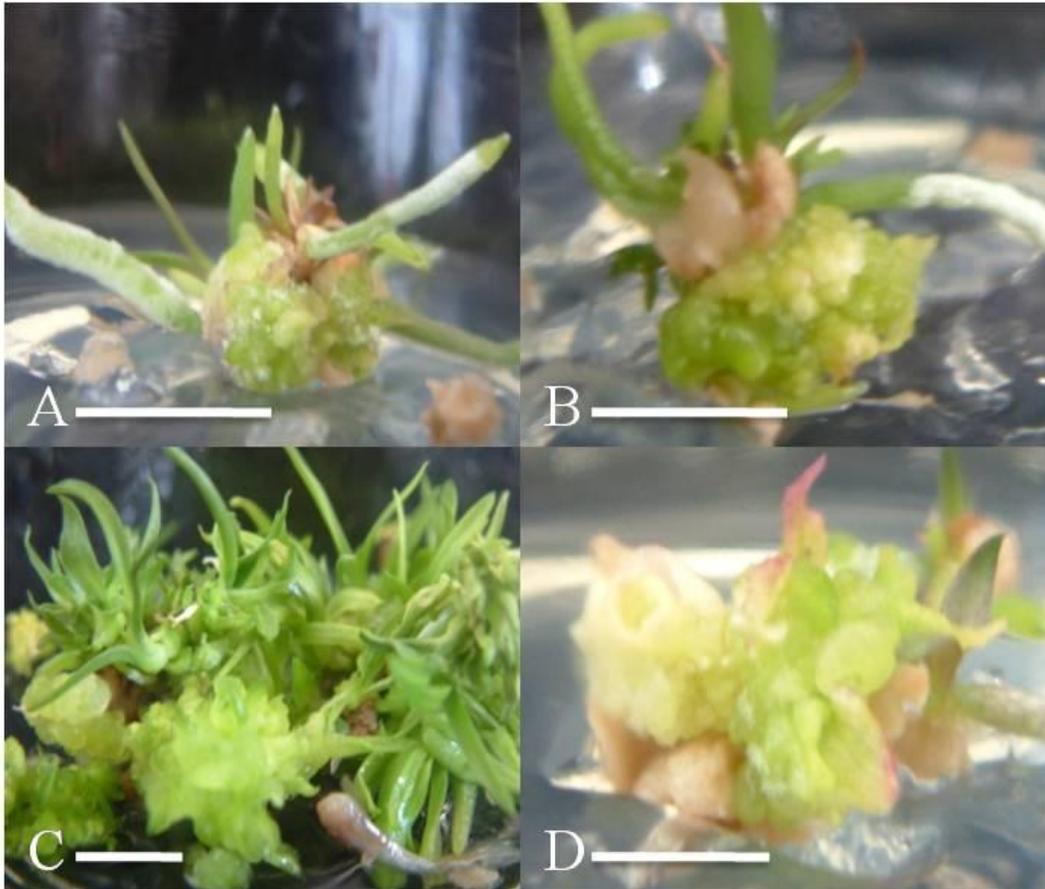
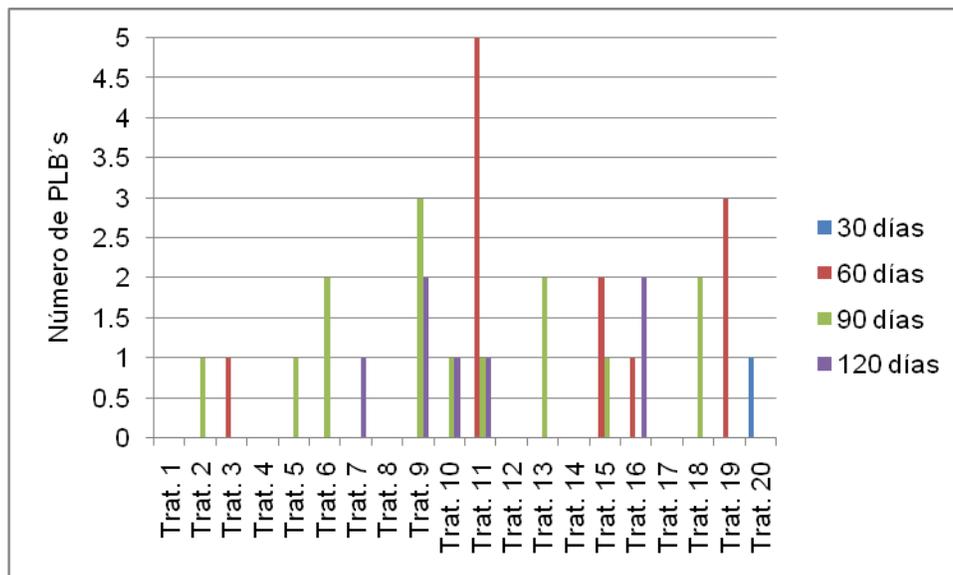


Figura 17. PLB's obtenidos a partir de tallo.16. A) Tratamiento 11 a los 90 días del inicio del tratamiento. 16. B) Tratamiento 16 a los 90 días del inicio del tratamiento. 16. C) Tratamiento 11 a los 90 días del inicio del tratamiento. 16. D) tratamiento 1 a los 150 días del inicio del tratamiento. Barra = 1 cm.

La propagación clonal es una de las vías que se utilizan con mayor frecuencia en orquídeas con fines comerciales y de conservación, esta técnica se inicia con los trabajos realizados por Morel (1963) en *Cymbidium* y *Cattleya* cuando el protocormo es seccionado y transferido a un medio nuevo, no se diferencia en una yema sino que regenera una masa de nuevos protocormos, esta regeneración se produce en la epidermis. Los subcultivos frecuentes hacen posible mantener esta proliferación por un periodo indefinido (Ramírez, 1990).

Se tomaron datos a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio de los tratamientos (Gráfica 7) observando que a los 90 días fue cuando se observó una mayor

formación de PLB's en un mayor número de tratamientos, datos que coinciden con la especie *Dendrobium crumenatum* que también presentó formación de PLB's a tres meses del inicio del tratamiento, a partir de explantes de hoja (Arditti y Ernest, 1993). En contraste, la menor formación de PLB's se registró a los 30 días de inicio del tratamiento ya que sólo en el tratamiento 20 (3:1mg/L Kin/ANA) hubo formación de estas estructuras. Estos resultados coinciden con Cahuantzi (1998) quien reportó que la formación de PLB's se llevó a cabo a las 8 semanas del inicio del tratamiento en *Oncidium cavendishianu*. Sagawa (1974) reporta que al cultivar ápices de *Dendrobium nobile* obtuvo la formación de PLB's después de 2 meses del inicio de los cultivos lo cual es semejante al resultado que nos indica que al menor tiempo de inducción del presente trabajo (30 días) hubo una menor proliferación de PLB's (Rangel, 1995). Sin embargo es muy importante resaltar que a los 30 días del inicio de los tratamientos el único resultado obtenido se obtuvo a partir del tratamiento 20 (Kin/ANA 3:1 mg/L) lo cuál está indicando que la mayor concentración de ambos reguladores de crecimiento da resultados en un menor intervalo de tiempo.



Gráfica 7. PLB's obtenidos a partir de los explantes de tallo.

Los explantes de tallo, a partir de los cuales se llevó a cabo la formación de PLB's, fueron colocados en medio MS sólido al 50% al igual que los explantes de hoja y raíz. Sin embargo existen varios trabajos donde se reporta que el medio líquido favorece una mejor formación de estas estructuras, los medios líquidos en agitación mejoran la aereación, incrementan el área de superficie y permiten la dilución homogénea de metabolitos los cuales podrían ser tóxicos. De Melo y cols. (2006) utilizaron un primer medio de cultivo líquido para diluir la gran cantidad de sustancias fenólicas que se liberan en el medio de cultivo y que interfieren negativamente con el desarrollo inicial de los brotes que después fue cambiado por uno semisólido en combinación con TDZ lo cual disparó la proliferación de *Phalaenopsis* spp y *Doritaenopsis* spp. Además, se descubrió que el TDZ juega un papel importante en el desarrollo de yemas axilares y adventicias. En el tratamiento 11 (0/0.5 Kin/ANA) se observó la mayor cantidad de formación de PLB's, a diferencia de los resultados reportados por Rangel (1995) en donde el mejor tratamiento para la formación de PLB's fue aquel en el que sólo se adicionó 1 mg/L de Kin, esto se podría deber a que se trata de especies distintas.

Estos trabajos podrían indicar que quizás los reguladores de crecimiento tienen un efecto en la formación de PLB's. Se ha reportado acerca de esta influencia en el cultivo *in vitro* de plantas como por ejemplo la presencia del 2,4-D y TDZ (1-3 mg/L) en trabajos con *Oncidium* spp. que es una especie a partir de la cual se logró la formación de 6 000 PLB's en medio MS al 50%. Éstos fueron obtenidos en un periodo de 2 meses de un primer cultivo de 1 g de callo fresco formado a partir de callos embriogénicos cultivados por más de 5 años (Jheng *et al.*, 2006). También se sabe que el uso de levadura seca (DY), BA (13.15 mg/L) y sacarosa en cultivos de células en suspensión, tienen un efecto en la formación eficiente de PLB's en *Phalaenopsis* spp. Este mismo experimento con la adición de sacarosa en lugar de glucosa dio como resultado la formación de la mitad de PLB's (Kuo *et al.*, 2005).

Hsiao (2005) reportó que hay una mejor respuesta en cuanto a la embriogénesis cuando se exponen los explantes de hoja a la luz que cuando no se exponen en cultivos de *Dendrobium* spp. La proliferación de protocormos en *Cymbidium* spp mejoró cuando en el medio de cultivo se elevó a niveles supraóptimos la sacarosa, mientras que la organogénesis fue mejorada a concentraciones subóptimas de sacarosa (Ramírez, 1990). Arditti y Pridgeon (1997) en su trabajo con *Cymbidium* spp., argumentan que algunos tipos de meristemas no producen PLB's cuando éstos están demasiado largos. Los PLB's se desarrollan desde regiones axilares e internodales. Quizás es una posible causa que explica por que no todos los explantes de tallo dieron respuestas favorables ya que existen trabajos con el género *Arachnis* spp en donde los explantes de meristemo utilizados tuvieron forma cúbica y una longitud de 2 mm³, lo cual produjo PLB's después de un mes y medio de cultivo (Arditti y Ernst, 1993).

Finalmente los PLB's además de presentar una alta formación de plántulas poseen una alta capacidad de regeneración después de varios subcultivos, así mismo fue observado por Shimura y Koda (2004), quienes al subcultivar PLB's de *Cypripedium macranthos* var. *Rebunense* durante dos años, estos no perdieron la habilidad de regenerar plántulas.

8) CONCLUSIONES.

- Se lograron las condiciones de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *E. adenocaula*.
- El enjuague en las plantas de *E. adenocaula* anterior a colocarlas en las soluciones desinfectantes resultó en una mayor contaminación, esto debido causas de manipulación del material vegetal.
- Mediante el uso de PPM se establecieron las condiciones de desinfección en 74% de las plantas de *E. adenocaula*
- El Benomil fue letal (100%) en los cultivos de *E. adenocaula*.
- El tiempo de exposición en Benomil ocasionó muerte en la totalidad de las plantas de *E. adenocaula*.
- La falta de un enjuague con agua destilada estéril posterior al tratamiento de desinfección con PPM y Benomil ocasionó la muerte en las plantas de *E. adenocaula*
- El tallo fue el explante que tuvo una mayor elongación en cm y en un mayor número de tratamientos.
- La menor elongación se presentó en la hoja.
- Se observó organogénesis directa a partir de los explantes de raíz tallo y hoja.
- El explante que dio lugar a la mayor cantidad total de brotes fue el tallo (416).

- La combinación de reguladores donde se presentó el mayor número de brotes (82) a partir de tallo fue con Kin (0.5 mg/L) y ANA (1 mg/L).
- El explante que dio lugar al menor número de brotes totales fue la raíz (4) con la presencia de Kin (0.5 mg/L).
- La mayor formación de brotes a partir de los tres explantes tuvo lugar a partir de los 60 y 90 días del inicio de los tratamientos.
- En el tratamiento 8 (Kin/ANA 1:0.1mg/L) se presentó la mayor cantidad de brotes (8) a partir de hoja
- La formación de PLB's tuvo lugar a partir únicamente del explante de tallo, dando lugar a un evento de embriogénesis directa.
- La formación de PLB's se presentó a partir de 34 explantes de tallo
- La mayor cantidad de PLB's se llevó a cabo en el tratamiento 11 (ANA 0.5 mg/L).
- La mayor cantidad de PLB's se formó a los 90 días del inicio de los tratamientos.
- El tratamiento 20 (Kin/ANA 3:1 mg/L) que contenía las más altas concentraciones de reguladores de crecimiento propició la formación de PLB's a los 30 días del inicio de los tratamientos.
- El explante con menor sobrevivencia fue la hoja (0-40%).
- El explante que tuvo mayor sobrevivencia fue el de raíz (80-100%).
- La concentración más alta de Kin (3 mg/L) ocasionó la muerte en el 30% de los brotes de hoja.

- La muerte de los explantes tuvo lugar por muerte celular.
- La ausencia de subcultivos en la totalidad de explantes ocasionó la deficiencia de nutrientes y sacarosa en el medio de cultivo, dando como resultado muerte celular de los tejidos.
- No se presentaron daños en los explantes debido a la producción de fenoles.

9) PERSPECTIVAS.

Una vez terminado el tiempo de exposición de los explantes en benomil y PPM se deberá enjuagar el material vegetal.

El tiempo de exposición de los explantes en benomil deberá ser menor a los 30 minutos por lo contrario se observarán daños en las plantas tratadas.

El mejor explante para la formación de brotes y PLB's fue el tallo incluso en ausencia de reguladores de crecimiento en medio MS-50%, sin embargo, existen muchos trabajos en los que el uso de un medio de cultivo líquido ha sido una excelente opción en la obtención de PLB's, así es que probablemente el establecimiento del explante de tallo en un medio líquido resultaría en brotación múltiple de PLB's con fines de propagación masiva.

La posible producción de una mayor cantidad de PLB's a partir de explantes de tallo en un menor tiempo se llevará a cabo en concentraciones más altas de auxinas y citocininas a las utilizadas en el presente trabajo (Kin/ANA 3:1 mg/L). También un mejor resultado en la formación de PLB's tendría lugar en presencia de auxinas y ausencia de citocininas.

Así mismo una combinación de reguladores de crecimiento dónde se encuentren las auxinas en mayor proporción que las citocininas posiblemente resultará en una mayor producción de brotes a partir de tallo.

Es necesario que se realicen subcultivos a lo largo del tiempo de inducción de los explantes para evitar que se agoten los nutrientes y la sacarosa del medio de cultivo.

Por otro lado, para combatir la oxidación en los tejidos de *E. adenocaula* será necesario probar opciones como el PVP, ácido cítrico, ácido ascórbico, entre otros.

Para el enraizamiento de la especie *E. adenocaula* se deberá utilizar concentraciones de auxinas (ANA) en mayor proporción que las de citocinina (Kin) con la adición de carbón activado para un mejor enraizamiento.

Se deberán aclimatizar las plantas con el fin de conservar el germoplasma, para la contribución en un contexto de investigación, y para prevenir posibles riesgos de extinción.

10) APARTADO 1.

Tablas.

Tabla 5. Incremento de longitud de los explantes de hoja a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio de los tratamientos

Tratamiento	30 días cm	60 días cm	90 días cm	120 días cm
1	0	0.05	0	0
2	0	0	0.221	0.18
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0.0315	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0.148	0
9	0.12	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0.88	0	0.185	0.16
15	0.13	0.085	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0.035	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0.087	0	0

Tabla 6. Incremento de longitud de los explantes de raíz a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio de los tratamientos

Tratamiento	30 días cm	60 días cm	90 días cm	120 días cm
1	0.43	0.61	0	0
2	0.064	0.065	0.0845	0.7
3	0	1.093	0.2346	0
4	0.0132	0.886	0	0
5	0.008	0.0308	0.0165	0
6	0	0.0267	0.0285	0
7	0	0.2917	0	0
8	0	0.2145	0.1311	0
9	0	0.02	0	0
10	0.179	0.922	0.0773	0
11	0	0.038	0.0295	0
12	0.2475	1.028	0.001545	0
13	0.0311	0	0.048	0
14	0.0142	0	0.0669	0
15	0	0	0.0245	0
16	0	0	0.0725	0
17	0.031	0	0.009	0
18	0	0.0123	0	0
19	0.0234	0	0.0046	0
20	0.0157	0.0172	0.01	0

Tabla 7. Incremento de longitud de los explantes de tallo a los 30, 60, 90 y 120 días del inicio de los tratamientos

Tratamiento	30 días cm	60 días cm	90 días cm	120 días cm
1	0	0.13	1.24	0.90
2	0.89	0.15	0.45	0.20
3	0.02	0.01	0.20	0
4	0.03	0.02	0.35	0.12
5	1.31	0	0.72	0
6	0	0.18	0.11	0
7	0	0.22	0.86	0.37
8	1.11	0	0.24	0
9	0.08	0.1	0.22	0
10	0	0	0.57	0.63
11	0	0.20	0.35	0.23
12	0.05	0	0.48	0.21
13	0	0.12	0.67	0.31
14	0	0.88	0	0
15	0	0.46	0	0
16	0.10	0	0.29	0
17	0	1.01	0	0
18	0	0.64	0	0
19	0	0.92	0	0
20	0	0.29	0	0

Tabla 8. Total de brotes obtenidos de los explantes de hoja raíz y tallo.

Tratamiento	Hoja	Raíz	Tallo	Total de Brotes
1	1	0	3	4
2	3	3	9	15
3	0	0	15	15
4	0	0	11	11
5	1	0	13	14
6	0	0	0	0
7	0	0	5	5
8	8	0	11	19
9	0	0	27	27
10	1	0	28	29
11	0	0	20	20
12	0	0	14	14
13	0	1	57	58
14	0	0	33	33
15	2	0	44	46
16	0	0	15	15
17	1	0	81	82
18	0	0	14	14
19	0	0	7	7
20	1	0	9	10
Total de brotes	18	4	419	441

Tabla 9. Supervivencia de los explantes de hoja, raíz y tallo a 120 días del inicio del tratamiento.

Tratamiento	Hoja	Raíz	Tallo
	%	%	%
1	5.33	66.66	40
2	15	67.14	13.33
3	10	63.63	33.33
4	10	26.66	26.66
5	68.88	77.33	20
6	0	66.66	53.33
7	60	95.74	20
8	12	91.11	100
9	75.55	90	60
10	42.22	84	73.33
11	15	46.66	73.33
12	0	96	46.66
13	100	100	60
14	16.66	98	13.33
15	74.28	95	80
16	0	0	0
17	55	100	60
18	50	83.33	66.66
19	62.5	100	73.33
20	43.63	83.63	20

Tabla 10. Formación de PLB's a los 30, 60, 90 y 120 días de inicio de los tratamientos.

Tratamiento	30 días	60 días	90 días	120 días	Total de PLB's
1	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	1
3	0	1	0	0	1
4	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	1
6	0	0	2	0	2
7	0	0	0	1	1
8	0	0	0	0	0
9	0	0	3	2	5
10	0	0	1	1	2
11	0	5	1	1	7
12	0	0	0	0	0
13	0	0	2	0	2
14	0	0	0	0	0
15	0	2	1	0	3
16	0	1	0	2	3
17	0	0	0	0	0
18	0	0	2	0	2
19	0	3	0	0	3
20	1	0	0	0	1

Tabla 11. Medio de Cultivo Murashige y Skoog (MS; 1962).

N°	COMPONENTES	g/L	g/10L
1	MACRONUTRIENTES		
	(NH ₄)NO ₃	1.65	16.5
	KNO ₃	1.9	19
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.37	3.7
	KH ₂ PO ₄	0.17	1.7
2	CALCIO		
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.44	
3	MICRONUTRIENTES		
	MnSO ₄ * H ₂ O	0.01689	0.1689
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.0086	0.086
	H ₃ BO ₃	0.0062	0.062
	KI	0.00083	0.0083
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.00025	0.0025
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.000025	0.00025
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.000025	0.00025
4	FIERRO		
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278	0.278
	Na ₂ EDTA	0.0373	0.373
5	VITAMINAS		
	Tiamina * HCl	0.0001	0.001
	Ácido Nicotínico	0.0005	0.005
	Piridoxina * HCl	0.0005	0.005
6	INOSITOL	0.10	1.0
7	GLICINA	0.002	0.02
8	CARBOHIDRATOS		
	SACAROSA	30.0	
	CARBÓN ACTIVADO	1	
	Gel-rite	4	

11) LITERATURA CITADA.

Adelberg JW., Desamero NV., Hale SA and Young RE. 1997. Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 1-7

Anta S., Piña I., Sánchez G., García F., Gutierrez R y Sánchez A. 1999. Estrategias para la conservación de áreas naturales protegidas en el estado de Oaxaca. *Gaceta Ecológica INE-SEMARNAP* 50: 12-22.

Arditti J y Ernst R. 1993. Micropropagation of orchids. John Wiley and Sons, Inc. New York. pp: 111-124; 311-347.

Arditti J y Pridgeon AM. 1997. Orchid biology: reviews and perspectives, VII. Dordrecht: Kluwer Academic. 394 p.

Ávila DI y Salgado-Garciglia R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* 8:138-149.

Ávila C., Colín S y Muñoz VC. 2003. Economía de la biodiversidad, memorias del Seminario Internacional de la Paz, BCS. SEMARNAT-INE, México.

Barrera D. 2006. Regeneración *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., (Orchidaceae) a partir de hojas inmaduras y callo. Tesis de Licenciatura en proceso. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 106 p.(No editado)

Baltazar RJ. 2004 Regeneración *in vitro* a partir de tallo de *Oncidium tigrinum* Llave & Lex (Orchidaceae) a partir de protocormos Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. México.124 p.

Benjamins R and Scheres B. 2008. Auxin: The Looping Star in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology* 59:443–65

Cahuantzi CV. 1998. Propagación *in vitro* de *Oncidium cavendishianum* Baten (Orchidaceae) a partir de explantes de la inflorescencia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 43p.

CITES <http://www.cites.org/esp/disc/what.shtml>

Chávez V. 1993. Embrogénesis somáticas a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia Mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de doctorado en Ciencias, Facultad de Ciencias. UNAM. 148p.

Chávez V. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Stanhopea tigrina* (Bateman) (Orchidaceae) en distintas etapas de desarrollo. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. México. 69p.

Chen Y., Liu X and Liu Y. 2004. *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 247–251

Coenen C and Lomax T. 1997. Auxin-Citokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science* 9(2): 351-356.

CONABIO. 1998. La Diversidad Biológica de México: Estudio de País. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. México.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. <http://www.conanp.gob.mx/>

Cooke TJ., Poli DB., Sztein AE y Cohen JD. 2002. Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Molecular Biology* 49: 319-338.

Corona V y Chimal A. 2006. Plantas mexicanas con potencia ornamental. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. México. 623p.

Damon A., Aguilar-Guerrero E., Rivera L., y Nikolaeva V. 2004. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo. Serie de Horticultura* 10(2): 195-203.

De Melo W., Barbante G y Pimentel AP. 2006. Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae). *In vitro Cell Developmental Biology Plant* 42: 568-571.

Delbeljak N., Regvar M., Dixon KW y Sivasithamparam K. 2002. Induction of tuberisation *in vitro* with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguinea*. *Plant Growth Regulation* 36(3): 253–260.

Dressler RL y Pollard GE. 1974. El género *Encyclia* en México. *Asociación Mexicana de Orquideología*. México. 158p.

Dressler R. 1981. Phylogeny and clasification the Orchid Family. *Discorides Press*. Portland, Oregon. 332p.

Dressler R. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. *Discorides Press*. Portland, Oregon. 314p

Essau K. 1976. Anatomía vegetal. *Ediciones Omega*. Barcelona

- Flores GE.** 2001. Programa de la materia de sistemas de producción forestal. Chapingo México.
http://www.virtual.chapingo.mx/dona/sis.prod.forestal/Unidad_I.pdf
- Flores PA and Valencia DS.** 2007. Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation* 136(2007) 372-387.
- Fu FML.** 1978. Clonal propagation of *Aranda*, *Ascocenda* and *Cattleya* by leaf tissue culture. *The Gardens' Bulletin Singapore* 31: 132-138.
- Fu FML.** 1979. Studies on the tissue culture of orchids. Clonal propagation of *Aranda*, *Ascocenda*, and *Cattleya* by leaf by tissue culture. *Orchid Review* 87: 308-310
- García J.** 2003. Flora del Bajío y regiones adyacentes. Fascículo 119. Orchidaceae tribu epidendreae. Instituto de Ecología, A.C. Inecol. Libro electrónico.
<http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/FLOBA.htm>
- George E. y Sherrington P.** 1984. Plant propagation by tissue culture. *Basingstore*, England. 709p.
- Goldhaber PDG.** 2008. Inducción de cultivos *in vitro* de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) para la obtención de Z-Ligustílida. Tesis de Maestría. Instituto de Biología. UNAM. México. 206p.
- Gutierrez RM y Solis RV.** 2008. Relaxant and antispasmodic effects of extracts of the *Encyclia michuacana* on isolated guinea pig ileum orchid. *Natural Medicines* 63(1) 65-8
- Hágsater E., Soto-Arenas M., Salazar-Chávez G., Jiménez-Machorro M., López-Rosas MA y Dressler R.** 2005. Las orquídeas de México. *Instituto Chinoin*. Japón.
- Hartmann HT. Kester DE. Davies FT y Geneve RL.** 2002. Plant Propagation. Principles and Practices. Séptima edición. *Prentice Hall*. Estados Unidos de América.
- Hauptmann RM., Widholm JM and Paxton JD.** 1985. Benomyl: a broad spectrum fungicide for use in plant cell and protoplast culture. *Plant Cell Reports* 4:129-132.
- Hernández HJ., Hernández SO y Mata RM.** 2001. Regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de mitades de protocormos de *Laelia anceps* Lindl. y *Catasetum intergerrimum* Hook. *Amaranto* 14:(1) 3-12.

Hong P., Chen JT and Chang WC. 2008. Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of a maudiae type slipper orchid. *Acta Physiologiae Plantarum* 30:755–759.

Hsiao HC., Jen TC and Wei CC. 2005. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium Chiengmai pink* and subsequent plant regeneration. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41:765-769.

Ichihashi S. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral bud from young flowers stalks. *Lindleyana: The Scientific Journal of the American Orchid Society* 7(4): 208-215.

Ishii Y., Takamura T., Goy M y Tanaka M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 17: 446-450.

Jacques M. 1988. Multiplicación vegetativa del cultivo *in viro*. *Mundi Prensa*. Madrid. 232p.

Jheng FY., Do YY., Liauh YW., Chung JP and Huang PL. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* “Gower” “Ramsey” by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science* (170): 1133-1140.

Instituto Nacional de Ecología.
<http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/546/cap24.pdf>

Kauth PJ., Kane ME., Vendrame WA and Reinhardt-Adams C. 2008. Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae): evidence for ecotypic differentiation. *Annals of Botany* 102(5): 783-93

Kerbauy GB. 1991. *In vitro* conversion of *Cattleya* root tip cells into protocorm-like bodies. *Journal of Plant Physiology* 138: 248-251.

Kerbauy G and Maranhão E. 1996. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warscewiczii*1. *Fisiologia Vegetal* 8(2): 157-159

Kitsaki CK., Zygouraki S., Ziobora M and Kintzios S. 2004. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports* 23(5): 284-90

Kuo HL., Chen JT and Chang WC. 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* ‘Little Steve’. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41 (4): 453-456

Lin YH., Chang C y Chang WC. 2000. Plant regeneration from callus culture of *Paphiopedilum hybrid*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62: 21-25.

López AL y Pulido FG. 2007. Simposio de Biodiversidad y conservación de algunos recursos florísticos en el Estado de Hidalgo. *Pachuca-Hidalgo Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo* 35p.

Martin KP. 2003. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (Reichb. f.) J. D. Hook., an endangered orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39: 322-326

Martínez PA. 1985. Introducción *in vitro* de brotación múltiple en *Bletia urbana*. Dressler Orchidaceae a partir de protocormos seleccionados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México 66p.

Martínez PA. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias. UNAM México. 107p.

Martínez RR. 2003. Aplicación de la Biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo* 9: 17-34.

McCarroll NE., Protzel A., Ioannou Y., Stack HF., Jackson MA., Waters MD and Dearfield KL. 2002. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutation Research* 512: 1-35.

Michael CN and Roberts SC. 2005. Culture of isolated single cells from *Taxus* suspensions for the propagation of superior cell populations. *Biotechnology Letters* 27: 1725-1730

Mok D and Mok M. 2001. Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89-118.

Morel G. 1974. Clonal multiplication of orchids. En C-L Withner (Ed.). The orchids: scientific studies, *Wiley-Interscience*, New York 169-222.

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Navarro LER., Gil VI., Cruz San Pedro EV y Bastida TA. 2001. Botánica e identificación de orquídeas. *AGRIBOT* No. 6. UACH. 54p.

Normanly J., Slovin JP and Cohen JD. 2004. Auxin biosynthesis and metabolism. In: Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Davies J (ed). Kluwer Acad. *Pub. Dordrecht*, The Netherlands, pp. 36-62.

Pan MJ and Staden J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155–163

Paul AL., Semer C., Kucharek T and Fer RJ. 2001. The fungicidal and phytotoxic properties of Benomil and PPM in supplemented agar media supporting transgenic Arabidopsis plants of space Shuttle flight experiment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 480-485.

Peres EP and Kerbauy GB. 1999. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). *Plant Cell Reports* 18(12): 1002-1006.

Pérez R. and Vargas R. 2009. Relaxant antiespasmodic of effects of the orchid *Encyclia michuacana* on isolated guinea pig ileum. *Journal Natural Medicine* 63: 65-68

Pierik RIM. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Editorial *Mundi-Prensa*. Madrid. 326p

Pimienta BE, Muñoz UA, Ramírez HBC, Méndez ML. 2006. Desarrollo vegetal. Universidad de Guadalajara, Coordinación General Académica. Unidad para el Desarrollo de la Investigación y el Posgrado. México. 331p

Philip VJ and Nainar SAZ. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 122:211-215

Pyati AN., Murthy HN., Hahn EJ and Paek KY. 2002. In vitro propagation of *Dendrobium macrostachyum* Lindl.--a threatened orchid. *Indian Journal of Experimental Biology* 40(5):620-3

Pridgeon AM. 1982. Diagnostical anatomical characters in the *Pleurothallidinae* (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.* 69 (6) 921-938

Ramírez MC. 1990. Establecimiento de cultivo *in vitro* de orquídeas mexicanas en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México 75p.

Ramos RM. 2006. Regeneración de melón (*Cucumis melo* L.) bajo condiciones *in vitro* como modelo biológico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 106p.

Rangel LM. 1995. Regeneración *in vitro* a partir del cultivo de ápices de tallo de *Oncidium stramineum* Batem. ex. Lindl. (Orchidaceae), especie mexicana en peligro de extinción. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 82 p.

Roca W y Mroginski M. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. *Centro internacional de Agricultura tropical*. Reimpresión. Cali, Colombia. 969p.

Rodríguez LM. 2000. Germinación y desarrollo *in vitro* de *Paphiopedilum extaminodium* (Castaño, Hágsater & Aguirre) V.A. Albert Borges Pett y *P caudatum* (Rolfe) V.A. Albert & Borge Pett. (Orchidaceae), especies en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias. UNAM. México. 63p.

Rojas F. 2007. Regeneración *in vitro* de *Vainilla planifolia*, Salisbury (Orchidaceae) especie mexicana. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 79p.

Rojas GM. 1972. Fisiología Vegetal Aplicada. *Mc Graw Hill*. México. 252p.

Rzedowski G. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda Edición. *CONABIO*. México. 1406p

Ruíz BC., Laguna CA., Iglesias ALG., Damon A., Marín HTNJ., Azpíroz RHS y Moreno MJL. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Revista Internacional de Botánica Experimental* 77: 203-215.

Sakakibara H. (2004) Cytokinin biosynthesis and metabolism. In Plant Hormones: Biosynthesis, Signal transduction, and Action (Ed., Davies, P.) Springer Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp: 95-114.

Santos HL., Martínez GM., Campos JE and Aguirre LE. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *European Journal of Horticultural Science* 40(2): 439-442.

Sarasan V., Cripps R., Ramsay M., Atherton C., Mc Michen M., Prendergast G and Rowntree J. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 42: 206-214.

Sarmiento FM y Romero GC. 2000. Orquídeas Mexicanas. *Porrúa*. México D.F. 148p

Sarukhán J. y Dirzo R. 1992. México ante los retos de la biodiversidad. *Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad*. México.

Scagel R. 1980. El Reino Vegetal. Los grupos de plantas y sus relaciones evolutivas. *Ediciones Omega*. Madrid. 788p

SEMARNAT. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001-Protección Ambiental – Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres categorías de riesgo y especificando para su inclusión, exclusión o cambio – lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, miércoles 6 de marzo de 2002. www.semarnat.gob.mx

Sheelavantmath SS., Murthy HN., Pyati AN., Ashok KHG and Ravishankar BV. 2000. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 151-154.

Shields R., Robinson SJ y Anslow PA. 1984. Use of fungicidal plant tissue culture. *Plant Cell Reports* 3: 33-36.

Shimura H and Koda Y. (2004) Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 273–276

Sierra JHJ. 2006. Germinación *in Vitro* y adaptación a condiciones *ex Vitro* de *Laelia autumnales* (La Llave & Lexarza) Lind. Orchidaceae. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 117p.

Stewart SL and Kane ME. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 147-158.

Strasburger E., Fortes FMJ., Frutos A y Sitte P. 2004. Tratado de Botánica. Edición 95. *Ediciones Omega*. Barcelona. 1068p

Suárez I. 2006. Regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (ORCHIDACEAE), especie endémica de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México 144p.

Su W. 2002. Chapter 10: Cell culture and regeneration of plant tissues. En: G. Khachatourians, A. McHughem, R. Scorza, W. Nip, Y. Hui (Eds.). *Transgenic-plants and corps*. Ed. *Marcel Dekker Inc*. New York. Pp151-167.

Taiz L and Zeiger E. 2002. *Physiology of Plants*. *Sinauer Associates, Inc. Publishers*. Sunderland, Massachusetts.

Tang GX., Wang FD y Zhou WJ. 2005. Studies on the seed embryo germination and propagation of *Dendrobium candidum in vitro*. *China Journal of Chinese Materia Medica* 30(20):1583-6

Temjensangba and Deb CR. 2005. Regeneration of plantlets from *in vitro* raised leaf explants of *Cleisostoma racimeferum* Lindl. *Indian Journal of Experimental Biology* (43) 4: 377-381.

Thompson DI., Trevor J and Edwards E. 2006 .Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability *in vitro*: relationships, requirements and first-time reports. *Plant Growth Regulator* 49:269–284.

Thorpe T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37:169-180.

Torres J and Mogollon N. 2000. Micropogación de *Cattleya mossiae* Parker ex Hook mediante brotación axilar inducida por tidiazuron. *BIOAGRO* 12(1): 10-14.

Tovar C., Hernández C., Burgueño Cedillo E and Joseph P. 2006. A new C-glicosylflavone from *Encyclia michuacana*. *Journal of Molecular Structure*. 783: 96-100.

Tynan JL., Conner AJ., Macknigh RC and Poulter RTM. 1993. Miconazol: An effective antifungal agent for plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 293-301

Vajrabhaya T and Vajrabhaya M. 1976. The study of various organs of orchids *in vitro*. I. Stems, leaves and buds. *Rep. Sci. Res. Fac. Sci., Chulalongkorn Univ.* 1: 105-115

Vidalie H. 1980 Cultivo *in vitro*. *Editorial Científica*. México. 190p

Vieira RT and Fernandes IC. 2007. Multiplicação “*in vitro*” de *Cattleya x mesquiae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. *Pesq Agropec Trop* 37(1): 10-15

Woodward AW and Bartel B. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735

Yan N., Hu H., Huang JL., Hu K., Wuang H and Zhou ZK .2006. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84: 113–117.

Zarco AAE y Gómez AE. 2008. Bahía de Los Ángeles: Recursos Naturales y Comunidad. Línea Base 2007. Instituto Nacional de Ecología. pp695 <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/546/cap24.pdf>

Zhao P., Wu F., Feng FS and Wang WJ. 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 44:178–185.

Zheng LM and Pang JL. 2006. *In vitro* flowering of cultures from a hybrid of *Cymbidium goeringii* and *C. hybridum*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 32(3):320-4.